

Лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 и p53 как биомаркеры при прогнозировании плоскоклеточной карциномы ротоглотки

Д.Ш. Полатова¹, А.Ю. Мадаминов¹, А.В. Савкин¹, А.Ж. Каххаров¹, Г.К. Ботиралиева², А.А. Мадалиев³, Н.Б. Юлдашходжаева¹, Ш.К. Хужаев¹

¹Ташкентский государственный стоматологический институт; Республика Узбекистан, 100047 Ташкент, ул. Махтумкули, 103;

²ООО "Ipsum pathology"; Республика Узбекистан, 100058 Ташкент, ул. Богистон, 1;

³Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии; Республика Узбекистан, 100179 Ташкент, ул. Фароби, 383

Контакты: Александр Владимирович Савкин sasha_worker_113@mail.ru

Введение. В настоящее время патогенетическая роль вируса папилломы человека (ВПЧ) в канцерогенезе хорошо изучена. Выявлено, что большинство случаев плоскоклеточной карциномы ротоглотки связано с персистенцией этой инфекции. Помимо ВПЧ в инициации и прогрессировании плоскоклеточной карциномы ротоглотки играют роль лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) и белок p53, что позволяет рассматривать их в качестве дополнительных биомаркеров при прогнозировании заболевания.

Цель исследования – изучение прогностической роли экспрессии PD-L1 и белка p53 при плоскоклеточной карциноме ротоглотки с учетом ВПЧ-статуса.

Материалы и методы. В исследование включены 62 пациента с плоскоклеточной карциномой ротоглотки стадии T1–4N0–3M0 (по 7-му изданию классификации Tumor, Node and Metastasis, TNM), получившие в 2015–2020 гг. лечение в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре онкологии и радиологии и в Ташкентском и Самаркандском городских филиалах этого центра. Всем больным проведено иммуногистохимическое исследование на наличие экспрессии белков p16^{INK4a}, PD-L1 и p53 в образцах опухолевой ткани, фиксированных формалином и залитых в парафин.

Результаты. Выявлено, что положительный ВПЧ-статус, низкие и средние уровни экспрессии PD-L1 и положительная экспрессия дикого типа p53 связаны с благоприятными исходами у пациентов с плоскоклеточной карциномой ротоглотки. Отрицательный ВПЧ-статус, высокие и очень высокие уровни экспрессии PD-L1, потеря функции дикого типа p53 с повышенной экспрессией мутантного типа p53 приводят к ухудшению исходов заболевания.

Заключение. Таким образом, оценка экспрессии онкосупрессорного белка p53 помогает определить биологию раковых клеток у пациентов с плоскоклеточной карциномой ротоглотки и чувствительность к лечению. Изучение регуляции PD-L1 даст возможность проводить противоопухолевую иммунную терапию.

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

Для цитирования: Полатова Д.Ш., Мадаминов А.Ю., Савкин А.В. и др. Лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 и p53 как биомаркеры при прогнозировании плоскоклеточной карциномы ротоглотки. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2023;15(2):25–37. DOI: 10.17650/2782-3687-2023-15-2-25-37

PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 AND P53 AS A BIOMARKER IN PREDICTING OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

D.Sh. Polatova¹, A.Yu. Madaminov¹, A.V. Savkin¹, A.Zh. Kakhkharov¹, G.K. Botiralieva², A.A. Madaliev³, N.B. Yuldashkhodzhaeva¹, Sh.K. Khuzhaev¹

¹Tashkent State Dental Institute; 103 Makhtumkuli St., Tashkent 100047, Republic of Uzbekistan;

²LLC "Ipsum pathology"; 1 Bogiston St., Tashkent 100058, Republic of Uzbekistan;

³Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology; 383 Farobi St., Tashkent 100179, Republic of Uzbekistan

Contacts: Alexander Vladimirovich Savkin *sasha_worker_113@mail.ru*

Introduction. Currently, the pathogenetic role of the human papillomavirus (HPV) in carcinogenesis is well studied, that most cases of oropharyngeal squamous cell carcinoma are associated with the persistence of this infection. In addition to HPV infection, the involvement of programmed death-ligand 1 (PD-L1) and p53 proteins in the initiation and progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma provides their formation as additional biomarkers in predicting the disease.

Aim. To study the prognostic role of PD-L1 and p53 expression in oropharyngeal squamous cell carcinoma depending on HPV status.

Materials and methods. The study included 62 patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma T1–4N0–3M0 (Tumor, Nodus and Metastasis, (TNM), 7th edition) treated in 2015–2020 at the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology and in the Tashkent and Samarkand city branches. All patients underwent immunohistochemical analysis for the presence of p16INK4a, PD-L1 and p53 protein expression in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue samples.

Results. Based on the results of the assessment, it was found that positive HPV status, low and medium levels of PD-L1 expression and positive regulation of wild-type p53 are associated with favorable outcomes in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. Negative HPV status, high and very high levels of PD-L1 expression, loss of wild type p53 function with upregulation of p53 mutant type leads to worse disease outcomes.

Conclusion. Thus, the assessment of the expression of the onco-suppressor protein p53 helps to determine the biology of cancer cells in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and suggest sensitivity to ongoing therapy, and by studying the regulation of the PD-L1 protein, antitumor immune regulation can be suggested in these patients.

Keywords: oropharyngeal squamous cell carcinoma, human papillomavirus, protein expression p16INK4a, programmed cell death 1 ligand 1, p53, biomarker

For citation: Polatova D.Sh., Madaminov A.Yu., Savkin A.V. et al. Programmed death-ligand 1 and p53 as a biomarker in predicting oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Sarkomy kostei miagkikh tkanei i opukholi kozhi = Bone and Soft Tissue Sarcomas, Tumors of the Skin* 2023;15(2):25–37. (In Russ.). DOI: 10.17650/2782-3687-2023-15-2-25-37

Введение

Эпидемиологический ландшафт плоскоклеточной карциномы ротоглотки (ПККР) быстро изменился. Это связано с тем, что вирус папилломы человека (ВПЧ) стал все более распространенным основным этиологическим фактором. По данным эпидемиологических исследований, в 2018 г. в мире диагностированы почти 100 тыс. новых случаев ПККР; более 50 тыс. пациентов с данной патологией умерли [1]. Более чем в 60 % случаев ПККР связана с персистенцией ВПЧ [2]. В последние два десятилетия наблюдалось резкое увеличение числа пациентов 20–60 лет с ВПЧ-положительной ПККР [3, 4]. Доля этой патологии в 2021 г. составила в среднем 33 %, однако ее распространенность значительно варьирует (от 0 до 85 % случаев) в зависимости от региона [5]. По заболеваемости ПККР Республика Узбекистан занимает 7-е место среди стран Азии. Стандартизованные по возрасту показатели на 100 тыс. населения по мировому стандарту составляют 0,92, а смертности — 0,60 [6].

Вирус папилломы человека повреждает специфичные к нему базальные клетки плоского эпителия ротоглотки, в результате он вызывает только плоскоклеточную карциному и не считается причиной развития других гистологических типов карциномы. После проникновения ВПЧ в базальные клетки плоского эпителия ротоглотки его ранние белки (преимущественно

Е6 и Е7) контролируют клеточный цикл и обеспечивают продолжение пролиферации клеток в супрабазальных слоях. Белок-онкосупрессор p53, активно участвующий в контроле клеточного цикла, расщепляется через убиквитинзависимую протеолитическую систему под воздействием раннего белка Е6 ВПЧ. В свою очередь, это приводит к потере контрольных точек клеточного цикла, ингибированию апоптоза, дерегуляции системы ответа на повреждение ДНК и в конечном счете к дестабилизации клеточного генома.

Опухоли, ассоциированные с ВПЧ, в большинстве случаев характеризуются своеобразными иммунологическими микроокружениями, которые способны влиять на исходы лечения [7]. Соответственно, чем больше иммуносупрессивных клеток в микроокружении опухоли, тем слабее реакция на лечение, хуже его результаты и показатели выживаемости пациентов с ПККР. Регуляторный путь адаптивного иммунитета PD-L1 (programmed death-ligand 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1) / PD-1 (programmed death ligand 1, рецептор программируемой клеточной гибели 1) играет большую роль в формировании стойкой инфекции ВПЧ, а также в сопротивлении иммунной элиминации во время развития инвазивного рака [8]. Изучение функционального ландшафта PD-L1 — одна из самых интересных областей исследований в онкологии, достижения в которой могут изменить стратегию терапии ПККР.

Согласно данным авторов, ВПЧ-положительная ПМКР имеет значительно лучший ответ на химио-радиотерапию и более высокие показатели общей выживаемости (ОВ) по сравнению с ВПЧ-отрицательной ПМКР [9]. Это вызвало интерес к изучению перспектив стратегии деинтенсификации лечения относительно снижения его токсических эффектов без ущерба для онкологических исходов [10]. Однако положительный ВПЧ-статус не единственный прогностический биомаркер в стратификации риска у пациентов с ВПЧ-положительной ПМКР. У определенных подгрупп больных ВПЧ-положительной ПМКР (20–30 % случаев) отмечается тенденция к возникновению рецидивов, что приводит к ухудшению результатов лечения [10]. Наиболее значительным препятствием для определения больных с высоким риском развития рецидива является отсутствие клинически полезных прогностических биомаркеров, помимо определения ВПЧ-статуса. Идентификация молекулярных прогностических биомаркеров может расширить представления о биологических особенностях ПМКР и способствовать разработке новых комбинированных стратегий.

Исходя из вышесказанного, **цель исследования** — изучение прогностической роли экспрессии PD-L1 и белка p53 при ПМКР с учетом ВПЧ-статуса.

Материалы и методы

В наше ретроспективное исследование вошли 62 пациента с ПМКР стадии T1–4N0–3M0 (по 7-му изданию классификации Tumor, Nodus and Metastasis, TNM), получавшие лечение в 2015–2020 гг. в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре онкологии и радиологии и его филиалах, расположенных в двух крупных городах Узбекистана — Ташкенте и Самарканде. Первоначально были проанализированы данные 114 больных с гистологическим подтверждением ПМКР. Из этих пациентов для дальнейшего более глубокого анализа отобраны 62 пациента, имеющие архивный гистологический материал и соответствующие критериям включения в исследование.

Критериями включения в исследование являлись гистологически подтвержденная плоскоклеточная карцинома, локализация опухоли в ротоглотке (небной миндалине, основании языка, мягком небе, боковой и задней стенках), отсутствие отдаленных метастазов при установлении диагноза, получение противоопухолевой терапии и возраст 18 лет и старше.

Была создана база данных собранных случаев ПМКР с использованием ведомственных реестров рака и медицинских карт пациентов в соответствии с методологическими требованиями. Всем ретроспективно отобраным пациентам ($n = 62$) проведено иммуногистохимическое исследование с целью определения p16^{INK4a}, PD-L1 и p53 в образцах опухолевой

ткани, фиксированных формалином и залитых в парафин. Обнаружение белка p16^{INK4a} с помощью иммуногистохимического (ИГХ) исследования является распространенным и надежным диагностическим инструментом, используемым в качестве косвенного биомаркера при установлении транскрипционно активного ВПЧ высокого риска у пациентов с ПМКР. В настоящей работе ИГХ-анализ белка p16^{INK4a} был единственным тестом для установления ВПЧ-статуса у больных ПМКР, который интерпретировался в соответствии с рекомендациями Американской коллегии патологоанатомов (College of American Pathologists, CAP) [11]. При отсутствии окрашивания и локальном окрашивании белка p16^{INK4a} или наличии <70 % окрашенных опухолевых клеток в образцах ВПЧ-статус считался отрицательным. Если ≥ 70 % опухолевых клеток демонстрировали сильное и диффузное ядерное и цитоплазматическое окрашивание, то они считались ВПЧ-положительными. Для определения повышенной экспрессии белка p16^{INK4a} использовали ИГХ-тест CInTec® Histology (Ventana Medical Systems, Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя, содержащий первичные моноклональные мышиные антитела клона Е6Н4, которые оптимально подходят для применения в системе Ventana BenchMark, в сочетании с комплектом OptiView DAB IHC Detection Kit.

В ходе исследования была создана классификация экспрессии 3 молекулярных биомаркеров в зависимости от степени выраженности ИГХ-проявлений (табл. 1). При ее разработке были приняты во внимание многие действующие международные протоколы.

Наличие повышенной экспрессии p16^{INK4a} само по себе не может быть надежным предиктором исходов ПМКР. Поэтому с целью выявления дополнительных предикторов, влияющих на исход данного заболевания, оценивали интенсивность экспрессии PD-L1 и p53, которые также участвуют в канцерогенной трансформации и дальнейшем прогрессировании ПМКР, с учетом ВПЧ-статуса.

Экспрессию PD-L1 оценивали с помощью кроличьих моноклональных антител клона SP263 (Ventana Medical Systems, Inc., США) на автоматическом иммуногистохимическом устройстве Ventana BenchMark по стандартным протоколам в образцах опухолевой ткани, фиксированных формалином и залитых в парафин. Уровень экспрессии PD-L1 определяли по доле положительно окрашенных опухолевых клеток (tumor proportion score, TPS), демонстрирующих частичное линейное или полное круговое окрашивание мембраны. Результаты ИГХ-анализа PD-L1 оценивали как положительные при TPS ≥ 1 %. В соответствии с количеством окрашенных опухолевых клеток уровень PD-L1 классифицирован как отрицательный. При TPS 0–0,9 % считалось, что экспрессия PD-L1 отсутствует (PD-L1-N), при TPS 1–9 % — что ее уровень низкий (PD-L1-L), при TPS 10–29 % —

Таблица 1. Рекомендуемая классификация экспрессии молекулярных биомаркеров p16INK4a, лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) и p53 в зависимости от доли положительно окрашенных опухолевых клеток (tumor proportion score, TPS), %

Table 1. Recommended classification of p16INK4a, programmed death-ligand 1 (PD-L1) and molecular biomarker expression depending on the percent of positively stained tumor cells (tumor proportion score, TPS), %

Биомаркер Biomarker	Окрашивание Staining	Экспрессия Expression	Пороговое значение TPS Threshold TPS value	Низкий уровень экспрессии (L) Low expression level (L)	Средний уровень экспрессии (M) Medium expression level (M)	Высокий уровень экспрессии (H) High expression level (H)	Очень высокий уровень экспрессии (VH) Very high expression level (VH)
p16 ^{INK4a}	Цитоплазма + ядро Cytoplasm + nucleus	Отрицательная Negative Положительная Positive	0–49 ≥50	– –	– 50–69	– 70–89	– ≥90
PD-L1 (TPS)	Мембрана Membrane	Отрицательная Negative Положительная Positive	0–0,9 ≥1	– 1–9	– 10–29	– 30–49	– ≥50
p53 ^{M/W}	Ядро Nucleus	Отрицательная Negative Положительная Positive	0–9 ≥10	– 10–29	– 30–49	– 50–79	– ≥80

Примечание. p53^M – мутантный тип белка p53; p53^W – дикий тип белка p53.

Note. p53^M – mutant p53 protein; p53^W – wild type p53 protein.

средний (PD-L1-M), при TPS 30–49 % – высокий (PD-L1-H) и при TPS ≥50 % – очень высокий (PD-L1-VH) (см. табл. 1).

При определении экспрессии белка p53 в образцах опухолевой ткани, фиксированных формалином и залитых в парафин, были использованы моноклональные мышиные антитела клона Bp53-11 (Ventana Medical Systems, Inc., США) на автоматизированной системе для проведения ИГХ-реакций Ventana BenchMark. Первичные антитела клона Bp53-11 детерминируют как мутантный, так и дикий тип ядерного белка p53 (p53^W) (Tissue Diagnostics Product Catalog 2021, Roche Diagnostics). Пороговым значением положительной экспрессии мутантного типа p53 (p53^M) было установлено окрашивание ядер ≥10 % опухолевых клеток. Экспрессия мутантного белка p53 считалась отрицательной при TPS 0–9 % (p53^M-N). При TPS 10–29 % ее уровень оценивали как низкий (p53^M-L), при TPS 30–49 % – как средний (p53^M-M), при TPS 50–79 % – как высокий (p53^M-H), при TPS ≥80 % – как очень высокий (p53^M-VH). Аналогично оценивался p53^W (см. табл. 1).

Статистический анализ выполняли с помощью программы SPSS Statistics версии 26.0 под управлением

пользовательской операционной системы Windows 10. Взаимосвязь между экспрессией PD-L1, p53 и ВПЧ-статусом оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r-Пирсона). При сравнительном анализе средних значений применялся *t*-критерий Стьюдента для выборок. Для описания кривых выживания использовали метод Каплана–Мейера, а значимость различий между группами определяли с помощью логарифмического рангового критерия. Общая выживаемость определялась с момента первоначального установления диагноза до даты смерти пациента от любой причины. Для оценки влияния переменных на ОВ использовалась регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса. Также оценивали отношение рисков (ОР) и 95 % доверительный интервал (ДИ). Значение *p* < 0,05 считалось статистически значимым.

Результаты

Полные клинико-демографические характеристики пациентов и общая частота экспрессии PD-L1 и p53 в общей группе и группах пациентов с разным ВПЧ-статусом представлены в табл. 2. Средняя продолжительность наблюдения составила 41,8 мес (2–107 мес).

Таблица 2. Характеристика пациентов и частота экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) и p53**Table 2.** Patient characteristics and frequency of programmed death-ligand 1 (PD-L1) and p53 expression

Показатель Parameter	Общая группа (n = 62) Total group (n = 62)	ВПЧ+ (n = 28) HPV+ (n = 28)	ВПЧ– (n = 34) HPV– (n = 34)	p
Пол, n (%): Sex, n (%): мужской male женский female	35 (56,5) 27 (43,5)	16 (57,1) 12 (42,9)	19 (55,9) 15 (44,1)	0,922
Оценка по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG), n (%): Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) score, n (%): 0 1 2 3	3 (4,8) 26 (41,9) 32 (51,6) 1 (1,6)	2 (7,1) 15 (53,6) 11 (39,3) 0	1 (2,9) 11 (32,4) 21 (61,8) 1 (2,9)	0,039
Локализация первичной опухоли, n (%): Primary tumor location, n (%): миндалины tonsils основание языка base of the tongue мягкое небо soft palate боковая стенка lateral wall задняя стенка posterior wall	39 (62,9) 6 (9,7) 4 (6,5) 8 (12,9) 5 (8,1)	23 (82,1) 3 (10,7) 1 (3,6) 1 (3,6) 0	16 (47,1) 3 (8,8) 3 (8,8) 7 (20,6) 5 (14,7)	0,001
Курение, n (%): Smoking, n (%): да yes нет no	37 (59,7) 25 (40,3)	5 (17,9) 23 (82,1)	20 (58,8) 14 (41,2)	0,001
Употребление алкоголя, n (%): Alcohol consumption, n (%): да yes нет no	15 (24,2) 47 (75,8)	3 (10,7) 25 (89,3)	12 (35,3) 22 (64,7)	0,024
Т-стадия, n (%): T stage, n (%): T1 T2 T3 T4	1 (1,6) 17 (27,4) 30 (48,4) 14 (22,6)	1 (3,6) 13 (46,4) 13 (46,4) 1 (3,6)	0 4 (11,8) 17 (50) 13 (38,2)	<0,001
N-стадия, n (%): N stage, n (%): N0 N1 N2 N3	19 (30,6) 20 (32,3) 20 (32,3) 3 (4,8)	9 (32,1) 9 (32,1) 9 (32,1) 1 (3,6)	10 (29,4) 11 (32,4) 11 (32,4) 2 (5,9)	0,747

Окончание табл. 2
End of table 2

Показатель Parameter	Общая группа (n = 62) Total group (n = 62)	ВПЧ+ (n = 28) HPV+ (n = 28)	ВПЧ– (n = 34) HPV– (n = 34)	p
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) 7-го издания, n (%): 7 th edition Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) stage, n (%):				
1	0	0	0	0,061
2	6 (9,7)	4 (14,3)	2 (5,9)	
3	26 (41,9)	14 (50)	12 (35,3)	
4	30 (48,4)	10 (35,7)	20 (58,8)	
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) 8-го издания, n (%): 8 th edition Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) stage, n (%):				
1	9 (14,5)	9 (32,1)	0	<0,001
2	19 (30,6)	17 (60,7)	2 (5,9)	
3	14 (22,6)	2 (7,1)	12 (35,3)	
4	20 (32,3)	0	20 (58,8)	
PD-L1, n (%): PD-L1, n (%):				
да yes	37 (59,7)	17 (60,7)	20 (58,8)	0,882
нет no	25 (40,3)	11 (39,3)	14 (41,2)	
p53 ^M , n (%): да yes	28 (45,2)	1 (3,6)	27 (79,4)	<0,001
нет no	34 (54,8)	27 (96,4)	7 (20,6)	
p53 ^W , n (%): да yes	5 (8,1)	5 (17,9)	0	0,01
нет no	57 (91,9)	23 (82,1)	34 (100)	

Примечание. p53^M – мутантный тип белка p53; p53^W – дикий тип белка p53; ВПЧ – вирус папилломы человека; PD-L1 – programmed death ligand 1, рецептор программируемой клеточной гибели 1.

Note. p53^M – mutant p53 protein; p53^W – wild type p53 protein; HPV – human papilloma virus; PD-L1 – programmed death ligand 1.

Среди 62 пациентов с ПККР было 35 (56,5 %) мужчин и 27 (43,5 %) женщин (1,3 : 1). На первом этапе исследования все больные были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли 28 (45,2 %) пациентов с ВПЧ-положительной ПККР, во 2-ю – 34 (54,8 %) пациента с ВПЧ-отрицательной ПККР. Локализация опухоли в анатомических отделах ротоглотки в группах различалась в зависимости от ВПЧ-статуса. В отличие от других групп у 26 (92,8 %) пациентов с ВПЧ-положительным статусом опухоли локализовались в небной миндалине и основании языка ($p < 0,001$). Опухоли, исходящие

из небной миндалины и основания языка, богатые лимфоидной тканью, были включены в тонзиллярную группу, а опухоли, развившиеся из мягкого неба, боковых и задних стенок, – в нетонзиллярную.

Более чем у 37 (59,7 %) пациентов общей группы выявлена положительная экспрессия белка PD-L1, у 25 (40,3 %) – отрицательная. Общая частота экспрессии PD-L1 в группах с разным ВПЧ-статусом существенно не различалась; результаты были статистически незначимы ($p = 0,882$). Отмечались незначительные различия уровня p53^M. Положительная экспрессия

этого белка выявлена у 28 (45,2 %) пациентов общей группы, отрицательная — у 34 (54,8 %). Во 2-й группе $p53^M$ обнаружен у 27 (79,4 %) больных, его отсутствие наблюдалось в 7 (20,6 %) случаях. У пациентов 1-й группы с ВПЧ-положительным статусом $p53^M$ был идентифицирован (как исключение) только в 1 (3,6 %) случае ($p < 0,001$). В общей группе положительная экспрессия белка $p53^W$ выявлена только у 5 (8,1 %) пациентов с положительным ВПЧ-статусом. У остальных 57 (91,9 %) больных общей группы экспрессия $p53^W$ не была определена (негативные паттерны), у пациентов с отрицательным ВПЧ-статусом присутствие этого белка также не идентифицировано ($p = 0,01$).

Результаты ИГХ-анализа показали, что экспрессия PD-L1 высокого и очень высокого уровней в основном была обнаружена во 2-й группе, а низкого и среднего — в 1-й ($p = 0,254$) (рис. 1). У 27 (79,4 %) пациентов с отрицательным ВПЧ-статусом наблюдалась положительная экспрессия $p53^M$: в основном $p53^M$ -H (в 12 (35,29 %) случаях) и $p53^M$ -VH (в 7 (20,59 %) случаях) ($p < 0,001$). У 4 (6,5 %) из 5 (8,1 %) больных с положительной экспрессией $p53^W$ наблюдался низкий уровень экспрессии $p53^W$, у 1 (1,6 %) — средний уровень; у всех этих пациентов был положительный ВПЧ-статус. В группе

отрицательного ВПЧ-статуса $p53^W$ не идентифицирован ($p = 0,015$).

Отношение рисков положительной экспрессии PD-L1 в общей группе составило 1,082 (95 % ДИ 0,390–3,002), в группе пациентов с положительным ВПЧ-статусом — 1,036 (95 % ДИ 0,656–1,636), в группе пациентов с отрицательным ВПЧ-статусом — 0,958 (95 % ДИ 0,545–1,683). Хотя существенных различий между группами практически не выявлено, ОР было несколько выше у больных с наличием ВПЧ. Положительная экспрессия PD-L1 немного чаще встречалась у мужчин (23/62; 37,10 %). У женщин она наблюдалась в 22,58 % (14/62) случаев. Отрицательная экспрессия обнаруживалась почти одинаково часто у мужчин (12 (19,35 %) случаев) и женщин (13 (20,97 %) случаев) (рис. 2). Риск выявления PD-L1 у пациентов мужской популяции оказался выше (ОР 1,374; 95 % ДИ 0,786–2,403), чем у женщин (ОР 0,772; 95 % ДИ 0,478–1,247). Отношение рисков положительной экспрессии $p53^M$ в общей группе составило 0,010 (95 % ДИ 0,001–0,083), в группе пациентов с отрицательным ВПЧ-статусом — 22,235 (95 % ДИ 3,220–153,534), в группе пациентов с положительным ВПЧ-статусом — 0,214 (95 % ДИ 0,110–0,415), а ОР положительной экспрессии $p53^W$ у больных с ВПЧ — 0,404 (95 % ДИ 0,294–0,553). В общей группе

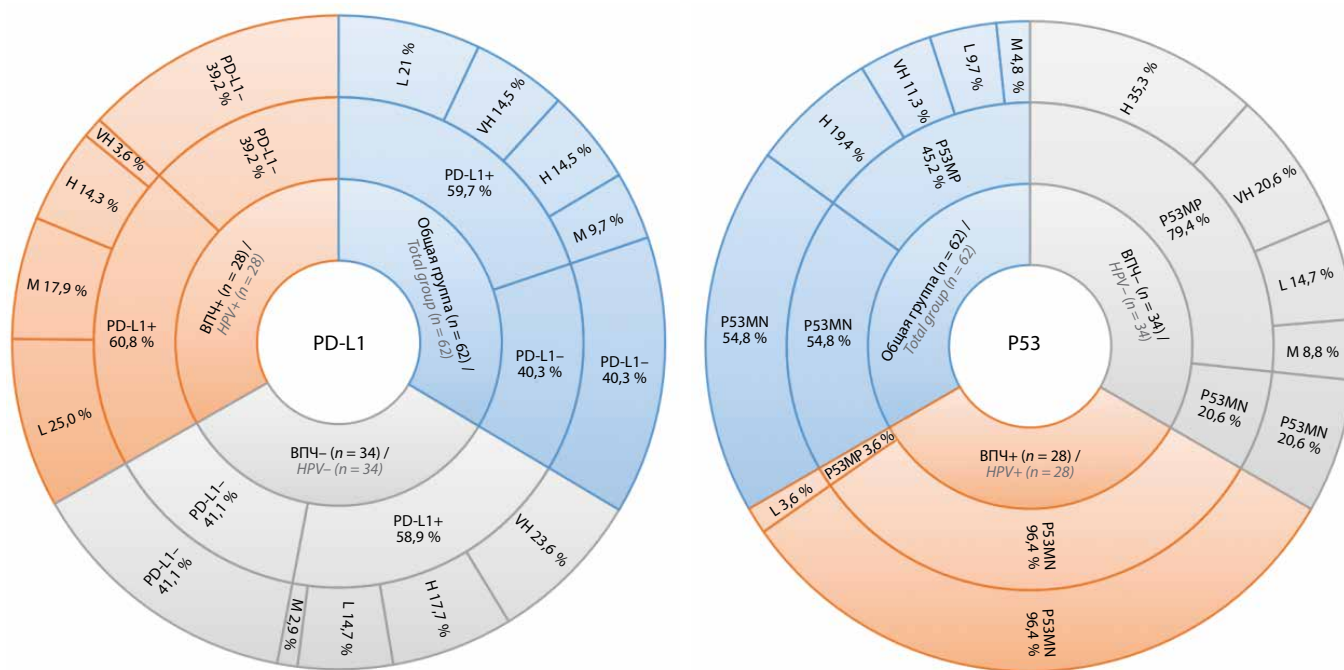


Рис. 1. Распределение пациентов по группам в зависимости от уровней экспрессии рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) и мутантного типа p53 ($p53^M$). $p53^MP$ – наличие экспрессии $p53^M$; $p53^MN$ – отсутствие экспрессии $p53^M$; ВПЧ – вирус папилломы человека; L – низкий уровень экспрессии; M – средний уровень экспрессии; H – высокий уровень экспрессии; VH – очень высокий уровень экспрессии

Fig. 1. Patient distribution per groups depending on the programmed death ligand 1 (PD-L1) and mutant p53 ($p53^M$) expression. $p53^MP$ – positive $p53^M$ expression; $p53^MN$ – negative $p53^M$ expression; HPV – human papilloma virus; L – low expression level; M – medium expression level; H – high expression level; VH – very high expression level

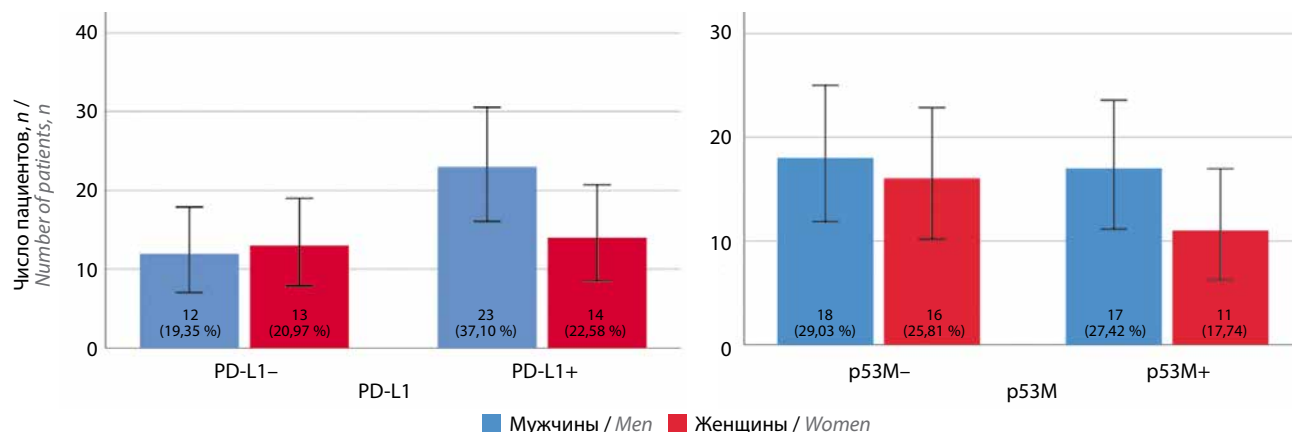


Рис. 2. Распределение пациентов разного пола в зависимости от экспрессии рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) и мутантного типа p53 (p53^M)

Fig. 2. Distribution of patients of different sexes per the programmed death-ligand 1 (PD-L1) and mutant p53 (p53^M) expression

положительная экспрессия p53^M чаще выявлялась у мужчин (17/62; 27,42 %), чем у женщин (11/62; 17,74 %), а отрицательная экспрессия — примерно одинаково часто (18/62; 29,03 % и 16/62; 25,81 % соответственно) (см. рис. 2). Отношение рисков положительной экспрессии p53^M у мужчин составило 1,198 (95 % ДИ 0,669–2,144), у женщин — 0,872 (95 % ДИ 0,564–1,347), что свидетельствует о высокой активности мутантного типа этого белка у мужчин.

Детерминация онкогенной роли ВПЧ в диагностике ПККР является очень важным требованием, поскольку механизм развития заболевания с патогенетической точки зрения может быть усложнен, если взаимодействуют несколько видов факторов риска. В связи с этим помимо статуса ВПЧ мы изучали

дополнительные молекулярные факторы для оценки их прогностической роли при ВПЧ-положительной ПККР. Повышенная экспрессия косвенного биомаркера вирусной инфекции p16^{INK4a} ассоциирована с отрицательной экспрессией p53^M мутантного типа и положительной экспрессией p53^W, а также с незначительной положительной экспрессией PD-L1.

Для оценки взаимосвязи между молекулярными предикторами (PD-L1, p53^M, p53^W) и ВПЧ-статусом применен коэффициент корреляции Пирсона. Выявлено, что между ВПЧ-статусом и уровнем экспрессии PD-L1 практически не было значимой взаимосвязи ($r = 0,019$; $p = 0,882$), а также обнаружена слабая отрицательная корреляция с дифференциальной экспрессией этого биомаркера ($r = -0,147$; $p = 0,254$) (табл. 3). Между p53^M

Таблица 3. Корреляционный анализ статуса вируса папилломы человека (ВПЧ) и молекулярных биомаркеров

Table 3. Correlation analysis of human papilloma virus (HPV) status and molecular biomarkers

Показатель Parameter	Корреляция Correlation	ВПЧ-статус HPV status	PD-L1	p53 ^M	p53 ^W
ВПЧ HPV	Коэффициент Пирсона Pearson coefficient	1	0,019	–0,758	0,326
	p	—	0,882	<0,001	0,010
PD-L1	Коэффициент Пирсона Pearson coefficient	0,019	1	0,019	0,123
	p	0,882	—	0,882	0,342
p53 ^M	Коэффициент Пирсона Pearson coefficient	–0,758	0,019	1	–0,269
	p	<0,001	0,882	—	0,035
p53 ^W	Коэффициент Пирсона Pearson coefficient	0,326	0,123	–0,269	1
	p	0,010	0,342	0,035	—

Примечание. PD-L1 — programmed death ligand 1, рецептор программируемой клеточной гибели 1; p53^M — мутантный тип белка p53; p53^W — дикий тип белка p53.

Note. PD-L1 — programmed death-ligand 1; p53^M — mutant p53 protein; p53^W — wild type p53 protein.

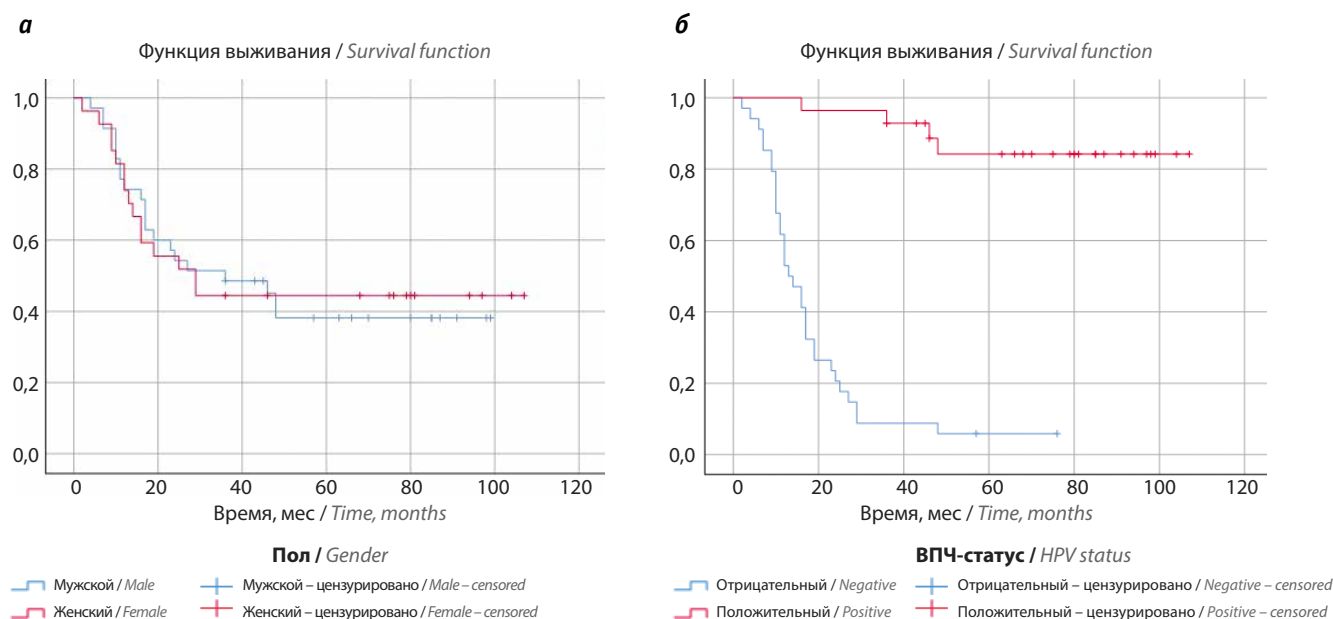


Рис. 3. Показатели общей выживаемости пациентов в зависимости от пола (а) и статуса вируса папилломы человека (ВПЧ) (б)
Fig. 3. Overall survival depending on gender (a) and human papilloma virus (HPV) status (b)

и ВПЧ-статусом показана очень сильная отрицательная корреляция с высокой статистической достоверностью ($r = -0,758$; $p < 0,001$), а между $p53^w$ и ВПЧ-статусом – умеренная положительная корреляция ($r = 0,326$; $p = 0,01$). Когда взаимосвязь между предикторами анализировалась без учета ВПЧ-статуса, PD-L1 имел слабую положительную корреляцию со всеми другими переменными, а $p53^M$ – низкую отрицательную корреляцию с $p53^w$ ($r = -0,269$; $p = 0,035$). В ходе корреляционного анализа с участием $p53^w$ обнаружена иная закономерность: наблюдалась отрицательная корреляция со всеми факторами, кроме PD-L1.

Медиана ОВ мужчин составила 36 мес (95 % ДИ 14,2–57,8), женщин – 29 мес (95% ДИ 12,1–45,9), однако к концу наблюдения кривая выживаемости стала несколько выше в женской популяции ($p = 0,092$) (рис. 3). Дихотомическое распределение пациентов по ВПЧ-статусу привело к возникновению сильной разницы в выживаемости между группами, поскольку у больных с положительным ВПЧ-статусом эти показатели были значительно лучше по сравнению с больными с отрицательным ВПЧ-статусом: медиана не достигнута, 2-летняя выживаемость – 96,4 %, медиана – 13 мес, 2-летняя выживаемость – 23,5 % соответственно ($p < 0,001$) (табл. 4).

Таблица 4. Показатели общей выживаемости пациентов в зависимости от ВПЧ-статуса

Table 4. Overall survival depending on HPV status

Показатель Parameter	Медиана ОВ, мес Median OS, months	2-летняя выживаемость, % 2-year survival, %	КР RC	ОР HR	95 % ДИ 95 % CI	<i>p</i>
Пол: Sex:						
мужчины men	36	57,2	–0,034	0,967	0,498–1,876	0,921
женщины women	29	55,6				
ВПЧ-статус: HPV status:						
ВПЧ+ HPV+	Нет данных No data	96,4	–2,933	0,053	0,018–0,156	<0,001
ВПЧ– HPV–	13	23,5				

Примечание. ВПЧ – вирус папилломы человека; КР – коэффициент регрессии; ОР – отношение рисков; ОВ – общая выживаемость; ДИ – доверительный интервал.

Note. HPV – human papilloma virus; RC – regression coefficient; RR – hazard ratio; OS – overall survival; CI – confidence interval.

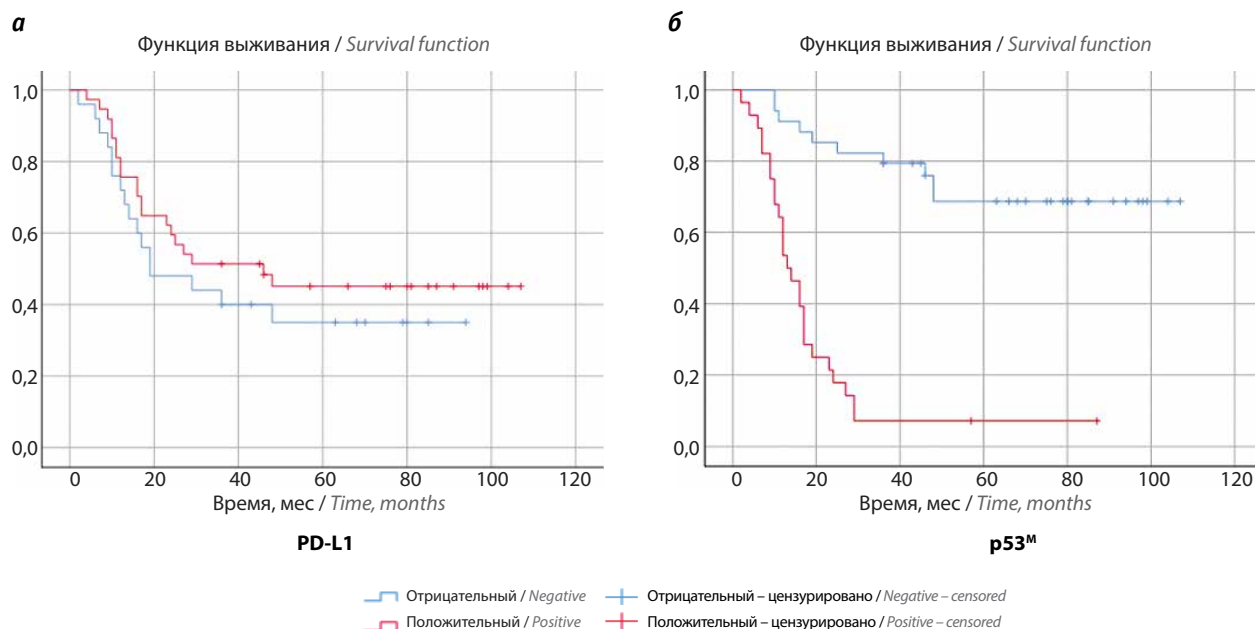


Рис. 4. Показатели общей выживаемости пациентов в зависимости от экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) (а) и мутантного типа белка p53 (p53^M) (б)

Fig. 4. Overall survival depending on programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression (а) and mutant p53 (p53^M) protein expression (б)

Для изучения зависимости времени дожития от независимых переменных и прогнозирования риска наступления новых событий был использован метод регрессии Кокса. Выявлено, что ВПЧ-статус и пол пациентов характеризовались отрицательными коэффициентами регрессии, при этом пол сильнее влиял на риск смерти, чем ВПЧ-статус (0,967 против 0,053) (см. рис. 3).

В общей популяции у пациентов с положительной экспрессией PD-L1 наблюдалась немного более длительная выживаемость, чем у пациентов с отрицательной экспрессией этого белка ($p = 0,364$) (рис. 4), однако у больных с положительной экспрессией p53^M показатели выживаемости были хуже по сравнению с больными с отрицательной экспрессией данного маркера ($p < 0,001$) (табл. 5). Установлено, что p53^M

является доминантным фактором риска с отрицательным влиянием на выживаемость пациентов (коэффициент регрессии = 2,067; ОР 7,901; 95 % ДИ 3,653–17,090; $p < 0,001$).

Обсуждение

Уникальные молекулярные характеристики ВПЧ, модуляция биологического цикла инфицированных клеток и их уклонение от иммунного ответа демонстрируют специфические клинические и биологические характеристики ВПЧ-положительной ПККР.

Чем массивнее нарушение онкосупрессорной функции белка p53 и сильнее иммунотолерантное микроокружение, тем пациенты становятся менее чувствительными к лечению и имеют более низкие показатели выживаемости.

Таблица 5. Показатели общей выживаемости пациентов в зависимости от экспрессии p53^M

Table 5. Overall survival depending in p53^M expression

Группа Group	Медиана (мес) Median (months)	2-летняя выживаемость, % 2-year survival, %	КР RC	ОР HR	95 % ДИ 95 % CI	p
PD-L1– PD-L1+	19 46	48,0 60,5	– 0,30	0,74	0,39–1,43	0,372
p53 ^M – p53 ^M +	Нет данных / No data 13	85,3 21,4	2,07	7,90	3,65–17,09	<0,001

Примечание. КР – коэффициент регрессии; ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал; p53^M – мутантный тип белка p53; PD-L1 – programmed cell death ligand 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1.

Note. RC – regression coefficient; HR – hazard ratio; CI – confidence interval; p53^M – mutant p53 protein; PD-L1 – programmed cell death-ligand 1.

Защитные механизмы ВПЧ эволюционировали для предотвращения передачи иммунных сигналов и обеспечения продолжения репликации в организме. Следовательно, потенциально это может поддерживать длительную инфекцию, ведущую к интеграции вирусного генома и развитию рака. Надежная защита от персистенции ВПЧ требует интеграции эрадирующих эффектов врожденной и адаптивной иммунных систем. Адаптивный иммунитет и его клетки, особенно Т-клетки, играют большую роль в уничтожении ВПЧ [12]. Для активации Т-лимфоцитов необходимы как минимум 2 сигнала. Первый происходит, когда Т-клеточные рецепторы распознают специфический пептид, представленный молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС I и/или МНС II) на антигенпрезентирующих клетках. Второй сигнал возникает, когда костимуляторные молекулы (CD28) связываются со своими селективными лигандами (CD80/86). Отсутствие любого из этих сигналов приводит к анергии или апоптозу Т-клеток, что является одним из механизмов иммунной толерантности. Помимо этих активирующих сигналов также существуют ингибирующие рецепторы. Лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 представляет собой белок клеточной поверхности, который может быть экспрессирован на различных типах клеток, включая раковые клетки, макрофаги, антигенпрезентирующие клетки, Т-клетки и др. Персистирующая вирусная инфекция или специфическое микроокружение опухоли провоцирует истощение эффекторных сил Т-клеток за счет усиления экспрессии PD-L1 для избегания иммунного ответа [13]. Путь PD-L1/PD-1 поддерживает баланс между толерантностью и аутоиммунитетом, поэтому его дефицит или избыточная функция может привести к различному течению заболевания [14]. Опухолевые клетки, экспрессирующие PD-L1, при связывании с PD-1 подавляют активность Т-клеток и могут препятствовать активации субпопуляции эффекторных Т-клеток [15]. Соответственно, блокирование взаимодействия PD-L1 и PD-1 может улучшить эффективность Т-лимфоцитов и быть инструментом для предотвращения и устранения опухолевого роста [16].

Несмотря на деградацию p53 под воздействием E6 ВПЧ, дикий вариант этого белка обнаруживается в небольшом количестве в ВПЧ-положительной ПККР. Редкое возникновение мутаций в гене *TP53* при ВПЧ-положительной ПККР обеспечивает сохранение активности p53^w. Ингибирование активности p53^w в ВПЧ-отрицательной ПККР может быть обусловлено подавлением неповрежденного аллеля гена *TP53* за счет потери гетерозиготности или усиления онкогенной функции p53^m. Это свидетельствует о том, что белок p53 имеет большое значение в прогнозировании клинического течения ПККР, поскольку одной из основных его функций является обеспечение стабиль-

ности генома за счет контроля клеточного цикла и репарации ДНК.

Таким образом, сокращение объема лечения при ведении пациентов с выраженной инфильтрацией иммунных клеток в ВПЧ-положительных опухолях может быть оправданно, открывает большие возможности для деинтенсификации лечения и повышает уровень эффективности терапии. Результаты исследований подтверждают, что для ВПЧ-положительной ПККР характерны значительно лучшие ответ на лечение и показатели ОВ по сравнению с ВПЧ-отрицательной ПККР. Согласно полученным данным у пациентов с положительными ВПЧ-статусом и экспрессией PD-L1 наблюдаются более высокие показатели ОВ по сравнению с пациентами с отрицательными ВПЧ-статусом и экспрессией PD-L1 ($p = 0,261$). При низком и среднем уровнях экспрессии PD-L1 риск смерти снижается, особенно это характерно для пациентов с положительным ВПЧ-статусом, а высокая и очень высокая экспрессия данного белка увеличивает риск смерти, что более характерно для ВПЧ-отрицательной группы ($p = 0,019$). Во всех случаях выявлена отрицательная корреляция между p53^m и ВПЧ-статусом, которые оценивались как противодействующие факторы ($p < 0,001$). Только в группе пациентов с отрицательными ВПЧ-статусом и экспрессией p53^m наблюдалось незначительное увеличение показателей выживаемости по сравнению с группой пациентов с положительными ВПЧ-статусом и экспрессией этого белка ($p < 0,001$). При высоком и очень высоком уровнях экспрессии p53^m выявлено большее ухудшение показателей выживаемости, чем при низком и среднем ее уровнях. Хотя белок p53^w обнаруживается у небольшого числа пациентов, он показывает положительную корреляцию с ВПЧ-статусом и является защитным фактором, снижающим риск смерти ($p = 0,01$).

Таким образом, с одной стороны, интенсивность экспрессии PD-L1 характеризует сбалансированный ответ иммунной системы хозяина, а с другой, может вызывать периферическую иммунотолерантность, что создает условия для опухолевой прогрессии. Нарушение функции белка p53 под воздействием E6 ВПЧ тесно связано с модуляцией контроля клеточного цикла и последующим повышением пролиферативной активности, что приводит к потере стабильности генома из-за сокращения антрактов точек рестрикции и нарушения в системе репарации ДНК. В ВПЧ-инфицированных клетках деградация онкосупрессоров Rb и p53, связанная с ранними белками E6 и E7 ВПЧ, приводит к стабильной активации фактора транскрипции E2F [17]; несмотря на высокую активность белка p16^{INK4a}, его онкосупрессорные мотивы не реализуются.

Согласно полученным результатам опухоли с приемлемой вариацией экспрессии молекулярных биомаркеров (p16^{INK4a} — 70–100 % (ВПЧ+) / PD-L1 —

0–30 %, TPS/p53^W+/53^M–) представляют собой идеальную популяцию для изучения возможности деинтенсификации лечения с учетом низкого риска смерти и высоких показателей выживаемости, поскольку в основном это характерно для пациентов с положительным ВПЧ-статусом. Опухоли, имеющие неприемлемую вариацию экспрессии молекулярных биомаркеров (p16^{INK4a} – 0–70 % (ВПЧ–) / PD-L1 – 30–100 %, TPS/p53^W–/p53^M+), демонстрируют противоположные результаты (в основном такие показатели наблюдаются у больных с отрицательным ВПЧ-статусом).

Заключение

Определение ВПЧ-статуса является важным биомаркером и стандартом в лечении и прогнозировании ПЖКР. Однако, в отличие от персистенции ВПЧ, стойкие изменения в геноме клеток, полное нарушение контроля регуляции клеточного цикла и формирование иммунотолерантного микроокружения могут изменить течение заболевания. Зачастую это связано с интеграцией вирусной ДНК, дисфункцией белка опухолевого супрессора p53 как фактора транскрипции, эпигенетическим перепрограммированием и нарушением

активности иммунных контрольных точек. Соответственно, оценка интенсивности экспрессии онкосупрессорного белка p53 помогает определить биологию раковых клеток у пациентов с ПЖКР и спрогнозировать чувствительность к проводимой терапии, а путем изучения регуляции PD-L1 – предположить противоопухолевую иммунную регуляцию у этих больных. Надежные прогностические биомаркеры помогают раскрыть уникальные клиничко-молекулярные особенности заболевания и помочь принять правильное решение в сложных клинических обстоятельствах. Обычно ВПЧ-положительная ПЖКР дебютирует в относительно молодом возрасте, характеризуется вялотекущей клинической картиной и высокой чувствительностью к лечению. В этом контексте важными защитными биомаркерами являются положительный ВПЧ-статус и наличие p53^W. К таким биомаркерам относится и PD-L1 с экспрессией низкого и умеренного уровней. Мутантный тип p53 входит в группу факторов риска и отрицательно влияет на выживаемость пациентов с ПЖКР. Однако интерпретировать полученные результаты следует с осторожностью, поскольку для точных выводов необходимы более масштабные исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492
- Serrano B., Brotons M., Bosch F.X., Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018;47:14–26. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006
- Khalid M.B., Ting P., Pai A. et al. Initial presentation of human papillomavirus-related head and neck cancer: a retrospective review. *Laryngoscope* 2019;129(4):877–82. DOI: 10.1002/lary.27296
- Мудунов А.М. Вирус папилломы человека – новый этиологический фактор в развитии рака органов головы и шеи. Проблемы и перспективы их решения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2018;17(5):100–5. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-100-105
- Mudunov A.M. The human papilloma virus is a new etiologic factor in the development of cancer of the head and neck organs. Problems and prospects for their solution. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention* 2018;17(5):100–5. (In Russ.). DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-100-105
- Carlander A.F., Jakobsen K.K., Bendtsen S.K. et al. Contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide. *Viruses* 2021;13(7):1326. DOI: 10.3390/v13071326
- Global Cancer Observatory. Available at: <https://gco.iarc.fr/>.
- Стукань А.И., Чухрай О.Ю., Порханов В.А. и др. Орофарингеальная карцинома, ассоциированная с вирусом папилломы человека: тенденции эпидемиологии и методы выявления вируса в опухолях. *Опухоли головы и шеи* 2018;8(3):77–83. DOI: 10.17650/2222-1468-2018-8-3-77-83
- Stukan' A.I., Chukhray O.Yu., Porkhanov V.A. et al. Human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinoma: trends in epidemiology and methods for detecting the virus in tumors. *Opukholi golovy i shei = Head and Neck Tumors* 2018;8(3):77–83. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-1468-2018-8-3-77-83
- Hong A.M., Ferguson P., Dodds T. et al. Significant association of PD-L1 expression with human papillomavirus positivity and its prognostic impact in oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2019;92:33–9. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.03.012
- Zhou G., Liu Z., Myers J.N. TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. *J Cell Biochem* 2016;117(12):2682–92. DOI: 10.1002/jcb.25592
- 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
- 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
- Westrich J.A., Warren C.J., Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res* 2017;231:21–33. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.11.023
- Golrokh M.M., Taghizadeh M.D., Faghihloo E. The roles of programmed death ligand 1 in virus-associated cancers. *Infect Genet Evol* 2020;84:104368. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104368

14. Zamani M.R., Aslani S., Salmaninejad A. et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: a growing relationship. *Cell Immunol* 2016;310:27–41. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.09.009
15. Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020;10(3):727–42.
16. Philips G.K., Atkins M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int Immunol* 2015;27(1):39–46. DOI: 10.1093/intimm/idx095
17. Nishimura H., Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 2001;22(5):265–8. DOI: 10.1016/s1471-4906(01)01888-9

Вклад авторов

Д.Ш. Полатова: разработка дизайна исследования, обзор литературы по теме статьи, редактирование, руководство исследованием; А.Ю. Мадаминов, А.В. Савкин, А.Ж. Каххаров, Н.Б. Юлдашходжаева, Ш.К. Хужаев: анализ полученных данных, проведение статистического анализа, написание текста статьи;

Г.К. Ботиралиева, А.А. Мадалиев: проведение иммуногистохимического и микроскопического исследований.

Authors' contribution

D.Sh. Polatova: development of the design of the study, literature review on the topic of the article, editing, research management;

A.Yu. Madaminov, A.V. Savkin, A.Zh. Kakhkharov, N.B. Yuldashkhodzhaeva, Sh.K. Khuzhaev: analysis of the data obtained, statistical analysis, article writing;

G.K. Botiraliyeva, A.A. Madaliev: conducting immunohistochemical and microscopic studies.

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>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Ташкентского государственного стоматологического института.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Tashkent State Dental Institute.

Статья поступила: 01.03.2023. **Принята к публикации:** 31.03.2023.

Article submitted: 01.03.2023. **Accepted for publication:** 31.03.2023.