

## Зв'язок вірусу папіломи людини з малігнізацією передракових захворювань слизової оболонки порожнини рота

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

**Мета:** виявлення білків Ki-67, P16INK4a і антигенів папіломавірусу людини високого онкогенного ризику (HPV16) при гіперплазії, дисплазії та плоскоклітинному раку слизової оболонки порожнини рота.

**Матеріали та методи.** Були досліджені біоптати слизової оболонки порожнини рота 82 пацієнтів з лейкоплакією, у тому числі 42 жінок і 40 чоловіків. Середній вік хворих склав 62 роки. При проведенні гістологічного дослідження контролем слугував незмінений епітелій, який брали з прилеглих до лейкоплакії ділянок слизової. Виявлення тканинних антигенів здійснювали за допомогою поліклональних антитіл кроля до вірусу папіломи людини 16-го типу.

**Результати.** У результаті дослідження було вивчено 10 (12 %) ділянок незміненої слизової оболонки, 35 (43 %) зразків лейкоплакії без атипії, 16 (20 %) біоптатів лейкоплакії з дисплазією різного ступеня від SIN 1 до SIN 3; у 21-го (25 %) пацієнта виявлено плоскоклітинний рак.

ІГХ-дослідження епітелію слизової оболонки порожнини рота виявило особливості експресії білків, що характеризують проліферативні процеси та вірусні антигени при різних морфологічних проявах лейкоплакії, які показують реплікацію вірусу папіломи людини у проліферуючих клітинах багатошарового плоского епітелію.

**Висновок.** Оскільки кілька факторів можуть бути залучені в пухлинну трансформацію, ми оцінили можливу роль вірусу папіломи людини в розвитку лейкоплакії. Виявлено зв'язок між вірусом папіломи людини та злоякісною трансформацією. Виявлення папіломавірусної інфекції в розвитку лейкоплакії може не тільки визначити його генезис, а і стати морфологічною основою для ефективної профілактики та лікування поширених захворювань слизової оболонки порожнини рота. Роль вірусу папіломи людини в злоякісній трансформації завжди була в стадії обговорення і вимагає подальших досліджень.

**Ключові слова:** лейкоплакія, слизова оболонка рота, імуногістохімія, вірус папіломи людини 16-го типу, Ki-67, P16INK4a.

Лейкоплакія – це найбільш поширене передракове ураження слизової оболонки рота [1, 2]. Це різновид кератозів слизової, характеризується хронічним перебігом і ураженням слизової оболонки порожнини рота та червоної облямівки губ [3]. При патологоанатомічному дослідженні в разі клінічно встановленого діагнозу «лейкоплакія» у 80–85% випадків виявляють гіперкератоз з гіперплазією базального й остистого шарів епітелію, у 5–15% – гіперкератоз з різним ступенем дисплазії, а у 2–5 % – плоскоклітинний рак [4].

Розвиток лейкоплакії викликають різні поліетіологічні чинники. До них відносять механічні, хімічні, термічні травми. Близько 70–90 % випадків уражень лейкоплакією слизової оболонки пов'язано з курінням, відмічена пряма залежність між частотою, тривалістю куріння й розвитком лейкоплакії [5, 6].

На даний час виявлено зв'язок розвитку лейкоплакії з наявністю вірусу папіломи людини (HPV) [7]. Вірус папіломи людини – це невеликий ДНК-вірус, який проявляє тропізм до багатошарового плоского епітелію. На даний час ідентифіковано близько 120-ти типів HPV. HPV високого онкогенного ризику є причиною близько 40 % випадків захворювання раком слизової оболонки порожнини рота [8]. Реплікація вірусу HPV відбувається тільки у проліферуючих епітеліальних клітинах слизової оболонки. Відомо, що при підвищенні ступеня дисплазії кількість проліферуючих клітин, що експресують білок Ki-67 в епітелії слизової оболонки порожнини рота, зростає [9, 10]. У зв'язку з цим діагностика подібних клітин за допомогою імуногістохімічного маркера проліферації Ki-67 може бути додатковим критерієм передракових станів.

HPV активує проліферативну активність епітеліальних клітин за рахунок блокування білка P16INK4a. Ген P16INK4a розташовується на ділянці хромосоми 9p21,

містить три екзони та кодує ядерний фосфопротейн з молекулярною масою 16 кД. Функція білка даного гену полягає в гальмуванні клітинного циклу за рахунок зв'язування циклінзалежних кіназ 4 й 6 і взаємодії з цикліном D1 [11].

У зв'язку з вищевикладеним *метою* даного дослідження було виявлення білків Ki-67, P16INK4a та антигенів папіломавірусу людини високого онкогенного ризику (HPV16) при гіперплазії, дисплазії та плоскоклітинному раку слизової оболонки порожнини рота.

### Матеріали та методи

Були досліджені біоптати слизової оболонки порожнини рота 82-х пацієнтів з лейкоплакією, у тому числі 42 жінок і 40 чоловіків. Середній вік хворих склав 62 роки. При проведенні гістологічного дослідження контролем слугував незмінений епітелій, який брали із прилеглих до лейкоплакії ділянок слизової. Гістологічну оцінку досліджуваного матеріалу проводили згідно із класифікацією ВООЗ (2005).

Матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні (рН = 7,4) і після проведення на гістопробі зразки заливали в парафін з температурою плавлення 54°C. Для гістологічного та імуногістохімічного (ІГХ) дослідження готували серійні зрізи товщиною 5 мкм, які поміщали на скельця вкриті полі-L-лізином. Виявлення тканинних антигенів здійснювали за допомогою поліклональних антитіл кроля до вірусу папіломи людини 16-го типу (Thermoscientific) ц розведенні 1:400 і моноклональних антитіл P16INK4a (clon EPR1473, EPITOMICS) – 1:200 і Ki-67 (Thermoscientific) – 1:100. Виявлення імунних комплексів проводили за допомогою системи детекції Ultra-Vision Quanto Detecton System HRP (Thermoscientific), для чого зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра. Реакцію на вірус папіломи людини 16-го типу та P16INK4a оцінювали якісно за клітинними зонами: у

базальному, остистому й шипуватому клітинних шарах, при плоскоклітинному раку оцінювали також периферійну та центральну зони розподілу клітин пухлини. Індекс проліферації Ki-67 (ІП Ki-67) оцінювали також за клітинними зонами: визначали відношення кількості імунореактивних ядер клітин до загального числа ядер (у відсотках). Оцінку показників здійснювали у відповідних ділянках тканин. Підрахунок клітин проводили при збільшенні в 400 разів.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Statistica 10.0. стандартними методами. Ураховуючи ненормальний розподіл окремих статистичних показників, порівняння двох незалежних груп здійснювали непараметричним методом за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Достовірними вважали відмінності середніх при рівні статистичної значущості  $p < 0,05$ . За допомогою коефіцієнта  $r$  (табл. 2) Спірмена вивчали кореляційні відношення між проліферативною активністю клітин (за експресією білка Ki-67) при лейкоплакії з явищами гіперплазії, дисплазії, плоскоклітинному раку й вираженістю експресії антигенів вірусу папіломи людини (16-го типу) і P16INK4a.

### Результати дослідження

У результаті дослідження було вивчено 10 (12 %) ділянок незміненої слизової оболонки, 35 (43 %) зразків лейкоплакії без атипії, 16 (20 %) біоптатів лейкоплакії з дисплазією різного ступеня від SIN 1 до SIN 3; у 21-го (25 %) пацієнта виявлено плоскоклітинний рак.

ІГХ-дослідження епітелію слизової оболонки порожнини рота виявило особливості експресії білків, що характеризують проліферативні процеси та вірусні антигени при різних морфологічних проявах лейкоплакії, які показують реплікацію вірусу папіломи людини у проліферуючих клітинах багатошарового плоского епітелію.

При ІГХ-дослідженні незміненого епітелію проліферуючі клітини виявляли лише в базальному шарі. У шести випадках в ядрах клітин усіх шарів був виявлений білок P16INK4a, а у двох випадках – білок HPV16. У клінічному матеріалі при лейкоплакії з гіперплазією слизової оболонки і явищами гіперкератозу експресія білка Ki-67 була виявлена в ядрах епітеліальних клітин базального

й остистого шарів. При даному виді патологічного процесу в 77 % випадків відмічали експресію білка P16INK4a в ядрах багатошарового плоского епітелію всіх досліджених зон, а у 34 % випадків – позитивну реакцію на вірусні антигени HPV16. На рис. 1 (а, б) показано позитивне ІГХ-забарвлення ядер епітеліальних клітин на білок P16INK4a і негативна реакція на вірусні антигени HPV16. При лейкоплакії з явищами SIN кількість проліферуючих клітин була збільшена в парабазальному та остистому шарах епітелію (табл. 1). У цих же зонах в 75 % випадків виявляли експресію білка P16INK4a (рис. 1-в) і у 50 % – антигени HPV16 у вигляді невеликих включень у клітинних ядрах і цитоплазмі (рис. 1-г). При плоскоклітинному раку в периферійних і центральних клітинних зонах кількість проліферуючих клітин була значно більше порівняно з гіперплазією і SIN. У цих же ділянках у 86 % випадків відмічена висока ядерна експресія білка P16INK4a, у 62 % випадків – включення антигенів HPV16 у клітинних ядрах і цитоплазмі (рис. 1-д, е).

Проведений статистичний аналіз виявив високі кореляційні зв'язки між проліферацією клітин у парабазальному шарі при лейкоплакії з гіперплазією та експресією білка P16INK4a, а також при лейкоплакії з дисплазією в парабазальному, остистому клітинних шарах і наявністю антигенів HPV16 (табл. 2).

Проведені дослідження показали, що при різних морфологічних варіантах лейкоплакиї від гіперплазії з гіперкератозом до плоскоклітинного раку в епітеліальних клітинах багатошарового плоского епітелію виявляються антигени вірусу папіломи людини високого онкогенного ризику HPV16 і білки, асоційовані з HPV (P16INK4a). Білок P16INK4a гальмує формування пухлин за рахунок блокування циклінзалежної кинази (cdk4) за рахунок блокування cdk4- та cdk6-викликаного pRb фосфорилування, що призводить до гальмування E2F-залежної транскрипції, і здійснення клітинного циклу від точки порівняння G1 до S [12]. Пригнічення експресії гену P16INK4a за рахунок гіперметилування або мутації часто спостерігають у більшості ракових клітинних ліній і первинних пухлин людини. Таким чином, підвищена експресія гену P16INK4a є непрямим маркером HPV, що відображає порушення механізмів, які

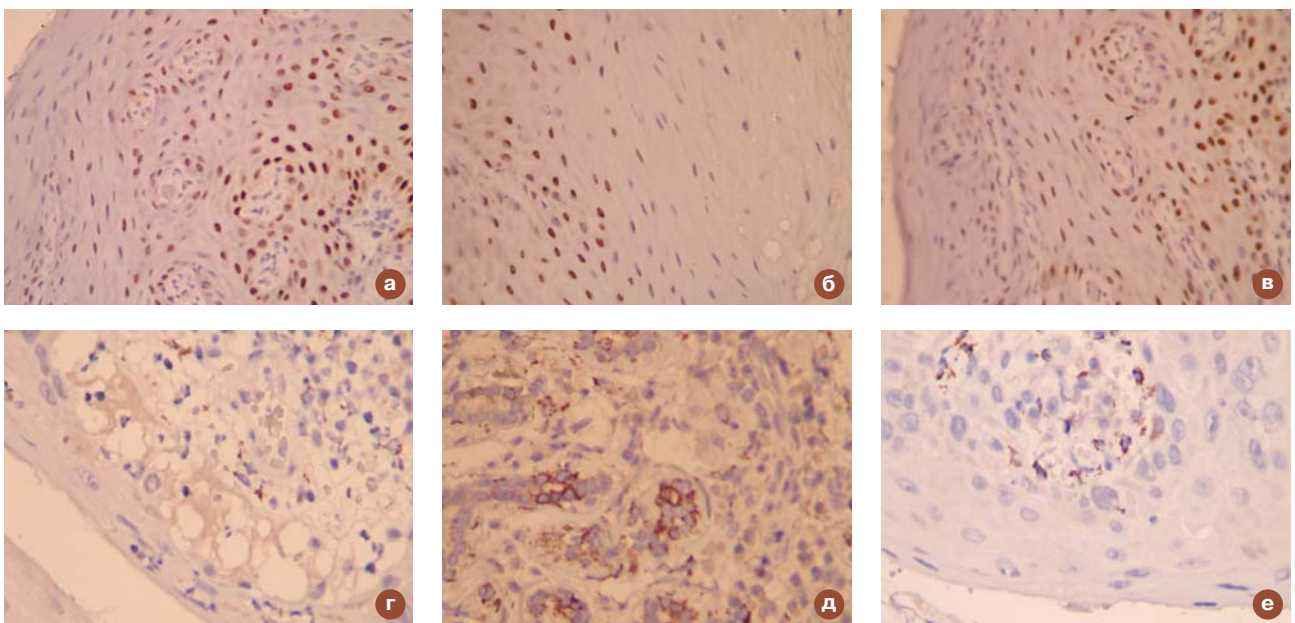


Рис. ІГХ-реакція при лейкоплакії з гіперплазією епітелію (а, б), SIN (в, г) і плоскоклітинному раку (д, е) СОР з антитілами до P16INK4a (а, в, д) та HPV16 (б, г, е).

Забарвлення ДАБ-гематоксиліном Майєра (а-в – х120; г-е – 240).

Таблиця 1

**Співвідношення експресії Ki-67, P16INK4a та антигенів HPV16 при різних морфологічних варіантах лейкоплакії слизової оболонки рота**

№ п/п	Показник	n	Ki-67 (базальний шар)	Ki-67 (парабазальний шар)	Ki-67 (шипуватий шар)	P16INK4a, %	HPV16, %
			M±SD, %				
1	Незмінений епітелій	10	92,1±3,6	0	0	60	20
2	Лейкоплакція з гіперплазією	35	58,5±36,2*	38,4±24,1*	0,3±1,7*	77	34
3	Лейкоплакція з SIN	16	45,9±33,1*	38,1±21,5*	4±14,7*	75	50
4	Плоскоклітинний рак	21	Периферія		Центр	Периферія	Центр
			60,5±25,3*		39,3±30,6*	86	62

Примітка. \* – p < 0,05.

Таблиця 2

**Коефіцієнт кореляції Спірмена між процентом проліферуючих клітин та експресією P16INK4a та антигенів HPV16 при різних морфологічних варіантах лейкоплакії слизової оболонки рота**

Показник	n	Ki-67 (базальний шар)		Ki-67 (парабазальний шар)		Ki-67 (шипуватий шар)	
		rs, p					
		P16INK4a	HPV16	P16INK4a	HPV16	P16INK4a	HPV16
Незмінений епітелій	10	-0,284 0,426	-0,522 0,1215	0 1,000	0 1,000	0 1,000	0 1,000
Лейкоплакція з гіперплазією	35	-0,317 0,064	-0,474 0,004	0,397 0,018	0,228 0,187	0,166 0,339	-0,030 0,863
Лейкоплакція з SIN	16	0,235 0,380	0,298 0,260	0,094 0,728	0,515 0,041	0,266 0,318	0,651 0,006
Плоскоклітинний рак	21	Периферія				Центр	
		P16INK4a	HPV16	P16INK4a	HPV16	P16INK4a	HPV16
		0,022 0,923	0,390 0,080	-0,157 0,495	-0,211 0,358		

контролюють клітинну проліферацію й характеризує персистення інфекції з високим ризиком розвитку неоплазії [13, 14].

Ураховуючи той факт, що на даний час ідентифіковано більше 120-ти типів HPV, виявляти їх антигени за допомогою ІГХ-методики практично неможливо. Цей факт може пояснити низький відсоток виявлення антигенів HPV 16-го типу при гіперплазії СОР з гіперкератозом на тлі високої експресії P16INK4a, швидше за все викликаной папіломавірусами інших типів.

ІГХ-дослідження показують, що P16INK4a інтенсивно експресується у 100 % випадків дисплазії та раку слизової шийки матки, але рідко виявляється в незмінній слизовій оболонці [14, 15]. У серії диспластичних уражень високого ступеня коефіцієнт відповідності P16INK4a-забарвлення становить 100 % [16]. У подібних дослідженнях експресія P16INK4a виявляє дисплазію шийки матки низького ступеня, яка може прогресувати в більш виражену дисплазію або карциному.

У даних дослідженнях виявлений достовірний зв'язок між SIN і HPV 16-го типу. Однак дані щодо наявності HPV-інфекції в епітеліальних клітинах СОР при перед-

ракових і ракових ураженнях є суперечливими, починаючи від 0 до 100 % [17,18]. Причина подібних розбіжностей швидше за все криється в методичних особливості вибору зразків, методик дослідження HPV та ін. [19].

**Висновки**

При різних морфологічних варіантах лейкоплакії в епітеліальних клітинах багатошарового плоского епітелію слизової оболонки рота виявлена підвищена проліферативна активність клітин з експресією у клітинних ядрах білка Ki-67 і маркерів, які безпосередньо (HPV16) або побічно (P16INK4a) пов'язані з вірусом папіломи людини. При гіперплазії з гіперкератозом виявляють тільки білок P16INK4a, при плоскоклітинній інтраепітеліальній неоплазії з гіперкератозом і плоскоклітинному раку – P16INK4a та антигени вірусу папіломи людини високого ризику (HPV16).

Виявлення папіломавірусної інфекції при лейкоплакії не тільки дозволяє визначити її генез, а і є морфологічною основою для проведення ефективної профілактики та лікування цього розповсюдженого захворювання слизової оболонки рота.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Feller L., Lemmer J. Field cancerization and oral leukoplakia. In: Dakubo G.D., ed. Field cancerization: basic science and clinical applications. – Ontario, Canada: Nova Science; 2011: 95–111.  
 2. Sciubba J.J. Oral cancer: the importance of early diagnosis and treatment // Am. J. Clin. Dermatol. – 2001; 2 (4): 239–51.  
 3. Рабинович О.Ф., Бабиченко І.І., Рабинович І.М., Островский А.Д., Того-нидзе А.А. Оптимизация диагностики различных форм лейкоплакии // Стоматология. 2012; 3: 20–2.  
 4. Brandwein-Gensler M.S. Lesions of the oral cavity. In: Diagnostic surgical pathology of the head and neck. Philadelphia: Saunders / Elsevier; 2009: 191–308.

5. Neville B., Damm D., Allen C., Bouquot J. Oral and maxillofacial pathology. – St. Louis: Saunders/Elsevier; 2009.
6. Dietrich T., Reichart P.A., Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population // Oral Oncology. – 2004; 40 (2): 158–63.
7. Acay R., Rezende N., Fontes A., Aburad A., Nunes F., Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification // Oral Microbiol. Immunol. – 2008; 23 (4): 271–4.
8. Parkin D.M., Bray F. Chapter 2: the burden of HP-related cancers // Vaccine. – 2006; 24 (Suppl. 3): 11–25.
9. Ковязин В.А., Григорьян А.С., Катушкина А.А., Бабиченко И.И. Особенности экспрессии белка Ki-67 при лейкоплакии и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта // Стоматология. – 2010; 6: 4–6.
10. Бабиченко И.И., Григорьян А.С., Катушкина А.А. Экспрессия кератина 8 при гиперкератозе и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта. Архив патологической анатомии. – 2011; 73 (6): 18–21.
11. Murphy N., Heffron C.C., King B., Ganugapati U.G., Ring M., McGuinness E. p16INKA positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem // Virchows Arch. – 2004; 445 (6): 610–5.
12. Zhang H.S., Postigo A.A., Dean D.C. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INKA, TGF-beta and contact inhibition // Cell. – 1999; 97 (1): 53–61.
13. Keating J.T., Cviko A., Riethdorf S., Riethdorf L., Quade B.J., Sun D. et al. Ki-67, cyclin E and p16INKA are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia // Am. J. Surg. Pathol. – 2001; 25 (7): 884–91.
14. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D., Ridder R., Rudy W., Petry U. et al. Overexpression of p16(INKA) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri // Int. J. Cancer. – 2001; 92 (2): 276–84.
15. Klaes R., Benner A., Friedrich T., Ridder R., Herrington S., Jenkins D. et al. P16INKA immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia // Am. J. Surg. Pathol. – 2002; 26 (11): 1389–99.
16. Murphy N., Ring M., Killalea A.G., Uhlmann V., O'Donovan M., Mulcahy F. et al. p16INKa as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin-Prep Smears // J. Clin. Pathol. – 2003; 56 (1): 56–63.
17. Hennessey P.T., Westra W.H., Califano J.A. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications // J. Dent. Res. – 2009; 88 (4): 300–6.
18. Ha P.K., Califano J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis // Clin. Rev. Oral Biol. Med. – 2004; 15 (4): 188–96.
19. Feller L., Lemmer J. Oral leukoplakia as it relates to HPV infection: a review // Int. J. Dent. – 2012; 2012: 540561. doi: 10.1155/2012/540561.

### Обоснование связи между наличием вируса папилломы человека и развитием лейкоплакии слизистой оболочки полости рта

Ю.Г. Коленко, О.В. Каленская

**Цель:** выявление белков Ki-67, P16INK4a и антигенов вируса папилломы человека высокого онкогенного риска (HPV16) при гиперплазии, дисплазии и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта.

**Материалы и методы.** Были исследованы биоптаты слизистой оболочки полости рта 82-х пациентов с лейкоплакией, в том числе 42 женщин и 40 мужчин. Средний возраст больных составил 62 года. При проведении гистологического исследования контролем служил неизмененный эпителий, который брали из прилегающих к лейкоплакии участков слизистой. Выявление тканевых антигенов осуществляли с помощью поликлональных антител кролика к вирусу папилломы человека 16-го типа.

**Результаты.** В результате исследования было изучено 10 (12 %) участков неизмененной слизистой оболочки, 35 (43 %) образцов лейкоплакии без атипии, 16 (20 %) биоптатов лейкоплакии с дисплазией различной степени от SIN 1 до SIN 3; у 21-го (25 %) пациента выявлен плоскоклеточный рак. ИГХ-исследования эпителия слизистой оболочки полости рта выявили особенности экспрессии белков, характеризующих пролиферативные процессы и вирусные антигены при различных морфологических проявлениях лейкоплакии, которые показывают репликацию вируса папилломы человека в пролиферирующих клетках многослойного плоского эпителия.

**Вывод.** Поскольку несколько факторов могут быть вовлечены в опухолевую трансформацию, оценили возможную роль вируса папилломы человека в развитии лейкоплакии. Обнаружена связь между вирусом папилломы человека и злокачественной трансформацией. Выявление папилломавирусной инфекции в развитии лейкоплакии может не только определить его генезис, но и может стать морфологической основой для эффективной профилактики и лечения распространенных заболеваний слизистой оболочки полости рта. Роль вируса папилломы человека в злокачественной трансформации всегда была в стадии обсуждения и требует дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** лейкоплакия, слизистая оболочка рта, иммуногистохимия, вирус папилломы человека 16-го типа, Ki-67, P16INK4a.

### Association with human papillomavirus and malignisation of oral precancer

Yu. Kolenko, O. Kalens'ka

**Aim:** to detect the Ki-67 proteins, P16INK4a and antigens of human papillomavirus of high oncogenic risk (HPV16) at hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa.

**Materials and methods.** The biopsy material of the oral mucosa of 82 patients with leukoplakia was studied, including 42 women and 40 men. The average age of patients was 62 year. At carrying out histological examination unmodified epithelia, which were taken from the adjacent to leukoplakia areas of mucous membrane, were used as control.

**Results.** As a result of study, 10 (12 %) areas of the unmodified mucous membrane, 35 (43 %) biopsy materials without atypia leukoplakia, 16 (20 %) biopsy materials of leukoplakia with dysplasia of varying degrees from SIN 1 to SIN 3 were studied; a squamous cell carcinoma was detected at 21 (25 %) patients. Immunohistochemical (IHC) study of oral mucosa epithelium has revealed features of protein expression that characterizes the proliferative processes and viral antigens during different morphological manifestations of leukoplakia showing human papilloma virus replication in proliferating cells of stratified squamous epithelium.

**Conclusion.** As multiple factors can be involved in neoplastic transformation, evaluating the possible role of HPV has been the focus of many studies. In the Ukrainian population, we found association between HPV and malignant transformation. Detection of human papillomavirus infection at leukoplakia can not only identify its genesis, but can also become a morphological basis for effective prevention and treatment of common diseases of the oral mucosa. The role of HPV in malignant transformation has always been under discussion and requires larger studies.

**Key words:** leukoplakia, oral mucosa, immunohistochemistry, human papillomavirus 16 type, Ki-67, P16INK4a.

Ю.Г. Коленко – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна.

О.В. Каленська – канд. мед. наук, завідувач патологоанатомічного відділення КЛ «Феофанія» ДУС.