

DOI: 10.17650/2222-1468-2023-13-2-44-56



Экспрессия PD-L1 и p53 при плоскоклеточной карциноме ротоглотки в зависимости от статуса вируса папилломы человека

Д.Ш. Полатова^{1,2}, А.Ю. Мадамин², А.В. Савкин², А.И. Нуржабов², Н.К. Асамединов²,
Д.А. Ибрагимова², Р.Р. Давлетов¹, С.К. Насиров³

¹Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии; Республика Узбекистан, 100174 Ташкент, ул. Фароби, 383;

²Ташкентский государственный стоматологический институт; Республика Узбекистан, 100047 Ташкент, ул. Махтумкули, 103;

³Ташкентская медицинская академия; Республика Узбекистан, 100109 Ташкент, ул. Фаробий, 2

Контакты: Ахмад Юлдашевич Мадамин akhmad.madaminov@inbox.ru

Введение. Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого риска, особенно 16-го генотипа, вызывает плоскоклеточную карциному ротоглотки (ПКР). Он выявляется примерно в 70 % опухолей, возникающих из лимфоидной ткани небных миндалин или основания языка. В связи с ростом числа случаев ВПЧ-положительной ПКР ВПЧ-статус стал рассматриваться как маркер клинического исхода ПКР. Простота выполнения, низкая стоимость, надежность и высокая чувствительность иммуногистохимического исследования, направленного на выявление p16INK4a, дали основание широко использовать этот метод для установления ВПЧ-статуса.

Цель исследования – определение зависимости экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) и p53 от наличия непрямого маркера ВПЧ – p16^{INK4a} – у пациентов с ПКР.

Материалы и методы. В исследование вошли 76 пациентов с ПКР T1–4N0–3M0, которые получали лечение в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре онкологии и радиологии ($n = 37$) и его Ташкентском городском филиале ($n = 39$) в период с 2015 по 2020 г. Всем ретроспективно отобранным пациентам проведен иммуногистохимический анализ на наличие p16^{INK4a}, PD-L1 и p53 в образцах опухолевой ткани, фиксированных формалином и залитых в парафин. В нашей работе иммуногистохимическое исследование, направленное на выявление p16^{INK4a}, было единственным релевантным инструментом при установлении ВПЧ-статуса. Для укрепления его прогностической значимости мы использовали дополнительные молекулярные маркеры – PD-L1 и p53, которые играют большую роль в канцерогенной трансформации и дальнейшем прогрессировании ПКР.

Результаты. Результаты иммуногистохимического анализа показали, что сверхэкспрессия p16^{INK4a} сопровождалась положительной реакцией PD-L1 в 46 % (6/13) случаев; ни в одном случае положительной экспрессии мутантного типа p53 не наблюдалось. Дикий тип p53 идентифицирован только в 1 (3 %) случае в сочетании со сверхэкспрессией p16^{INK4a}.

Заключение. Созданная нами панель, состоящая из 3 молекулярных маркеров (p16^{INK4a}, PD-L1 и p53), возможно, откроет новые горизонты в точном прогнозировании, стратификации риска и понимании молекулярной сигнатуры ПКР. Это, в свою очередь, поможет клиницистам при выборе индивидуальных стратегий терапии, направленных на деэскалацию лечения и оптимизацию его результатов.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, плоскоклеточная карцинома ротоглотки, p16^{INK4a}, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1, p53, иммуногистохимическое исследование, экспрессия белка, молекулярный маркер

Для цитирования: Полатова Д.Ш., Мадамин А.Ю., Савкин А.В. и др. Экспрессия PD-L1 и p53 при плоскоклеточной карциноме ротоглотки в зависимости от статуса вируса папилломы человека. Опухоли головы и шеи 2022;12(2):44–56. DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-2-44-56

PD-L1 and p53 expression in squamous cell carcinoma of the oropharynx depending on human papilloma virus status

D.Sh. Polatova^{1,2}, A.Yu. Madaminov², A.V. Savkin², A.I. Nurzhabov², N.K. Asamedinov², D.A. Ibragimova², R.R. Davletov¹, S.K. Nasirov³

¹Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology; 383 Farobi St., Tashkent 100174, Republic of Uzbekistan;

²Tashkent State Dental Institute; 103 Makhtumkuli St., Tashkent 100047, Republic of Uzbekistan;

³Tashkent Medical Academy; 2 Farobiy St., Tashkent 100109, Republic of Uzbekistan

Contacts: Akhmad Yuldashevich Madaminov akhmad.madaminov@inbox.ru

Introduction. High-risk human papilloma virus (HPV), especially genotype 16, causes oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC). It is detected in about 70 % of tumors developing from lymphoid tissue of the tonsils or the base of the tongue. Due to the increased number of HPV-positive OSCC, HPV status is considered a marker of OSCC clinical outcome. Easy testing, low cost, reliability, and high sensitivity of immunohistochemical analysis for p16^{INK4a} allowed to widely use this method for HPV status determination.

Aim. To determine the association between programmed death-ligand 1 (PD-L1) and p53 expression and presence of indirect HPV marker – p16^{INK4a} – in patients with OSCC.

Materials and methods. The study included 76 patients with OSCC T1–4N0–3M0 who received treatment at the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology ($n = 37$) and its Tashkent branch ($n = 39$) between 2015 and 2020. For all selected patients, retrospective immunohistochemical analysis for the presence of p16^{INK4a}, PD-L1 and p53 in tumor samples fixed with formalin in paraffin blocks was performed. In our work, immunohistochemical examination for p16^{INK4a} was the only relevant tool for HPV status determination. To reinforce its prognostic significance, we used additional molecular markers PD-L1 and p53 which play an important role in carcinogenic transformation and OSCC progression.

Results. The results of immunohistochemical analysis showed that p16^{INK4a} overexpression was accompanied by positive PD-L1 reaction in 46 % (6/13) of cases; there were no cases of positive expression of mutant type p53. Wild type p53 was identified in only 1 (3 %) case in combination with p16^{INK4a} overexpression.

Conclusion. The developed panel consisting of 3 molecular markers (p16^{INK4a}, PD-L1 and p53) may open new horizons in accurate prognosis, risk stratification and understanding of OSCC molecular signature. This, in turn, will help clinicians in selection of individual therapy strategies for treatment de-escalation and outcome optimization.

Keywords: human papilloma virus, oropharyngeal squamous cell carcinoma, p16^{INK4a}, programmed death-ligand 1, p53, immunohistochemical analysis, protein expression, molecular marker

For citation: Polatova D.Sh., Madaminov A.Yu., Savkin A.V. et al. PD-L1 and p53 expression in squamous cell carcinoma of the oropharynx depending on human papilloma virus status. *Opukholi golovy i shei = Head and Neck Tumors* 2022;12(2):44–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-2-44-56

Введение

Технологические воздействия на природу и изменение образа жизни человека привели к увеличению заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗНО). По данным многочисленных исследований, во многих странах мира в настоящее время растет число ЗНО, связанных с инфекционными факторами. Согласно классификации Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC) одним из наиболее распространенных инфекционных агентов, вызывающих рак, является широко распространенное семейство вирусов папилломы человека (ВПЧ) [1]. Эти вирусы поражают слизистую оболочку и кожные покровы человека и приводят к развитию ЗНО из-за уникальной геномной характеристики [2]. По данным мировой литературы, ВПЧ высокого канцерогенного риска является важным этиологическим фактором, способствующим росту заболеваемости плоскоклеточной карциномой ротоглотки (ПККР), наблюдаемому с 1970 по 1980 г. [3, 4]. Этот вирус, особенно 16-го генотипа, вызывает ПККР. Он выявляется примерно в 70 % опухолей, возникающих из лимфоидных тканей миндалин и основания языка [5, 6].

В глобальном масштабе частота встречаемости ВПЧ-положительной ПККР в 2021 г. составила около 33 %, однако его распространенность значительно

варьирует в зависимости от региона: от 0 % на юге Индии до 85 % в Ливане [7]. Более 85 % случаев рака шейки матки во всем мире приходится на развивающиеся страны. Несмотря на это, в них относительно меньше случаев ПККР, чем в странах с более высоким уровнем дохода [8]. Эта эпидемиологическая асимметрия и резкий контраст распространенности могут быть связаны с отсутствием данных о реальной ситуации. Поэтому действительная распространенность ВПЧ может не соответствовать приведенным цифрам, особенно если она составляет 0 %. Для получения четкой картины требуются научные исследования в регионах. По распространенности ВПЧ-положительной ПККР среди населения Республики Узбекистан в целом нет точных данных. Однако, по данным Global Cancer Observatory Всемирной организации здравоохранения (<https://gco.iarc.fr/>), по заболеваемости ПККР Узбекистан занимает 7-е место среди стран Азии, на долю которых приходится 50 % населения мира (рис. 1).

Согласно данным Р. Sinha около 75–80 % пациентов с ВПЧ-положительной ПККР после постановки диагноза живут 5 лет; для пациентов же с ВПЧ-отрицательной ПККР характерен худший прогноз: 5-летняя выживаемость наблюдается менее чем у 50 % больных [9]. Положительный результат на ВПЧ стал единственным наиболее важным прогностическим фактором выживания

больных ПККР. Несмотря на это, не у всех пациентов с ВПЧ-положительной ПККР наблюдаются благоприятные исходы. Так, рецидивы в течение 3 лет зачастую возникают у пациентов с экспансией клона опухолевых клеток, резистентных к лечению (в 25 % случаев). Однако недавние достижения в молекулярной биологии позволяют детально исследовать геномные характеристики ВПЧ, что было невозможно всего несколько лет назад. Наиболее существенным препятствием для выявления пациентов с высоким риском рецидива и смерти является отсутствие используемых в клинической практике маркеров.

Материалы и методы

В исследование вошли 76 пациентов с ПККР T1–4N0–3M0, которые с 2015 по 2020 г. получали лечение в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре онкологии и радиологии ($n = 37$) и его Ташкентском городском филиале ($n = 39$). Клинико-демографические показатели (возраст, пол, статусы курения и употребления алкоголя, топография опухоли, состояние лимфатических узлов, стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM), патологический подтип опухоли, исход заболевания), подробности лечения и последующего наблюдения были получены из карт стационарных пациентов и данных из ракового регистра. Также анализировали результаты диагностических методов исследования.

Это исследование было одобрено на заседании научного совета учреждения, поскольку оно проводилось с использованием ретроспективных обезличенных клинических данных. Архивные гистологические образцы пациентов с ПККР (биопсия/хирургическая резекция), фиксированные формалином и залитые парафином (ФФЗП), получены из патоморфологического отделения.

Для иммуногистохимического (ИГХ) анализа степени интенсивности экспрессии 3 молекулярных маркеров — p16^{INK4a}, лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) и p53 — отобраны образцы, ФФЗП, 30 из 76 пациентов. Непрезентативные и неподдающиеся оценке образцы были исключены из исследования. Проведены 90 ИГХ-исследований, в ходе которых в 30 случаях оценивался уровень экспрессии p16^{INK4a}, в 30 — PD-L1 и в 30 — p53. При выполнении ИГХ-анализа использованы ткани, фиксированные 10 % забуференным формалином в течение 24 ч. Рутинная проводка тканей осуществлялась на карусельном процессоре STP120 (ThermoFisher, Германия). Серийные срезы толщиной 3 мкм подвергались депарафинизации, дегидратации и демаскировке. Окраску антигенами проводили при помощи специализированной автоматизированной системы Ventana Benchmark XT (Roche, Швейцария).

Уровни экспрессии p16^{INK4a} интерпретированы в соответствии с рекомендациями Колледжа американских

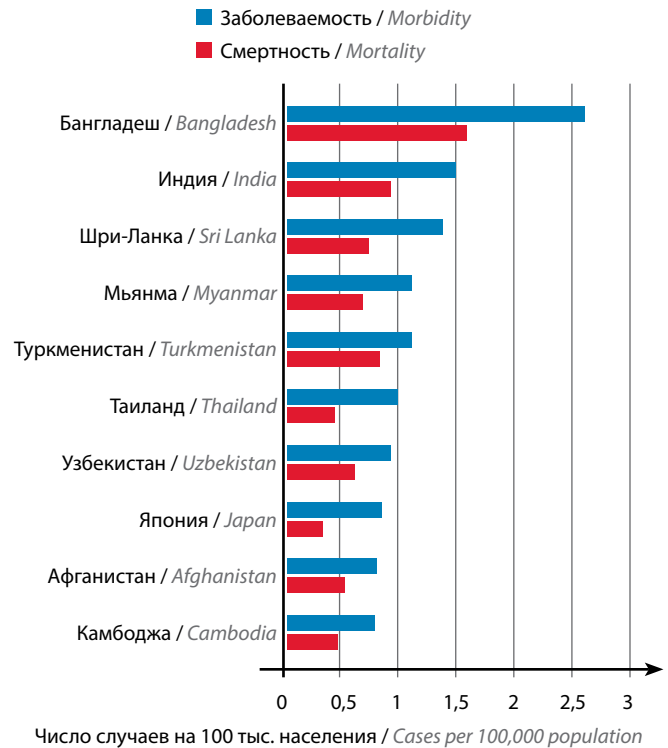


Рис. 1. Расчетные стандартизованные по возрасту показатели заболеваемости раком ротоглотки и смертности от данной патологии населения Азии на 2020 г. (<https://gco.iarc.fr/>)

Fig. 1. Calculated age-standardized oropharyngeal cancer morbidity and mortality in Asia in 2020 (<https://gco.iarc.fr/>)

патологов (College of American Pathologists, CAP). Статус p16^{INK4a} считался положительным, если ≥ 70 % опухолевых клеток демонстрировали сильное и диффузное ядерное и цитоплазматическое окрашивание [10]. Положительный ВПЧ-статус пациентов подтвержден с помощью ИГХ-исследования на p16^{INK4a} (≥ 70 %). Были использованы мышиные моноклональные антитела клона E6H4 (CINtec® Histology, Ventana Medical Systems, Inc., США). Экспрессия белка p16^{INK4a} оценивалась в зависимости от уровня интенсивности окрашивания: средний уровень — 50–69 % (p16^{INK4a}-M), высокий — 70–89 % (p16^{INK4a}-H) и очень высокий — ≥ 90 % (p16^{INK4a}-VH). Следует отметить, что слабая экспрессия не вошла в классификацию.

Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 (кроличье моноклональное антитело клона SP263, Ventana Medical Systems, Inc., США) также выполняли на предметных стеклах ФФЗП тканей пациентов с ПККР с использованием автоматизированных методов окрашивания в соответствии с базовыми инструкциями. Сначала оценивали адекватность материала, который должен содержать не менее 100 опухолевых клеток. Патологоанатомы проанализировали образцы и классифицировали их как подходящие или не подходящие для анализа экспрессии PD-L1. При оценке экспрессии PD-L1 рассчитывали показатель доли

опухолевых клеток (Tumor Proportion Score, TPS). Для этого использовали формулу:

$$TPS = \frac{\text{количество PD-L1-положительных опухолевых клеток}}{\text{количество всех жизнеспособных опухолевых клеток (PD-L1-положительных и PD-L1-отрицательных)}} \times 100 \, \%.$$

Кроме того, определяли комбинированный показатель позитивности (Combined Positive Score, CPS). Он рассчитывался по формуле:

$$CPS = \frac{\text{количество PD-L1-положительных клеток (опухолевых клеток, лимфоцитов и макрофагов)}}{\text{количество всех жизнеспособных опухолевых клеток (PD-L1-положительных и PD-L1-отрицательных)}} \times 100 \, \%.$$

Экспрессию PD-L1 считали положительной при $TPS \geq 1 \, \%$ ($CPS \geq 1$). При $TPS 1-9 \, \%$ и $CPS 1-9$ уровень экспрессии PD-L1 считался низким (PD-L1-L), при $TPS 10-29 \, \%$ и $CPS 10-29$ – средним (PD-L1-M), при $TPS 30-49 \, \%$ и $CPS 30-49$ – высоким (PD-L1-H), при $TPS \geq 50 \, \%$ и $CPS \geq 50$ – очень высоким (PD-L1-VH).

Полное круговое или частичное линейное окрашивание мембран опухолевых клеток указывало на положительный PD-L1-статус.

В ходе ИГХ-исследования белка p53 также использованы ФФЗП срезы по стандартному протоколу (мышинное моноклональное антитело клона Bp53-11, Ventana Medical Systems, Inc., США). Первичное антитело клона Bp53-11 направлено против как мутантного, так и дикого типа ядерного белка p53. Пороговое значение положительной экспрессии p53 – $\geq 10 \, \%$ ядерного окрашивания. При окрашивании 10–29 % клеток уровень экспрессии считался низким (p53-L), при 30–49 % – средним (p53-M), при 50–79 % – высоким (p53-H), при $\geq 80 \, \%$ – очень высоким (p53-VH).

В ходе исследования создана классификация, объединяющая гетерогенность экспрессии 3 молекулярных маркеров в зависимости от степени выраженности ИГХ-проявления (табл. 1). При разработке этой классификации приняты во внимание многие международные протоколы, действующие в настоящее время.

Результаты

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 2. Опухоль локализовалась в небных миндалинах (51 % случаев; 39/76), боковой стенке ротоглотки (22 % случаев; 17/76), основании языка (12 % случаев; 9/76), мягком небе (9 % случаев; 7/76), задней стенке ротоглотки (4 % случаев; 3/76), одновременно в боковой и задней стенках (2 % случаев; 1/76).

Таблица 1. Рекомендуемая классификация экспрессии p16^{INK4a}, лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) и p53

Table 1. Recommended clasificaiton of p16^{INK4a}, programmed death-ligand 1 (PD-L1), and p53 expression

Биомаркер Biomarker	Окрашивание Staining	Экспрессия Expression	Пороговое значение, % Threshold value	Низкий уровень, % Low level, %	Средний уровень, % Intermediate level, %	Высокий уровень, % High level, %	Очень высокий уровень, % Very high level, %
p16 ^{INK4a}	Цитоплазма + ядро (диффузное) Cytoplasm + nucleus (diffuse)	Отрицательная Negative Положительная Positive	0–49 ≥50	– –	– 50–69	– 70–89	– ≥90
PD-L1	Мембрана membrane	Отрицательная Negative Положительная (TPS) Positive (TPS) Положительная (CPS) Positive (CPS)	0–0,9 ≥1 ≥1	– 1–9 1–9	– 10–29 10–29	– 30–49 30–49	– ≥50 ≥50
p53	Ядро Nucleus	Отрицательная Negative Положительная Positive	0–9 ≥10	– 10–29	– 30–49	– 50–79	– ≥80

Примечание. TPS – Tumor Proportion Score, показатель доли опухоли; CPS – Combined Positive Score, комбинированный показатель позитивности.

Note. TPS – Tumor Proportion Score; CPS – Combined Positive Score.

Основную часть общей когорты составили мужчины (66 %; 50/76), женщин было меньше (34 %; 26/76). Возраст пациентов на момент постановки диагноза варьировал от 28 до 86 лет, средний возраст составил 56 лет. Нынешними курильщиками были 38 % (29/76) больных (выкуривали в среднем 0,5–1 пачку в день), бывшими курильщиками — 12 % (9/76). Остальные 50 % (38/76) пациентов идентифицированы как никогда не курившие. По сравнению с курильщиками число больных, употребляющих алкоголь, было в 1,5 раза меньше — 33 % (25/76).

У 16 % (12/76) больных диагностировано заболевание стадий T1 и T2, у 84 % (64/76) — стадий T3 и T4 (по 7-му изданию классификации Tumor, Nodus and Metastasis, TNM). Большинство пациентов (78 %; 59/76) имели разные уровни поражения регионарных лимфатических узлов (N1 — 40 %, N2 — 34 %, N3 — 4 %). Базальная мембрана плоского эпителия крипт миндалин прерывиста и богата интраэпителиальными капиллярами, которые могут облегчить доступ к очагам опу-

холевых клеток нижележащих лимфатических узлов. Это объясняет данные нашего исследования, согласно которым у пациентов в основном наблюдалось поражение лимфатических узлов, даже если первичные опухоли были небольшими (T1–2). Химиолучевая терапия отдельно или в сочетании с хирургическим вмешательством проведена 86 % (65/76) больных, операция на первом этапе с адъювантной терапией — 10 % (8/76). Использовались различные химиотерапевтические препараты, в том числе цисплатин, карбоплатин, фторурацил, паклитаксел, доцетаксел, доксорубин, циклофосфамид и гемцитабин. Другие виды лечения (4 % случаев; 3/76) включали одномодалные методы, такие как лучевая или химиотерапия.

Все репрезентативные образцы, взятые от 30 пациентов с ППКР, были проанализированы на 3 маркера: p16^{INK4a}, PD-L1 и p53. Большинство из них получено в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре онкологии и радиологии (67 %; 20/30), остальная часть — в его Ташкентском

Таблица 2. Характеристика пациентов с плоскоклеточной карциномой ротоглотки в зависимости от статуса вируса папилломы человека (ВПЧ)
Table 2. Characteristics of the patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma depending on human papilloma virus (HPV) status

Показатель Characteristic	Общая группа (n = 76) Total group (n = 76)	Исследуемая группа (n = 30) Study group (n = 30)	Положительный ВПЧ-статус (p16 ^{INK4a}) (n = 13; 43 %) Positive HPV status (p16 ^{INK4a}) (n = 13; 43 %)	Отрицательный ВПЧ-статус (p16 ^{INK4a}) (n = 17; 57 %) Negative HPV status (p16 ^{INK4a}) (n = 17; 57 %)
Медиана возраста (межквартильный диапазон), лет Median age (interquartile range), years	56 (28–86)	52 (28–77)	48 (28–77)	54 (34–67)
Пол, абс. (%): Sex, abs. (%):				
мужской male	50 (66)	21 (70)	9 (69)	11 (65)
женский female	26 (34)	9 (30)	4 (31)	6 (35)
Оценка по шкале ECOG, абс. (%): ECOG score, abs. (%):				
0	3 (4)	2 (7)	2 (15)	0
1	42 (55)	18 (60)	7 (54)	10 (59)
2	30 (40)	9 (30)	4 (31)	6 (35)
3	1 (1)	1 (3)	0	1 (6)
Локализация первичной опухоли, абс. (%): Primary tumor location, abs. (%):				
небная миндалина tonsil	39 (51)	14 (47)	8 (61)	7 (41)
основание языка base of the tongue	9 (12)	5 (17)	3 (23)	2 (12)
мягкое небо soft palate	7 (9)	3 (10)	1 (8)	2 (12)
боковая стенка lateral wall	17 (22)	7 (23)	1 (8)	5 (29)
задняя стенка posterior wall	3 (4)	0	0	0
локализация в нескольких областях location in several areas	1 (2)	1 (3)	0	1 (6)

Окончание табл. 1

The end of table 1

Показатель Characteristic	Общая группа (n = 76) Total group (n = 76)	Исследуемая группа (n = 30) Study group (n = 30)	Положительный ВПЧ-статус (p16 ^{INK4a}) (n = 13; 43 %) Positive HPV status (p16 ^{INK4a}) (n = 13; 43 %)	Отрицательный ВПЧ-статус (p16 ^{INK4a}) (n = 17; 57 %) Negative HPV status (p16 ^{INK4a}) (n = 17; 57 %)
Курение, абс. (%) Smoking, abs. (%)	38 (50)	14 (47)	4 (30)	10 (59)
Употребление алкоголя, абс. (%) Alcohol consumption, abs. (%)	25 (33)	9 (30)	2 (15)	7 (41)
T-стадия, абс. (%): T stage, abs. (%):				
T1	2 (3)	1 (3)	1 (8)	0
T2	10 (13)	5 (17)	4 (30)	1 (6)
T3	40 (53)	13 (43)	7 (54)	6 (35)
T4	24 (31)	11 (37)	1 (8)	10 (59)
N-стадия, абс. (%): N stage, abs. (%):				
N0	17 (22)	6 (20)	5 (38)	1 (6)
N1	30 (40)	12 (40)	5 (38)	7 (41)
N2	26 (34)	9 (30)	2 (16)	7 (41)
N3	3 (4)	3 (10)	1 (8)	2 (12)
Лечение, абс. (%): Treatment, abs. (%):				
химиотерапия + лучевая терапия (химиолучевая терапия) ± хирурги- ческое вмешательство chemotherapy + radiotherapy (chemoradio- therapy) ± surgical intervention	65 (86)	25 (83)	11 (84)	14 (82)
хирургическое вмешательство ± адъювантная химиотерапия surgical intervention ± adjuvant therapy	8 (10)	3 (10)	2 (16)	1 (6)
другие виды other types	3 (4)	2 (7)	0	2 (12)
PD-L1-статус (n = 30), абс. (%): PD-L1 status (n = 30), abs. (%):				
положительный positive	17 (22)	17 (57)	6 (46)	11 (65)
отрицательный negative	59 (78)	13 (43)	7 (54)	6 (35)
p53 ^M (n = 29), абс. (%): p53 ^M (n = 29), abs. (%):				
положительный positive	15 (20)	15 (50)	0	15 (88)
отрицательный negative	61 (80)	14 (47)	12 (92)	2 (12)
p53 ^W (n = 1), абс. (%): p53 ^W (n = 1), abs. (%):				
положительный positive	1 (1,3)	1 (3)	1 (8)	0

Примечание. p53^M — мутантный тип белка p53; p53^W — дикий тип белка p53; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1); ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group, Восточная кооперативная онкологическая группа.

Note. p53^M — mutant p53 protein; p53^W — wild type p53 protein; PD-L1 — programmed death-ligand 1; ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group.

городском филиале (33 %; 10/20). Ткани были забраны в основном из первичного очага опухоли до проведения лечения.

Проведены 90 ИГХ-анализов; положительная экспрессия 3 молекулярных маркеров обнаружена в 49 % (44/90) случаев, отрицательная — в 51 % (46/90). Сверхэкспрессия p16^{INK4a} (≥ 70 %) выявлена у 43 % (13/30) пациентов с ПККР, у которых установлен положительный ВПЧ-статус; у остальных 17 (57 %) пациентов был отрицательный ВПЧ-статус. В группе положительного ВПЧ-статуса высокая экспрессия косвенного маркера p16^{INK4a} (70–89 %) наблюдалась в 77 % (10/13) образцов, очень высокая (≥ 90 %) — в 23 % (3/13). В 57 % (17/30) образцов экспрессия p16^{INK4a} не была обнаружена, поэтому они считались ВПЧ-отрицательными.

У 11 (85 %) из 13 пациентов с ПККР с положительным ВПЧ-статусом опухоль развилась из небной миндалины и основания языка, богатых лимфоидной тканью. Мы проанализировали клинико-демографические характеристики и факторы риска, связанные с образом жизни больных с отрицательным ВПЧ-статусом (p16^{INK4a}–), и больных ПККР, обусловленной ВПЧ (p16^{INK4a}–). Пациенты с ВПЧ-положительной ПККР были моложе на момент постановки диагноза, чем пациенты с ВПЧ-отрицательной ПККР; разница в среднем возрасте составила 6 лет.

Методы лечения пациентов с ВПЧ-положительной и ВПЧ-отрицательной ПККР незначительно отличались. Хирургическая резекция первичной опухоли, в том числе рассечение шеи (шейная лимфодиссекция), чаще выполнялась у больных с положительным ВПЧ-статусом. Общее состояние пациентов с ПККР, не ассоциированной с ВПЧ, по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) оказалось немного хуже, чем пациентов с ВПЧ-положительной ПККР. Возможно, это связано с большим возрастом больных, локализацией и характеристикой опухоли, сопутствующими заболеваниями, курением и употреблением алкоголя, более высокими Т- и N-стадиями заболевания, поскольку неблагоприятные факторы у пациентов с ВПЧ-отрицательными ПККР были выражены более отчетливо. В группе ВПЧ-положительной ПККР 30 % больных курили, 15 % — употребляли алкоголь; в группе ВПЧ-отрицательной ПККР эти показатели составили 59 и 41 % соответственно. Низкая стадия опухоли как положительный предиктор отмечалась у 38 % больных с положительным ВПЧ-статусом и у 6 % — с отрицательным ВПЧ-статусом.

Также проанализирована взаимосвязь ВПЧ-статуса и экспрессии маркеров PD-L1 и p53 в изучаемых образцах. После разделения пациентов по ВПЧ-статусу референсное значение экспрессии p16^{INK4a} показало наиболее существенную корреляцию с p53. Сверхэкспрессия p16^{INK4a} сопровождалась положительной

реакцией PD-L1 в 46 % (6/13); ни одного случая положительной экспрессии мутантного типа p53 не наблюдалось. Важно отметить, что дикий тип p53 идентифицирован только в 1 (3 %) случае в сочетании со сверхэкспрессией p16^{INK4a}. На рис. 2 продемонстрированы отсутствие окрашивания и интенсивное диффузное окрашивание белка p16^{INK4a}.

Положительная экспрессия PD-L1 наблюдалась в 57 % (17/30) случаев, из которых в 20 % (6/30) случаев выявлены высокие (PD-L1-H, TPS — 30–49 %, CPS — 30–49) и очень высокие (PD-L1-VH, TPS — ≥ 50 %, CPS — ≥ 50) уровни окрашивания. Хотя положительная экспрессия PD-L1 чаще всего определялась у пациентов с ВПЧ-отрицательным статусом (65 % случаев; 11/17), значительной корреляции между статусом ВПЧ и PD-L1 не обнаружено. Уникальное опухолевое микроокружение ПККР, локализующееся в основном в лимфоидных тканях миндалины и основании языка с высокой плотностью лимфоцитов, может объяснить более сильную экспрессию PD-L1. Согласно данным нашего исследования 71 % (12/17) случаев положи-

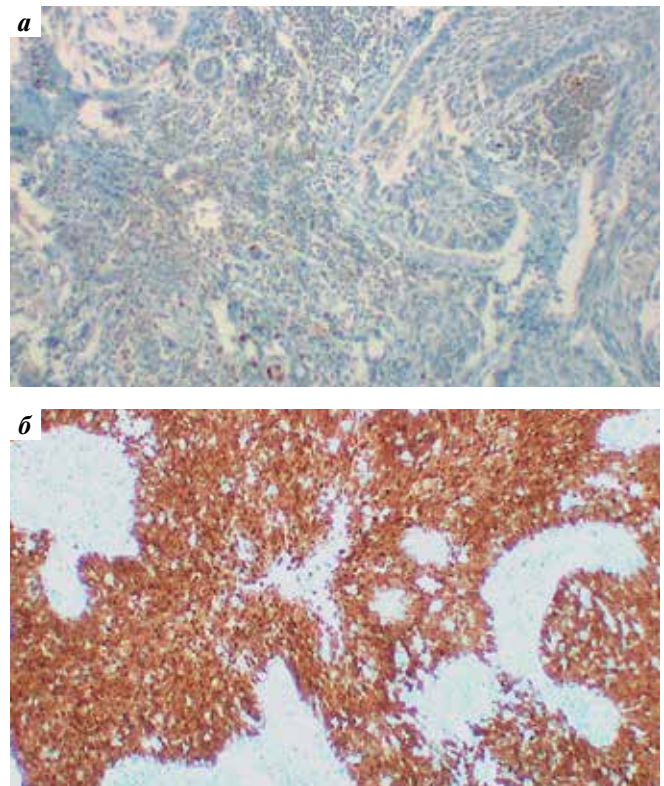


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование: а — отрицательная экспрессия p16^{INK4a} в образцах плоскоклеточной карциномы ротоглотки (ПККР); б — положительная экспрессия p16^{INK4a} в образцах ПККР (диффузная сверхэкспрессия p16^{INK4a}, характерная для ПККР, ассоциированной с вирусом папилломы человека). $\times 20$

Fig. 2. Immunohistochemical analysis: a — negative p16^{INK4a} expression in oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) samples; б — positive p16^{INK4a} expression in OSCC samples (diffuse p16^{INK4a} overexpression characteristic of OSCC associated with human papilloma virus). $\times 20$

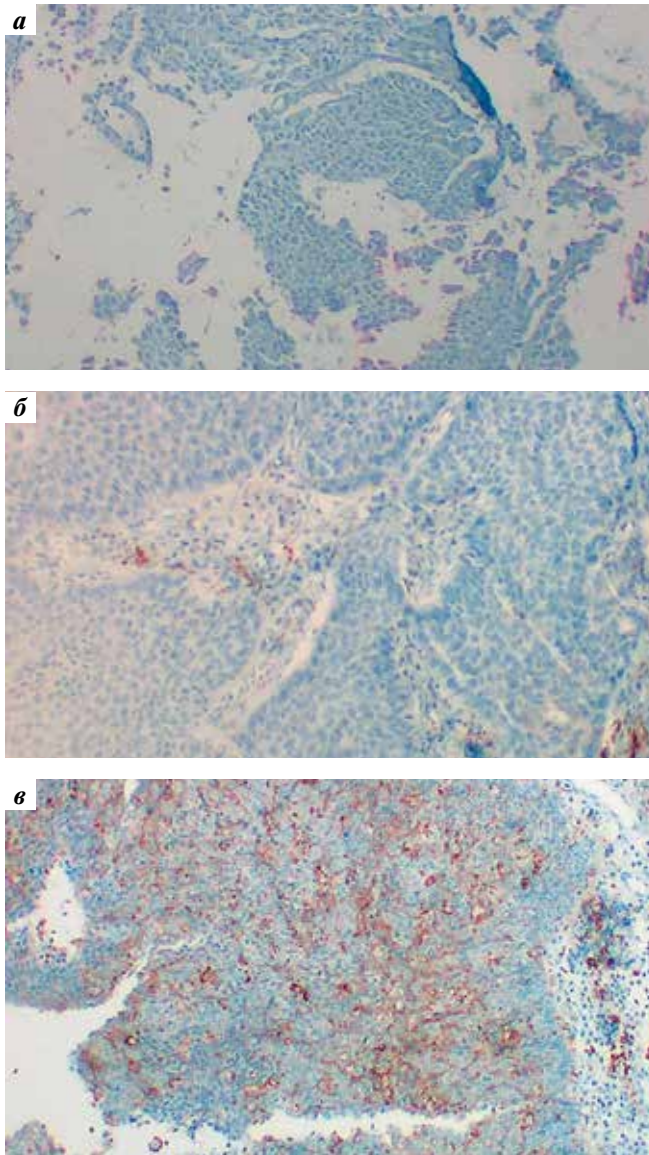


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование. Уровни экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1: а — отсутствие экспрессии (TPS — 0 %, CPS — 0); б — низкий уровень (TPS >1 %, CPS >1), в — высокий уровень (TPS >50 %, CPS >50). ×20

Fig. 3. Immunohistochemical analysis. Levels of expression of programmed death-ligand 1: а — absence of expression (TPS — 0 %, CPS — 0); б — low level (TPS >1 %, CPS >1), в — high level (TPS >50 %, CPS >50). ×20

тельной экспрессии PD-L1 приходится на опухоли миндалин и основания языка, что еще раз подтверждает эту концепцию. На рис. 3 представлены разные уровни экспрессии PD-L1.

В некоторых исследованиях сообщалось, что курение оказывает иммунодепрессивное действие: при ПККР у нынешних курильщиков количество PD-L1-положительных клеток значительно ниже, чем у некурящих [11]. Наше исследование демонстрировало, что 65 % (11/17) пациентов с положительной экспрессией PD-L1 являлись нынешними курильщиками или курили в прош-

лом, а из 13 пациентов с отрицательной экспрессией PD-L1 только 23 (3/13) пациента оказались курильщиками. Причиной высокой частоты экспрессии PD-L1 у курящих больных может быть значительная мутационная нагрузка в опухолевых клетках, которая спровоцирована канцерогенной активностью сигаретного дыма. Высокомутантные опухоли с большей вероятностью продуцируют обильные опухолеспецифические эпитопы (неоантигены) и становятся мишенями для эффекторных Т-лимфоцитов. В таких условиях опухолевые клетки могут индуцировать высокую экспрессию белка PD-L1, чтобы инактивировать эффекторные Т-лимфоциты и создать иммуносупрессивную среду. В ходе ИГХ-исследований положительная экспрессия мутантного типа p53 наблюдалась в 50 % (15/30) образцов, отрицательная — в 47 % (14/30), положительная экспрессия p53 дикого типа — только в 3 % (1/30). Окрашивание p53 мутантного типа выявлено у 88 % (15/17) пациентов с отрицательным ВПЧ-статусом, при этом у 12 % (2/17) пациентов этой группы окрашивание белка p53 отсутствовало. У больных с положительным ВПЧ-статусом не обнаружено случаев положительной экспрессии мутантного типа p53, в 92 % (12/13) случаев выявлена отрицательная экспрессия, и, как указывалось выше, был только 1 случай положительной экспрессии дикого типа p53 (рис. 4).

В 33 % (5/15) образцов с положительным окрашиванием мутантного типа p53 наблюдался низкий уровень экспрессии этого белка (10–29 % окрашенных клеток), в 20 % (3/15) — средний (30–49 % окрашенных клеток), в 27 % (4/15) — высокий (50–79 % окрашенных клеток), в 20 % (3/15) — очень высокий (≥80 % окрашенных клеток).

У пациентов, не получавших предоперационную терапию, экспрессия PD-L1 выявлялась чаще в образцах опухоли из резекционного образца. Высокая и очень высокая экспрессия PD-L1 наблюдалась в 6 (35 %) из 17 образцов с положительной экспрессией этого белка. В 2 случаях обнаружена более сильная экспрессия PD-L1 в периферических тканях опухолевых образцов на границе между инвазивным краем и воспаленной стромой (рис. 5). Дифференциальная экспрессия PD-L1 скорее всего связана с воспалительной микросредой, представленной инфильтрирующими опухоль лимфоцитами. В основном они относятся к Т-клеточной линии и представляют собой наиболее достоверный морфологический признак клеточно-опосредованного противоопухолевого иммунитета. Периферическая область опухоли представляет собой место сопротивления, где происходит физический контакт между опухолью и иммунной системой хозяина. Согласно данным, представленным на рис. 5, в строме фактически отсутствуют PD-L1-положительные клетки, что может свидетельствовать о более высокой экспрессии PD-L1 на мембране опухолевых клеток по сравнению со стромальными клетками. Однако, если проводить ИГХ-анализ

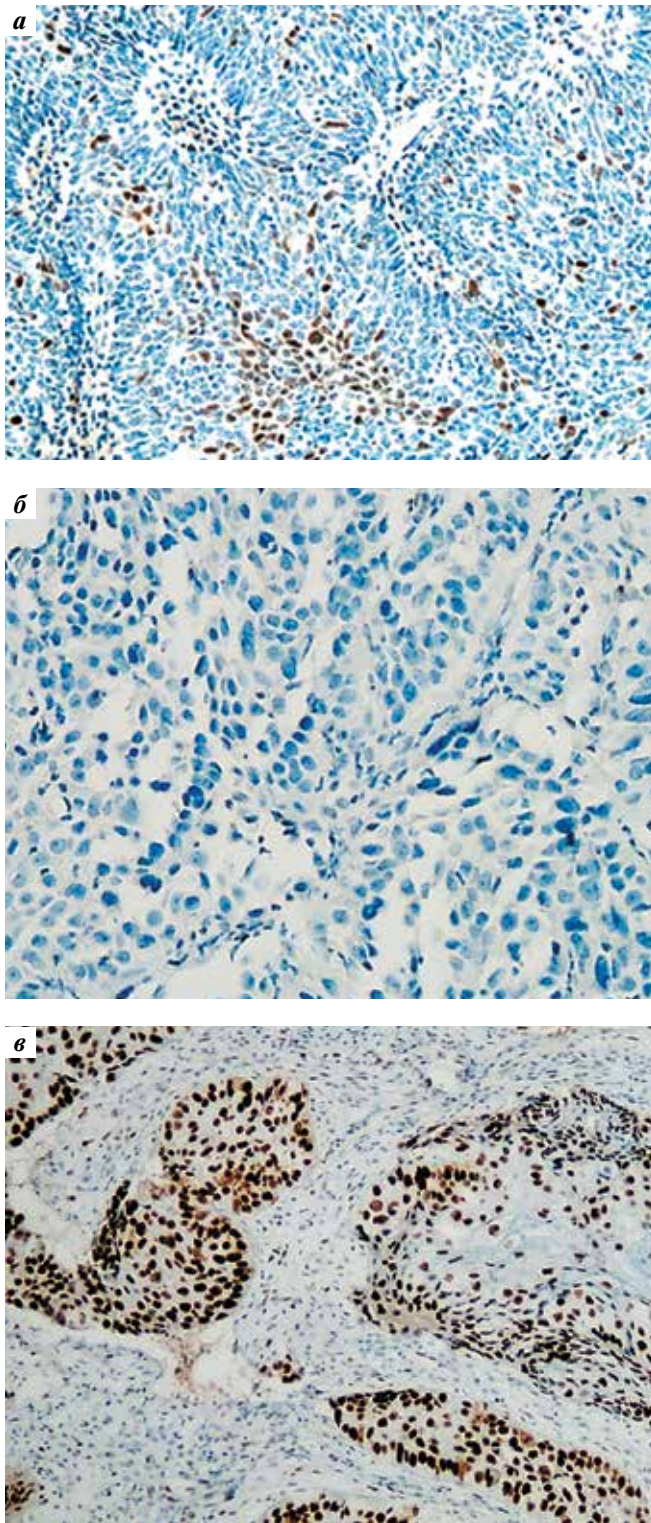


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование: а — дикий тип p53 (ядерное окрашивание в 25 % опухолевых клеток); б — мутантный тип p53 (полное отсутствие окрашивания); в — мутантный тип p53 с высоким уровнем экспрессии (ядерное окрашивание в 70 % опухолевых клеток). $\times 20$

Fig. 4. Immunohistochemical analysis: a — wild type p53 (nuclear staining in 25 % of tumor cells); б — mutant type p53 (complete absence of staining); в — mutant type p53 with high expression level (nuclear staining in 70 % of tumor cells). $\times 20$

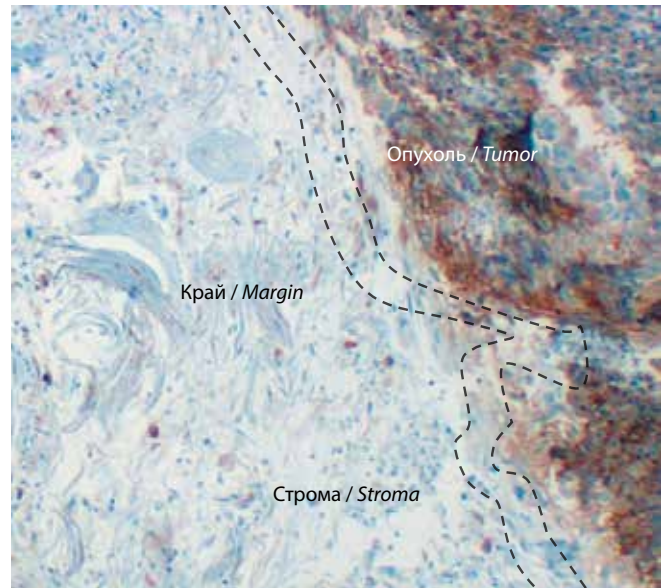


Рис. 5. Дифференциальная экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 в разных участках образца

Fig. 5. Differential programmed death-ligand 1 expression in various parts of a sample

на рецептор программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death 1, PD-1), то в строме тоже можно обнаружить большое количество окрашенных эффекторных Т-клеток.

Обсуждение

Поскольку частота встречаемости ВПЧ-положительной ПККР увеличивается, выявление ВПЧ-статуса является важным методом, позволяющим улучшить клинические исходы. Простота, низкая стоимость, надежность и высокая чувствительность определения экспрессии p16^{INK4a} с помощью ИГХ-исследования дают основание считать его надежным маркером и широко применять на практике. Сверхэкспрессия p16^{INK4a} — один из основных косвенных прогностических маркеров ВПЧ-положительной ПККР (чувствительность — 96,8 %, специфичность — 83,8 %) [12].

Было выявлено, что пациенты с ПККР и положительным ВПЧ-статусом были несколько моложе, чем пациенты с данной патологией и отрицательным ВПЧ-статусом. Однако факторов риска, связанных с образом жизни, у больных ВПЧ-отрицательной ПККР было больше. Кроме того, методы лечения значительно не различались в нашей когорте в зависимости от ВПЧ-статуса, что может быть связано с тем, что трансоральная роботизированная микрохирургия этим пациентам проводится нечасто. Общее состояние больных ВПЧ-отрицательной ПККР по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) оказалось хуже, чем у пациентов с ВПЧ-положительной ПККР. Возможно, это связано с коморбидным статусом (наличием

сопутствующей патологии), возрастом, вредными привычками и характеристиками опухоли (Т- и N-статусом). Однако частота курения в группе больных с отрицательным ВПЧ-статусом была почти 2 раза выше, чем в группе больных с положительным ВПЧ-статусом, что может свидетельствовать о том, что курение является дополнительным немаловажным прогностическим фактором. Сверхэкспрессия p16^{INK4a} тесно связана с отсутствием экспрессии мутантного типа p53, что определяет редкое возникновение aberrаций в гене *T353* у пациентов с положительным ВПЧ-статусом.

В целом ВПЧ-статус (p16^{INK4a}), интенсивность экспрессии PD-L1 и p53, курение, употребления алкоголя, работоспособность (по шкале ECOG), возраст пациентов и стадия опухоли по классификации TNM сильно влияли на результаты, и в соответствии с этими показателями пациенты были стратифицированы. Клинико-демографические (немолекулярные) факторы демонстрируют взаимосвязь с экспрессией молекулярных маркеров, которые различаются в зависимости от статуса ВПЧ. Следовательно, зачастую отбор пациентов для индивидуализации лечения зависит исключительно от экспрессии p16^{INK4a} как показателя вирусной этиологии и улучшения показателей выживаемости [13–15]. Согласно данным нашего исследования стратификация пациентов на основе только одного маркера приводит к риску неправильной оценки прогноза клинического течения ПЖКР, особенно для больных с наличием других факторов высокого риска.

Белок p16^{INK4a} является супрессором опухоли и ингибитором циклинзависимой киназы 4а (INK4а, INhibitors of CDK4). Он кодируется геном ингибитора циклинзависимой киназы 2А (CDKN2A), который расположен на хромосоме 9p21.3 и имеет длину 8,5 т. п. н. [16]. Белок p16^{INK4a} состоит из 156 аминокислот и является негативным регулятором клеточного цикла. Его молекулярная масса равна 16 кДа. В нормальных клетках p16^{INK4a} путем аллостерической регуляции ингибирует циклинзависимую киназу 4/6 (CDK4/6), которая предотвращает фосфорилирование белка ретинобластомы (Rb) и таким образом ингибирует высвобождение фактора E2 (E2F), останавливая клеточный цикл в точке рестрикции G₁/S. В опухолевых клетках, инфицированных ВПЧ, белок E7 локализуется в ядре клетки, где он связывается с Rb и вызывает быструю кальпаин-опосредованную протеасомную деградацию. Таким образом, опосредованное E7 расщепление Rb постоянно активирует ген *E2F*, что приводит к быстрому и постоянному переходу клетки в S-фазу [17, 18]. Расщепление опухолевого супрессора Rb белком E7 и стойкая экспрессия гена *E2F* создают условия для эпигенетического перепрограммирования клетки-хозяина посредством E7-зависимой индукции модификаторов гистонов EZH2 и KDM6B. Ингибирование каталитической субъединицы комплекса белков поликомб-груп-

пы (PcG) модификатора гистонов zest гомолога энхансера 2 (enhancer of zest homolog 2, EZH2) приводит к потере гистон-метилтрансферазной активности этого комплекса, что, в свою очередь, вызывает эпигенетическую стабилизацию экспрессии гена *CDKN2A* (рис. 6) [18].

Лизин(К)-специфическая деметилаза 6В (lysine (K) – specific demethylase 6B, KDM6B) может противодействовать эффекту EZH2 и удалять все 3 моно-, ди- или триметильные группы из метилированных гистонов и таким образом активировать ген *CDKN2A* [18]. Эпигенетическая активация гена *CDKN2A* приводит к гиперэкспрессии белка p16^{INK4a} как в цитоплазме, так и в ядре ВПЧ-инфицированных опухолевых клеток. Такое диффузное накопление белка p16 рассматривается как основной прогностический маркер транскрипционно активной ВПЧ-инфекции. Кроме того, постоянная активация E2F индуцирует экспрессию гена ядерного антигена пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), циклина E, CDK2 и других мышиных генов для прогрессирования клеточного цикла (см. рис. 6).

Результаты нашего исследования показали, что одними из наиболее существенных различий между ВПЧ-положительной и ВПЧ-отрицательной ПЖКР являются изменения функции белка-супрессора опухоли p53. Этот белок участвует в различных клеточных процессах, таких как апоптоз, дифференцировка, контроль клеточного цикла и восстановление повреждений ДНК. Он кодируется геном *TP53*, расположенным на хромосоме 17p13.1, и состоит из 393 аминокислотных остатков и 25 772 пар оснований [19, 20]. Как было сказано выше, потеря функции Rb и E7 и связанное эпигенетическое перепрограммирование клетки приводят к стойкой активации гена *CDKN2A*, который также кодирует белок p14^{ARF}. Сверхэкспрессия p14^{ARF} значительно сильнее ингибирует активность *MDM2* (mouse double minute 2) – главного негативного регулятора p53. В результате стабилизируется хранитель генома p53, который может привести к остановке клеточного цикла и апоптозу. Впрочем, белки E6 ВПЧ высокого канцерогенного риска используют разные механизмы, чтобы препятствовать онкосупрессорной функции p53. Они образуют тримерный комплекс E6-E6AP-p53, который приводит к деградации p53 через убиквитин-зависимую протеолитическую систему. При этом экспрессия дикого типа p53 поддерживается на низком уровне, и инфицированные клетки могут избежать апоптоза и остановки клеточного цикла [21].

В настоящее время признано, что ВПЧ-положительная ПЖКР проявляет более сильный противоопухолевый иммунный ответ по сравнению с ВПЧ-отрицательной ПЖКР. Однако недавние исследования показывают, что регуляция противоопухолевого иммунитета может быть очень сложной, и даже обнаружение персистенции

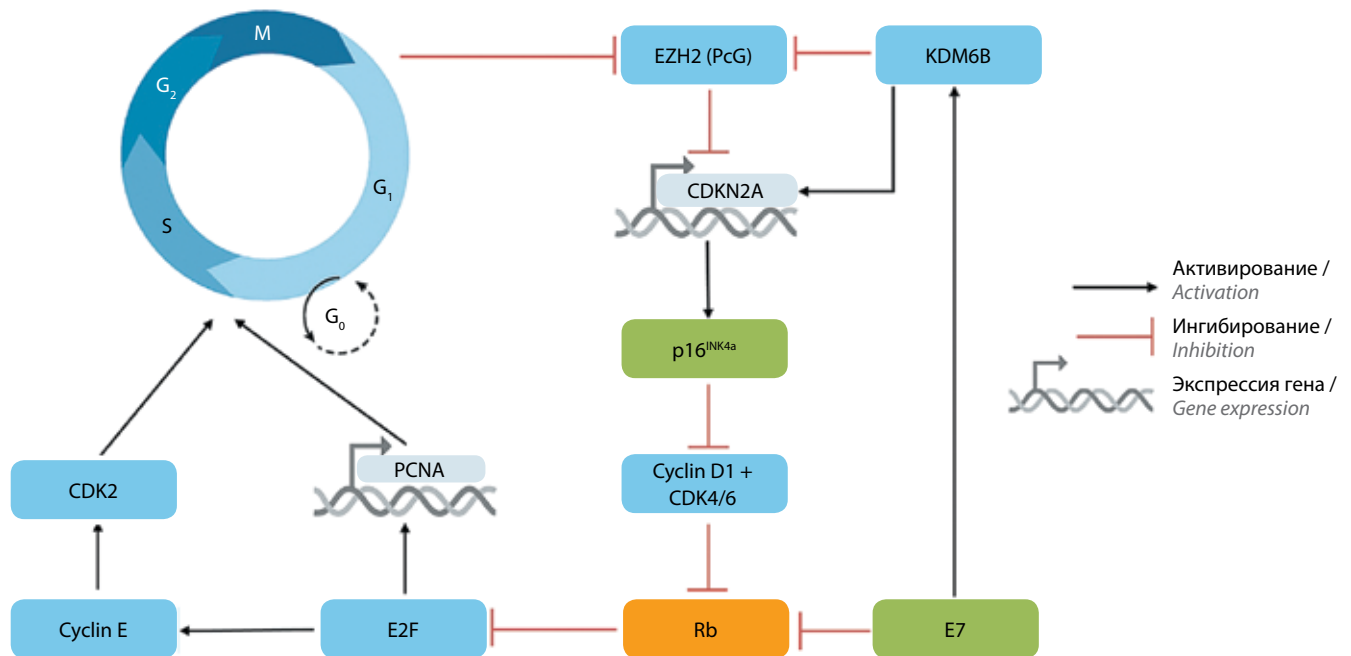


Рис. 6. Нарушение клеточного цикла онкогеном E7 вируса папилломы человека. G_0 — фаза покоя клеточного цикла; M — фаза митоза (интерфаза); G_1 — пресинтетическая фаза; G_2 — постсинтетическая фаза; S — синтетическая фаза

Fig. 6. Cell cycle disruption by human papilloma virus E7 oncoprotein. G_0 — cell cycle resting phase; M — mitosis (interphase); G_1 — presynthetic phase; G_2 — post synthetic phase; S — synthetic phase

ВПЧ у больных не позволяет в полной мере выявить неизвестные аспекты [22]. Это подтверждается наличием положительной экспрессии PD-L1 в нашем исследовании в группе пациентов как с ВПЧ-положительной (46 % случаев), так и с ВПЧ-отрицательной (65 % случаев) ПЖО. Определение экспрессии белков PD-L1 и p53 и оценка их связи с другими факторами могут помочь раскрыть уникальные клиническо-молекулярные характеристики ПЖО. Один из основных способов иммуносупрессии микроокружения опухоли заключается в том, что взаимодействие PD-L1 на мембране ВПЧ-инфицированных опухолевых клеток с PD-1, экспрессируемым на мембранах эффекторных Т-клеток, вызывает инактивацию клеточно-опосредованного адаптивного иммунного ответа против опухолей [22]. PD-L1 играет большую роль в уклонении опухолевых клеток от иммунитета и может ускорять их рост, способствуя апоптозу среди антигенспецифических и опухоль-реактивных Т-клеток [23–25]. Моноклональные антитела, нацеленные либо на PD-1, либо на PD-L1, восстанавливают противоопухолевый адаптивный иммунитет и составляют основу современной иммунотерапии рака в клинической онкологии [26–28].

Сверхэкспрессия p16^{INK4a} в настоящее время рассматривается в качестве критерия принятия решения о деэскалации лечения при ВПЧ-положительной ПЖО, что снизит острую и долгосрочную токсичность, связанную с терапией. Однако с учетом умеренной

специфичности p16^{INK4a} в некоторых дискордантных случаях при ПЖО, вызванной ВПЧ, были высказаны опасения, что пациенты могут получать недостаточное лечение. В нашем исследовании определение экспрессии p16^{INK4a} с помощью ИГХ-анализа было единственным релевантным тестом для установления статуса ВПЧ у пациентов с ПЖО. Для увеличения его прогностической значимости мы использовали дополнительные молекулярные маркеры — PD-L1 и p53, которые играют большую роль в канцерогенной трансформации и дальнейшем прогрессировании ПЖО.

Заключение

Таким образом, выявление надежных прогностических маркеров помогает раскрыть уникальные клинико-молекулярные особенности заболевания и принять правильное решение в сложных клинических обстоятельствах. Помимо определения статуса ВПЧ изучение экспрессии молекулярных маркеров PD-L1 и p53, а также клинико-демографических характеристик и факторов риска, связанных с образом жизни, повысит точность стратификации риска у больных ПЖО. Выявление особенностей молекулярного профиля ПЖО поможет лучше понять биологические особенности опухоли и усовершенствовать профилактику и лечение данной патологии. Данные, полученные в ходе исследования, позволяют выявить частоту обнаружения ВПЧ при ПЖО, что отражает зависимость

фенотипического проявления опухоли от молекулярных особенностей вируса. Созданная нами панель, состоящая из 3 молекулярных маркеров (p16^{INK4a}, PD-L1 и p53), возможно, откроет новые горизонты в точном прогнозировании, стратификации риска и понимании молекулярных особенностей ПЧКР. Это, в свою очередь, поможет клиницистам в принятии решения об индивидуальном лечении, в том числе о деэскалации

терапии для оптимизации результатов. Хотя пациенты с ВПЧ-положительной ПЧКР имеют лучший прогноз по сравнению с пациентами с ВПЧ-отрицательной ПЧКР, у значительной части больных все еще возникают рецидивы после первоначального лечения и существует риск смертельного исхода. Для подтверждения этих выводов необходимы дополнительные более крупные исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- De Martel C., Georges D., Bray F. et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health* 2020;8(2):e180–90. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7
- Bravo I.G., Féllez-Sánchez M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Pub Health* 2015;1:32–51. DOI: 10.1093/emph/eov003
- Chaturvedi A.K., Engels E.A., Pfeiffer R.M. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011;29(32):4294–301. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.4596
- Gillison M.L., Chaturvedi A.K., Anderson W. F., Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2015;33(29):3235–42. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.6995
- Gelwan E., Malm I.J., Khararjian A. et al. Nonuniform distribution of high-risk human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the oropharynx: rethinking the anatomic boundaries of oral and oropharyngeal carcinoma from an oncologic HPV perspective. *Am J Surg Pathol* 2017;41(12):1722–8. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000929
- Castellsagué X., Alemany L., Quer M. et al. ICO international HPV in Head and Neck Cancer Study Group. HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(6):djv403. DOI: 10.1093/jnci/djv403
- Carlander A.F., Jakobsen K.K., Bendtsen S.K. et al. A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide. *Viruses* 2021;13:1326. DOI: 10.3390/v13071326
- Berman T.A., Schiller J.T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: one cause, two diseases. *Cancer* 2017;123(12):2219–29. DOI: 10.1002/cncr.30588
- Sinha P., Karadaghy O.A., Doering M.M. et al. Survival for HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma with surgical *versus* non-surgical treatment approach: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018;86:121–31. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.018
- Lewis J.S., Beadle B., Bishop J.A. et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(5):559–97. DOI: 10.5858/arpa.2017-0286-CP
- De la Iglesia J.V., Slebos R.J.C., Martin-Gomez L. et al. Effects of tobacco smoking on the tumor immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2020;26(6):1474–85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1769
- Budu V.A., Decusear T., Balica N.C. et al. The role of HPV infection in oropharyngeal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2019;60(3):769–73.
- Dogan S., Xu B., Sumit Middha S. et al. Identification of prognostic molecular biomarkers in 157 HPV-positive and HPV-negative squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Int J Cancer* 2019;145(11):3152–62.
- Wagner S., Prigge E.S., Wuerdemann N. et al. Evaluation of p16^{INK4a} expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. *Br J Cancer* 2020;123(7):1114–22. DOI: 10.1038/s41416-020-0964-x
- Пхешхова Б.Г., Мудунов А.М., Азизян Р.И. и др. Оценка распространенности ВПЧ-положительного плоскоклеточного рака ротоглотки на примере отдельной выборки в Российской Федерации. *Опухоли головы и шеи* 2022;12(1):72–8. DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-1-72-78
- Рхешхова Б.Г., Мудунов А.М., Азизян Р.И. et al. Estimation of the prevalence of Hpv-positive squamous cell carcinoma of the oropharynx on the example of a separate sample in the Russian federation. *Opukholi golovy i shei = Head and Neck Tumors* 2022;12(1):72–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-1-72-78
- Serra S., Chetty R. p16. *J Clin Pathol* 2018;71(10):853–8. DOI: 10.1136/jclinpath-2018-205216
- Kono T., Laimins L. Genomic instability and DNA damage repair pathways induced by human papillomaviruses. *Viruses* 2021;13(9):1821. DOI: 10.3390/v13091821
- Lechner M., Liu J., Masterson L., Fenton T.R. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;19(5):306–27. DOI: 10.1038/s41571-022-00603-7
- Hu J., Cao J., Topatana W., Juengpanich S. et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol* 2021;14(1):157. DOI: 10.1186/s13045-021-01169-0
- Caponio V.C.A., Troiano G., Adipietro I. et al. Computational analysis of TP53 mutational landscape unveils key prognostic signatures and distinct pathobiological pathways in head and neck squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2020;123(8):1302–14. DOI: 10.1038/s41416-020-0984-6
- Mittal S., Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev* 2017;772:23–35. DOI: 10.1016/j.mrrrev.2016.08.001
- Munari E., Mariotti F.R., Quatrini L. et al. PD-1/PD-L1 in cancer: pathophysiological, diagnostic and therapeutic aspects. *Int J Mol Sci* 2021;22:5123. DOI: 10.3390/ijms22105123
- Salmaninejad A., Khoramshahi V., Azani A. et al. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics* 2017;70(2):73–86. DOI: 10.1007/s00251-017-1015-5
- Steinbach A., Riemer A.B. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: an update. *Int J Cancer* 2018;142(2):224–9. DOI: 10.1002/ijc.31027

25. Paolino G., Pantanowitz L., Barresi V. et al. PD-L1 evaluation in head and neck squamous cell carcinoma: Insights regarding specimens, heterogeneity and therapy. *Pathol Res Pract* 2021;226:153605. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153605
26. Yang W.F., Wong M.C.M., Thomson P.J. et al. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018;86:81–90. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.016
27. Solomon B., Young R.J., Bressel M. et al. Prognostic significance of PD-L1(+) and CD8(+) immune cells in HPV(+) oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2018;6(3):295–304. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0299
28. Lyford-Pike S., Peng S., Young G.D. et al. Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013;73(6):1733–41. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2384

Вклад авторов

Д.Ш. Полатова, А.Ю. Мадаминов: разработка концепции и дизайна исследования, руководство исследовательской группой, написание текста статьи, редактирование;

А.В. Савкин, А.И. Нуржабов, Н.К. Асамединов, Д.А. Ибрагимова: анализ полученных данных, проведение статистического анализа, написание чернового варианта статьи;

Р.Р. Давлетов, С.К. Насиров: проведение иммуногистохимического анализа и микроскопии.

Authors' contribution

D.Sh. Polatova, A.Yu. Madaminov: development of the concept and design of the study, leadership of the research group, article writing, editing;

A.V. Savkin, A.I. Nurzhabov, N.K. Asamedinov, D.A. Ibragimova: analysis of the data obtained, statistical analysis, writing a draft version of the article;

R.R. Davletov, S.K. Nasirov: conducting immunohistochemical analysis and microscopy.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.Ш. Полатова / D.Sh. Polatova: <https://orcid.org/0000-0001-8128-2553>

А.Ю. Мадаминов / A.Yu. Madaminov: <https://orcid.org/0000-0003-0064-3746>

А.В. Савкин / A.V. Savkin: <https://orcid.org/0000-0002-3416-5837>

А.И. Нуржабов / A.I. Nurzhabov: <https://orcid.org/0000-0002-8026-9944>

Н.К. Асамединов / N.K. Asamedinov: <https://orcid.org/0000-0001-5225-1539>

Д.А. Ибрагимова / D.A. Ibragimova: <https://orcid.org/0009-0000-4488-7270>

Р.Р. Давлетов / R.R. Davletov: <https://orcid.org/0000-0002-9191-4128>

С.К. Насиров / S.K. Nasirov: <https://orcid.org/0009-0005-1069-4645>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 07.06.2022. **Принята к публикации:** 12.12.2022.

Article submitted: 07.06.2022. **Accepted for publication:** 12.12.2022.