

**О.В.Пославська**

Дніпропетровська державна медична академія

**Ключові слова:** плоскоклітинний рак орофарингеальної області, напівкількісний аналіз цифрових зображень, матричні металопротеїнази, маркери неоваскулогенезу, маркери міжклітинної адгезії, онкопротеїни, проліферативна активність.

Надійшла: 20.07.2011

Прийнята: 22.08.2011

УДК: 616.31+616.22-006-575.21

## **ІМУНОМОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ПЛОСКОКЛІТИННИХ РАКІВ ОРОФАРІНГЕАЛЬНОЇ ОБЛАСТІ**

*Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи „Індивідуалізація лікування злоякісних пухлин з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу та маркерів хіміогормонорезистентності” (номер державної реєстрації 0101U001002).*

**Резюме.** Статтю присвячено дослідженню експресії імуногістохімічних маркерів в плоскоклітинних раках орофарингеальної області для прогнозування клінічного перебігу. Проведено аналіз експресії маркерів неоваскулогенезу VEGF і CD34, матричних металопротеїназ 1 і 9, онкопротеїнів p21, p16, цикліну D1, маркерів міжклітинної адгезії E-кадгерину і β-катеніну та проліферативної активності Ki-67 в залежності від клініко-морфологічних характеристик пухлин (первинної локалізації, ступеня диференціювання, наявності метастазів в лімфатичні вузли шиї) та відповіді на хіміотерапію. Визначені «несприятливі» імунофенотипи раків орофарингеальної області з високим ризиком метастазування та ймовірною нечутливістю до хіміотерапії, що дозволяє більш диференційовано підходити до тактики лікування пацієнтів з плоскоклітинними раками орофарингеальної області.

**Морфологія.** – 2011. – Т. V, № 3. – С. 85-91.

© О. В. Пославська, 2011

### **Poslavskaya A.V. Immunomorphological aspects of oropharynx squamous cell carcinoma prognosis.**

**Summary.** The article investigates the expression of immunohistochemical markers in squamous oropharyngeal cancers to predict the clinical course. The analysis of marker expression of VEGF and CD34, matrix metalloproteinases 1 and 9, oncoprotein p21, p16, cyclin D1, cell adhesion markers E-cadherin and β-catenin and proliferative activity of Ki-67 depending on the clinical and morphological characteristics of the tumor (primary localization, degree of differentiation, presence of metastases in the lymph nodes in the neck) and responses to chemotherapy. Defined "unfavorable" immunophenotype oropharyngeal cancers with a high risk of metastasis and the likely insensitivity to chemotherapy, which allows a more differentiated approach to the tactics of treatment of patients with squamous cell carcinoma of oropharynx.

**Keywords:** squamous cell carcinoma of oropharynx, semi-quantitative analysis of digital images, matrix metalloproteinases, neovascularity markers, intercellular adhesion markers, oncoproteins, proliferative activity.

### **Вступ**

Серед злоякісних новоутворень голови та шиї раки орофарингеальної області (ОФО) представлені досить гетерогенною групою за місцем первинного ураження: пухлини основи язика (задня 1/3), мигдаликів, м'якого піднебіння, язичку, задньої та бокових (латеральних) стінок глотки (Гладилина І.А. і соавт., 2003). Але за гістологічною будовою вони досить мономорфні: більше 90% неоплазій ротоглотки - плоскоклітинні раки (ПР), що характеризуються раннім розвитком місцевих рецидивів та метастазуванням в лімфатичні вузли шиї (Cardesa A., Slootweg P.J., 2006; Choi S., Myers J.N., 2008). Особливості васкуляризації цієї ділянки обмежують ЛОР-онкологів щодо оперативної активності і пацієнтам пропонують комбінований метод лікування із курсів поліхіміо- та променевої терапії, з пріоритетом першого компоненту. Ось чому резуль-

тат лікування напряму залежить від чутливості ПР до хіміотерапії, що в свою чергу обумовлено біологічними особливостями самої пухлини. Особливість процесів канцерогенезу в орофарингеальній області порівняно з ротовою порожниною, обумовлює і різний прогноз для пацієнтів, що потребує особливої уваги. Наприклад, в 2010 році по Україні смертність серед чоловіків від злоякісних новоутворень (ЗН) глотки наздогнала та перевищила рівень ЗН ротової порожнини - 6,86 ‰ і 6,76 ‰, відповідно, а ще в 2004 ситуація була інша (6 ‰ і 7,3 ‰). І це незважаючи на те, що спеціальним лікуванням охоплена однакова кількість чоловіків з ЗП глотки та ротової порожнини (79,2% та 79% відповідно), а показник морфологічної верифікації діагнозу за оперативною інформацією 2010 року для ЗН глотки добіг аж 95,9%, що значно перевищує середній показник для ЗН по Україні (82,5%). Захво-

рюваність і смертність серед жінок від ЗН глотки також стабільно підвищується, тому що останнім часом, завдяки тотальному палінню, підвищенню вживання алкоголю та поширеності серед населення ВПЛ високого онкогенного ризику, ця проблема стала актуальна для різних вікових груп чоловіків та жінок всього світу. Певні особливості ПР ОФО потребують розробки панелі прогностично-передбачувальних маркерів для підвищення якості діагностики і ефективності лікування, що повинно знизити загальну смертність на Україні.

**Мета дослідження** – вдосконалити прогностично-передбачувальні критерії перебігу плоскоклітинних раків орофарингеальної області на підставі вивчення показників експресії маркерів молекулярно-біологічних властивостей клітин.

#### **Матеріали та методи**

Ретроспективно був досліджений матеріал 72 пацієнтів (69 чоловік та 3 жінок), III клінічної стадії ( $T_3N_{0-2}M_0$ ), які проходили лікування в ЛОР-онкологічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І.Мечникова в період з 2000 по 2008р.р. Вік в групі коливався в діапазоні 39 – 67 років, середній вік складав  $53,92 \pm 1,15$  роки. За гістологічною будовою всі спостереження були представлені плоскоклітинними раками високого ( $n=26$ ), середнього ( $n=38$ ) та низького ( $n=8$ ) ступеню диференціювання. Із них 42 випадку раку мигдаликів з ураженням передньої або задньої дужки, 23 випадку раку стінок глотки і 7 випадків раку коріння язика. Також весь матеріал був розподілений на дві групи в залежності від ураження лімфатичних вузлів ший: ( $T_3N_0M_0$ ) пацієнти без метастазів в регіональні лімфатичні вузли ( $n = 34$ ) та ( $T_3N_{1-2}M_0$ ) пацієнти з виявленими метастазами в лімфатичні вузли ший ( $n = 38$ ).

Всі пацієнти отримали однакове комбіноване лікування у вигляді декількох курсів внутріартеральної селективної хіміотерапії по схемі РВМФ та курсу ДГТ. З метою стандартизації результатів лікування за критерій оцінювання був обраний ступінь регресу пухлини у відсотках лише після першого курсу поліхіміотерапії. Негативною відповіддю вважався ступінь регресу пухлини ОФО 0-50%, позитивною - 51-100%. За цим критерієм пацієнтів було розподілено на 2 групи: з позитивною відповіддю на хіміотерапію – 40 спостережень, з негативною відповіддю – 32 спостереження.

Для проведення імуногістохімічного дослідження використовувались формалін-фіксовані і парафін-залиті примірники первинного біопсійного матеріалу плоскоклітинних раків ротоглотки, що були отримані до лікування (для виключення впливу на результати дослідження лікувального патоморфозу). В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до p16, p21<sup>WAF1</sup>, Ki-67, Е-кадгерину, β-катеніну, VEGF,

CD34, Cyclin D1, поліклональні антитіла до MMP-1, MMP-9. Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркеру з подальшим використанням надчутливої системи візуалізації EnVision (DakoCytomation). Ідентифікація реакції проводилася за допомогою хромогену DAB.

Для оцінки імуногістохімічного забарвлення використовувався напівкількісний аналіз цифрових зображень (Semi quantitative Digital Image Analysis) за методом описаним в літературних джерелах (Проценко С.А., 2007; Matos L.L., 2006). Імуногістохімічно забарвлені тканинні зрізи були оглянуті під збільшенням  $\times 200$  світлового мікроскопу Leica DMLS. За допомогою цифровою фотокамери Canon EOS D30 мікроскопічні данні були зафіксовані, як цифрові зображення TIFF формату. В кожному зрізі раку 10 репрезентативних ділянок, що мали 100 пухлинних клітин, були проаналізовані з використанням медичної програми для обробки цифрових зображень ImageJ з плагінами Colour Deconvolution та Cell Counter (розробка ініційована National Institute of Mental Health, Maryland, USA). Плагін Cell Counter дозволяє відокремити 10 полів по 100 (або 1000) пухлинних клітин різних ділянок ПР та підрахувати кількість забарвлених ядер пухлинних клітин для розрахунку відсотків при аналізі маркерів з ядерним забарвленням. Плагін Colour Deconvolution має вбудовану схему для аналізу забарвлень «Гемотоксилин + ДАБ», розділяє зображення на синій та коричневий колір, тобто відокремлює ДАБ від гемотоксилину. Далі за вбудованою гистограмою, в діапазоні від 0 (біле) до 255 (чорне), отримували рівні інтенсивності забарвлення. З використанням цих плагінів інтенсивність забарвлення цитоплазматичних (MMP1, MMP9, VEGF), мембранних (E-cadgerin, β-катенін) та ядерних реакцій (p16, p21, Ki-67, циклін D1) піддавалася кількісному оцінюванню в діапазоні від 0 (біле) до 255 (чорне) умовних балів. Для знаходження фонового рівня забарвлення, 100 нормальних епітеліальних клітин було використано як внутрішній контроль в тому самому зразку. Інтенсивність експресії в клітинах пухлини було стандартизовано відніманням або порівнянням (для кожного маркеру індивідуально) значень рівня забарвлення внутрішнього контролю і середнього рівня інтенсивності забарвлення 10 пухлинних полів.

Статистична обробка даних проводилася в програмі SPSS Statistica 17.0. Для встановлення статистично значущих зв'язків між клініко-морфологічними ознаками та експресією маркерів використовувався точний тест Фішера. Значущим вважався зв'язок при  $p < 0,05$ .

#### **Результати та їх обговорення**

В дослідженні для 72 примірників ПР ОФО був проаналізований перший етап метастатичного каскаду – дисоціація малігнізованих клітин із первинного вузла - шляхом визначення відсотку

клітин з втратою міжклітинної адгезії за допомогою моноклональних антитіл до Е-кадгерину та  $\beta$ -катеніну. Достовірною вважалася лише мембранна та субмембранна реакції з маркерами Е-кадгерину та  $\beta$ -катеніну, де їх виявляють в нормальному епітелії. Всі варіанти експресії Е-кадгерину та  $\beta$ -катеніну в ПР ОФО були розподілені на дві групи:

- ПР ОФО зі збереженням міжклітинної адгезії ( $n_{E-кад(+)} = 29$ ,  $n_{\beta-кат(+)} = 41$ ), куди ввійшли випадки, що більше ніж в 75% пухлинних клітин показали «типову» модель сильного мембранного забарвлення, інтенсивність якого була однаковою з сусіднім нормальним багатошаровим епітелієм (табл. 1).

- ПР ОФО з втрачанням міжклітинної адгезії ( $n_{E-кад(-)} = 43$ ,  $n_{\beta-кат(-)} = 31$ ), що об'єднали випадки, з «типовою» моделлю сильного мембранного забарвлення  $\leq 75\%$  пухлинних клітин, випадки з «нетиповим» забарвленням (слабка, неоднорідна, негативна реакція) та ПР з підвищенням експресії Е-кадгерину або  $\beta$ -катеніну порівняно з внутрішнім контролем, внаслідок мутації кадгеринових та катенінових рецепторів (табл. 1). При дослідженні експресії маркерів міжклітинної адгезії Е-кадгерину та  $\beta$ -катеніну було встановлено, що зі зниженням ступеня диференціювання в ПР ОФО відбувається підвищення відносної кількості випадків зі втрачанням міжклітинної адгезії Е-кадгерину та  $\beta$ -катеніну, але статистично достовірний зв'язок знайдено було лише для  $\beta$ -катеніну ( $p=0,004$ ,  $r=0,34$ ). Також ймовірність виникнення метастазів в регіональні лімфатичні вузли прямо пропорційно залежала від зменшення експресії обох маркерів, для Е-кадгерину ( $p<0,001$ ,  $r=0,471$ ), для  $\beta$ -катеніну ( $p=0,02$ ,  $r=0,373$ ). До того ж за експресією  $\beta$ -катеніну був виявлений більш агресивний перебіг ПР коріння язика порівняно ПР мигдаликів і стінок глотки первинною локалізацією ( $p=0,004$ ,  $r=0,34$ ). А для Е-кадгерину була встановлена пряма кореляція між зниженням міжклітинної адгезії та негативною відповіддю на хіміотерапію ( $p=0,019$ ,  $r=0,279$ ).

В ході подальшої інвазії пухлинні клітини повинні забезпечити собі простір серед інтерстиціальної тканини. В ПР ОФО був досліджений рівень експресії ензимів з сімейства матричних металопротейназ (ММП) інтерстиціальної колагенази I (ММП-1) та желатинази В/колагенази IV (ММП-9), що забезпечують протеолітичну активність в ПР початкових відділів аеродигістивного тракту (Marur S., Forastiere A.A., 2008). Достовірною вважалася лише цитоплазматична реакція, яка оцінювалася за шкалою інтенсивності забарвлення в умовних балах: негативна – 0-20, слабка – 21-50, помірна – 51-100, висока – більше 100 умовних балів, у відповідності з рекомендаціями інших дослідників (Katayama A. et al., 2004). Таким чином всі варіанти експресії ММП-1 та

ММП-9 в ПР ОФО були розподілені на дві групи:

- ПР ОФО з низькою протеолітичною активністю ( $n_{ММП-1(-)} = 52$ ,  $n_{ММП-9(-)} = 21$ ), куди ввійшли випадки з негативною та слабкою реакцією (табл. 1).

- ПР ОФО з високою протеолітичною активністю ( $n_{ММП-1(+)} = 20$ ,  $n_{ММП-9(+)} = 51$ ), що об'єднали випадки з помірною та високою експресією маркерів (табл. 1).

При дослідженні розподілу значень експресії, для ММП-1 виявлений тільки зворотній зв'язок між підвищенням протеолітичної активності і позитивною відповіддю на ХТ ( $p=0,023$ ,  $r=-0,238$ ), а для ММП-9 встановлено прямий зв'язок підвищення експресії ММП-9 з наявністю метастазів в лімфатичні вузли ший ( $p=0,035$ ,  $r=0,25$ ) і зворотній зв'язок з позитивною відповіддю на ХТ ( $p=0,006$ ,  $r=-0,328$ ).

Активність міграції малігнізованих клітин через утворені «канали деградації» і розмноження в зоні інвазії обумовлені швидкістю проліферації. Аналіз проліферативної активності зразків ПР ОФО був проведений за допомогою моноклонального антитіла Ki-67, що ідентифікує ядерний антиген (протеїновий комплекс молекулярною масою 345-395kd), присутній в ядрах проліферуючих клітин. Індекс проліферації (ІП) обчислювався, як відсоток клітин з специфічною інтрануклеарною реакцією в 1000 морфологічно ідентифікованих пухлинних ядрах. Після дослідження 10 випадково обраних полів зору, загальний ІП в зразку ПР ОФО розраховувався як середнє арифметичне за результатами всіх досліджених ділянок. Проліферативна активність оцінювалася як низька при ІП у діапазоні 0-30% ( $n = 17$ ), висока - більш ніж 30% ( $n = 55$ ). ІП в ПР ОФО коливався від 14 до 86% і, в середньому, склав  $47,9 \pm 3,24\%$ . Порівняльний аналіз залежності ІП від клініко-морфологічних характеристик ПР ОФО відображено в табл. 1. ІП в ПР ОФО коливався від 14 до 86% і, в середньому, склав  $47,9 \pm 3,24\%$ . Визначені статистично значущі зв'язки між підвищенням експресії Ki-67 і зниженням ступеня диференціювання ПР ОФО ( $p=0,004$ ,  $r=0,345$ ), виявленням регіональних метастазів ( $p=0,006$ ,  $r=0,326$ ) та негативною відповіддю на ХТ ( $p=0,012$ ,  $r=0,3$ ). Це говорить про переконливе прогностично-передбачувальне значення Ki-67 для ПР ОФО.

Доведено, що як первинний так і метастатичний пухлинний осередок обходиться без васкуляризації, доки не набуває об'єму 1-2 мм<sup>3</sup> (Аничков Н.М., 2006). Сьогодні одним із підходів до аналізу активності ангиогенезу в пухлинах є визначення рівня експресії генів родини VEGF або їх рецепторів та оцінка щільності мікросудин (ЩМС).

При дослідженні імуногістохімічної реакції з маркером VEGF інтенсивність цитоплазматичного забарвлення в ПР ОФО оцінювалася шля-

хом порівняння з інтенсивністю забарвлення нормального епітелію за 5 категоріями: 0 - негативна реакція (жодної клітини), 1 - слабка або фокальне (розсіяне) забарвлення, 2 - помірно виражене забарвлення (еквівалентно нормальному

епітелію), 3 - сильне (більша кількість інтенсивно забарвлених клітин) і 4 - інтенсивне забарвлення (практично всі клітини епітелію були забарвленні значно сильніше нормального епітелію).

Таблиця 1  
Розподіл значень експресії маркерів E-кадгерину,  $\beta$ -катеніну, ММП-1, ММП-9 та Ki-67 в залежності від клініко-морфологічних характеристик ПР ОФО

Клініко-морфологічні характеристики ПР	Всього n = 72	E-кад (-)	$\beta$ -кат (-)		ММП-1 (+)		ММП-9 (+)		Ki-67 > 30%	P	
			p	p	p	p					
Стать			0,804		0,127		0,276		0,872	-	0,688
Чоловіки	69	41		31		20		49		53	
Жінки	3	2		0		0		2		2	
Первинна локалізація			0,079		<b>0,004</b>		0,641		0,936	-	0,913
Мигдалики	42	22		13		11		31		32	
Глотка	23	15		12		8		14		18	
Коріння язика	7	6		6		2		6		5	
Ступінь диференціювання			0,162		<b>0,004</b>		0,683		0,920	0	<b>0,004</b>
Високий	26	14		6		20		19		15	
Помірний	38	22		19		6		26		32	
Низький	8	7		6		4		6		8	
Метастази в л/в шії			<b>0,000</b>		<b>0,002</b>		0,547		<b>0,035</b>	+	<b>0,006</b>
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	34	12		8		8		20		21	
T <sub>3</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	38	31		23		12		31		34	
Відповідь на ХТ			<b>0,019</b>		0,561		<b>0,023</b>		<b>0,006</b>	-	<b>0,012</b>
Позитивна	40	19		16		12		23		26	
Негативна	32	24		15		8		28		29	

Примітка: статистично достовірним зв'язок вважався при  $p < 0,05$ .

Подали всі варіанти експресії VEGF в ПР ОФО були розподілені на дві групи:

- ПР ОФО з низькою ангіогенною активністю ( $p_{VEGF(-)} = 25$ ), куди ввійшли випадки з інтенсивністю забарвлення 0 – 2 (табл. 2).
- ПР ОФО з високою ангіогенною активністю ( $p_{VEGF(+)} = 47$ ), що об'єднали категорії забарвлення 3 і 4 (табл. 2).

Виявлено прямі кореляційні зв'язки між підвищенням експресії VEGF і регіональним метастазуванням ( $p=0,011$ ,  $r=0,304$ ) та позитивною відповіддю на хіміотерапію ( $p=0,004$ ,  $r=0,346$ ). Висока васкуляризація відіграє важливу роль у зв'язку з селективним внутрішньоартеріальним доступом введення цитостатиків. Для з'ясування щільності судин у зразках ПР ОФО підраховували кількість судин, окрашених CD34, у 10 полях зору мікроскопу (розмір одного поля зору обмежувався вимірювальною квадратною сіткою із стороною 0,79мм) з наступним визначенням їх числа на  $1\text{мм}^2$  за формулою:

ЩМС =  $n \cdot 1\text{мм}^2$  :  $0,625\text{мм}^2$ , де n — середня кількість судин на одне поле зору;  $0,625\text{мм}^2$  —

площа одного поля зору.

Значення ЩМС коливалися від 12 до 94 судин на  $1\text{мм}^2$ , що, в середньому, склало  $54,6 \pm 2,9$  судин/ $\text{мм}^2$  (табл.2). При аналізі прогностичного значення CD34 в ПР ОФО з'ясувалося, що показники ЩМС відрізняється в різних первинних локалізаціях, що знайшло відображення в показниках статистичної значущості зв'язку ( $p=0,005$ ,  $r=0,331$ ), також знайдено прямий кореляційний зв'язок між високою ЩМС і метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли ( $p=0,001$ ,  $r=0,389$ ). В групі хворих з негативною відповіддю на ХТ щільність судин у ПР ОФО була достовірно нижчою ( $p=0,029$ ,  $r=-0,259$ ), порівняно з такою у хворих, що відповіли позитивно.

Визначення циклін D1, p16 і p21 – позитивного статусу в ПР ОФО проводився на підставі розрахунку відсотку клітин з специфічним інтрануклеарним (ядерно-цитоплазматичним для p16) забарвленням на 1000 пухлинних клітин, аналогічно маркеру Ki-67. Позитивною з циклін D1, p16 і p21 реакція вважалася, якщо коричневих ядер/клітин налічувалося >40%, >5% і  $\geq 10\%$  від-

повідно (табл. 2). Позитивний статус з цикліном D1 знайдений в 50% ПР ОФО, в діапазоні від 41 до 78%, що, в середньому, складало 53,2±2,13%. Але статистично достовірного зв'язку між підвищенням експресії цикліну D1 і клініко-морфологічними характеристиками ПР ОФО в дослідженні виявлено не було ( $p>0,05$ ). Позитивний p21-статус був визначений в 59,7% ПР ОФО і, в

середньому, склав 67,8±1,34%. Статус ПР за p21 мав прогностичне значення щодо регіонарного метастазування ( $p=0,04$ ,  $r=0,244$ ) і передбачувальне щодо ймовірної чутливості до ХТ ( $p<0,001$ ,  $r=-0,621$ ) – сильний зворотній кореляційний зв'язок.

Таблиця 2  
Розподіл значень експресії маркерів VEGF, CD34, циклін D1, p16, p21 в залежності від клініко-морфологічних характеристик ПР ОФО

Клініко-морфологічні характеристики ПР	Всього n = 72		p	CD34 судин/1мм <sup>2</sup>	p	Циклін D1 >40%	p	p16 >5%	p	p21 ≥20%	p
	VEGF (+)										
Стать			0,200		0,264		0,558		0,782		0,804
Чоловіки	69	44		45		34		51		41	
Жінки	3	3		1		2		2		2	
Первинна локалізація			0,057		<b>0,005</b>		0,861		0,177		0,068
Мигдалики	42	32		33		21		33		28	
Глотка	23	11		10		11		17		13	
Коріння язика	7	4		3		4		3		2	
Ступінь диференціювання			0,924		0,568		0,273		<b>0,002</b>		0,641
Високий	26	16		15		15		15		17	
Помірний	38	27		26		28		30		21	
Низький	8	4		5		3		8		5	
Метастази в л/в шиї			<b>0,011</b>		<b>0,001</b>		0,639		0,585		<b>0,040</b>
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	34	17		15		16		24		16	
T <sub>3</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	38	30		31		20		29		27	
Відповідь на ХТ			<b>0,004</b>		<b>0,029</b>		0,158		0,440		<b>0,000</b>
Позитивна	40	32		30		23		28		13	
Негативна	32	15		16		13		25		30	

Примітка: статистично достовірним зв'язок вважався при  $p<0,05$ .

Змішана ядерно-цитоплазматична експресія онкопротеїну p16 більше 5% пухлинних клітин спостерігалася в 73,6% ПР ОФО. Визначений статистично достовірний зв'язок між позитивним p16-статусом і зниженням ступеня диференціювання ( $p=0,002$ ,  $r=-0,365$ ).

#### Висновки

1. Під час аналізу експресії маркерів міжклітинної адгезії Е-кадгерину та β-катеніну було встановлено, що зі зниженням ступеня диференціювання в ПРОФО відбувається підвищення відносної кількості випадків зі втрачанням міжклітинної адгезії Е-кадгерину та β-катеніну, але статистично достовірний зв'язок знайдено було лише для β-катеніну ( $p=0,004$ ,  $r=0,34$ ). Відповідно до визначених тенденцій, ймовірність виникнення метастазів в регіональні лімфатичні вузли зростає прямо пропорційно зменшенню експресії обох маркерів, для Е-кадгерину ( $p<0,001$ ,

$r=0,471$ ), для β-катеніну ( $p=0,02$ ,  $r=0,373$ ). До того ж виявлений зв'язок між експресією β-катеніну та первинною локалізацією ( $p=0,004$ ,  $r=0,34$ ), що доказує більш агресивний перебіг ПР коріння язика порівняно ПР мигдаликів і стінок глотки. Надекспресія Е-кадгерину та падіння відносної кількості випадків зі збереженням «типової» моделі його мембранної експресії є достовірним передбачувальним показником ( $p=0,019$ ,  $r=0,279$ ) негативної відповіді ПРОФО на хіміотерапію, на відміну від маркеру β-катеніну ( $p=0,561$ ).

2. При дослідженні експресії матричних металопротеїназ, для інтерстиціальної колагенази I (ММП-1) виявлений тільки зворотній зв'язок між підвищенням протеолітичної активності і позитивною відповіддю на ХТ ( $p=0,023$ ,  $r=0,238$ ), а для желатінази В/колагенази IV (ММП-9) встановлено прямий зв'язок підвищення експресії ММП-9 з наявністю метастазів в лімфати-

чні вузли шиї ( $p=0,035$ ,  $r=0,25$ ) і зворотній зв'язок з позитивною відповіддю на ХТ ( $p=0,006$ ,  $r=-0,328$ ).

3. ІП в ПР ОФО коливався від 14 до 86% і, в середньому, склав  $47,9 \pm 3,24\%$ . Визначені статистично значущі зв'язки між підвищенням експресії Ki-67 і зниженням ступеня диференціювання ПР ОФО ( $p=0,004$ ,  $r=0,345$ ), виявленням регіональних метастазів ( $p=0,006$ ,  $r=0,326$ ) та негативною відповіддю на ХТ ( $p=0,012$ ,  $r=0,3$ ). Це говорить про переконливе прогностично-передбачувальне значення Ki-67 для ПР ОФО.

4. VEGF-позитивний статус був визначений в 65,3% випадків (2-4 категорії інтенсивності цитоплазматичного забарвлення). Виявлено прямі кореляційні зв'язки між підвищенням експресії VEGF і регіональним метастазуванням ( $p=0,011$ ,  $r=0,304$ ) та позитивною відповіддю на хімотерапію ( $p=0,004$ ,  $r=0,346$ ) у зв'язку з селективним внутрішньоартеріальним доступом введення цитостатиків. При аналізі прогностичного значення CD34 в ПР ОФО з'ясувалося, що показники ЦМС відрізняється в різних первинних локалізаціях, що знайшло відображення в показниках статистичної значущості зв'язку ( $p=0,005$ ,  $r=0,331$ ), також знайдено прямий кореляційний зв'язок між високою ЦМС і метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли ( $p=0,001$ ,  $r=0,389$ ), у групі хворих, з негативною відповіддю на ХТ, щільність судин у ПР ОФО була достовірно нижчою ( $p=0,029$ ,  $r=-0,259$ ), порівняно з такою у хворих, що відповіли позитивно.

5. Позитивний статус з цикліном D1 знайдений в 50% ПР ОФО, в діапазоні від 41 до 78%, що, в середньому, складало  $53,2 \pm 2,13\%$ . Але ста-

тистично достовірного зв'язку між підвищенням експресії цикліну D1 і клініко-морфологічними характеристиками ПР ОФО в дослідженні виявлено не було ( $p>0,05$ ).

6. Змішана ядерно-цитоплазматична експресія онкопротеїну p16 більше 5% пухлинних клітин спостерігалася в 73,6% ПР ОФО. Визначений статистично достовірний зв'язок між позитивним p16-статусом і зниженням ступеня диференціювання ( $p=0,002$ ,  $r=-0,365$ ).

7. Позитивний p21-статус був визначений в 59,7% ПР ОФО і, в середньому, склав  $67,8 \pm 1,34\%$ . Статус ПР за p21 мав прогностичне значення щодо регіонарного метастазування ( $p=0,04$ ,  $r=0,244$ ) і передбачувальне щодо ймовірної чутливості до ХТ ( $p<0,001$ ,  $r=-0,621$ ) – сильний зворотній кореляційний зв'язок.

8. Отримані дані дослідження ПР ОФО на підставі імуногістохімічного профілю дозволяють виділити для прогнозу метастазування в лімфатичні вузли шиї основні маркери (Е-кадгерин, CD34,  $\beta$ -катенін, Ki-67), додаткові (ММП-9, VEGF, p21) та непоказові (циклін D1, p16, ММП-1); для прогнозу ймовірної відповіді на ХТ – основні (p21, VEGF, ММП-9), додаткові (Ki-67, Е-кадгерин, CD34) та непоказові (циклін D1, p16, ММП-1). Це відповідає головним питанням, які стоять перед патоморфологами та ЛОР-онкологами щодо планування комбінованого лікування пацієнтів з ПР ОФО та прогнозу.

**Перспективи подальших розробок** пов'язані з дослідженням критеріїв перебігу злоякісних новоутворень орофарингеальної області на підставі показників експресії маркерів молекулярно-біологічних властивостей клітин.

#### Літературні джерела

Аничков Н. М. Новое в учении о метастазировании злокачественных опухолей / Н. М. Аничков // Патология. – 2006. – Т. 3, № 2. – С. 4-12.

Гладилина И. А. Современные подходы к терапии рака ротоглотки / И. А. Гладилина, М. А. Шабанов, М. И. Нечушкин // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 45-50.

Проценко С. А. Поиски путей индивидуализации противоопухолевой терапии / С. А. Проценко // Практическая онкология – 2007. – Т. 8, № 4. – С. 173-181.

Cardesa A. Pathology of the Head and Neck / A. Cardesa, P. J. Slootweg. – Berlin: Springer, 2006. – 316 p.

Choi S. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy / S. Choi, J. N. Myers // Dent. res. – 2008. – Vol. 87, №

1. – P. 14-32.

Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis / A. Katayama, N. Bando, K. Kishibe [et al.] // Clinical cancer research. – 2004. – Vol. 10. – P. 634-640.

Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semi-quantitative analysis / L. L. Matos, E. Stabenow, M. R. Tavares [et al.] // Clinics. – 2006. – Vol. 61, № 5. – P. 417-424.

Marur S. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment / S. Marur, A. A. Forastiere // N. Eng. J. Med. – 2008. – Vol. 358, № 4. – P. 489-501.

**Пославская А.В. Иммуноморфологические аспекты прогнозирования течения плоскоклеточных раков орофарингеальной области.**

**Резюме.** Статья посвящена исследованию экспрессии иммуногистохимических маркеров в плоскоклеточных раках орофарингеальной области для прогнозирования клинического течения. Проведен анализ экспрессии маркеров неоваскулогенеза VEGF и CD34, матричных металлопротеиназ 1 и 9, онкопротеинов p21, p16, циклина D1, маркеров межклеточной адгезии E-кадгерина и  $\beta$ -Катенина и пролиферативной активности Ki-67 в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли (первичной локализации, степени дифференцировки, наличие метастазов в лимфатические узлы шеи) и ответы на химиотерапию. Определены «неблагоприятные» иммунофенотипы раков орофарингеальной области с высоким риском метастазирования и вероятной нечувствительностью к химиотерапии, что позволяет более дифференцированно подходить к тактике лечения пациентов с плоскоклеточным раком орофарингеальной области.

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак орофарингеальной области, полуколичественный анализ цифровых изображений, матричные металлопротеиназы, маркеры неоваскулогенеза, маркеры межклеточной адгезии, онкопротеины, пролиферативная активность.