

*М.В. Мирочник³, В.В. Дворниченко^{1,2,3}, У.К. Масникова³, К.В. Толмачёв²,
И.В. Лисичникова³, И.Е. Митрошина³*

Роль папилломавируса в развитии опухолей орофарингеальной зоны и особенности его диагностики

¹ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,

²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России,

³ГБУЗ «Областной онкологический диспансер»,
г. Иркутск

Учитывая растущую роль папилломавирусной инфекции человека (ВПЧ) в канцерогенезе плоскоклеточного рака головы и шеи, понимание что ВПЧ-ассоциированный рак и ВПЧ-неассоциированный рак — это две различные нозологические формы рака ротоглотки, отсутствие единых стандартов и подходов в диагностике ВПЧ инфекции — основной задачей онкологического общества является внедрение в клиническую практику высокоточного, экономически эффективного, оптимального, технически осуществимого лабораторного метода диагностики ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки.

В представленном обзоре литературы отражены современные взгляды на канцерогенез и методы диагностики ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки, проанализированы сильные и слабые стороны методов, а также трудности, с которыми сталкиваются врачи в своей клинической практике при диагностике ВПЧ в различном материале (цитологическом и гистологическом).

Ключевые слова: орофарингеальный рак, ВПЧ-ассоциированный рак ротоглотки, полимеразная цепная реакция ДНК ВПЧ, гибридизация *in situ*, иммуногистохимическая и иммуноцитохимическая экспрессия p16

Введение

Роль вируса папилломы человека (ВПЧ) в канцерогенезе уже давно известна. Наиболее широко эта связь исследована при раке шейки матки. Также доказана роль вируса ВПЧ в развитии плоскоклеточного рака головы и шеи, изучается роль в развитии рака легких и пищевода [1]. Проведенные исследования показали возрастающую роль ВПЧ в канцерогенезе орофарингеального рака [2, 3, 4].

ВПЧ-ассоциированный плоскоклеточный рак ротоглотки составляет около 25% всех плоскоклеточных раков головы и шеи [5]. Чаще всего ВПЧ обнаруживают при раке небных и язычных

миндалин [6, 7], достаточно редко ВПЧ обнаруживается при раке полости рта и гортани [2, 4].

Большинство ВПЧ-ассоциированного орофарингеального рака связано с высоко-онкогенным типом ВПЧ-16 [4]. У мужчин установлено, что этот тип вируса выводится из организма наиболее медленно [3]. Интересно, что более 90% пациентов с ВПЧ-ассоциированным раком ротоглотки инфицированы именно этим типом вируса [3, 4]. Другие типы ВПЧ -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52, -56, -58, -59 и -68 встречаются реже [2, 4]. Распространенность ВПЧ инфекции при раке ротоглотки в различных исследованиях варьирует от 14 до 57% [4]. Заболеваемость раком ротоглотки увеличивается, причем на долю ВПЧ-ассоциированного рака приходится более 70%, в отличие от рака ротоглотки, связанного с табаком и алкоголем [8, 9, 10]. Так, в мире ежегодно регистрируется более 600 тыс. новых случаев рака органов головы и шеи, из них ассоциированы с ВПЧ — 37 тыс. (78% от этого числа приходится на долю рака ротоглотки) [8]. ВПЧ-ассоциированный рак ротоглотки чаще встречается у мужчин, чем у женщин [3, 4, 6, 8].

В восьмом издании AJCC (American Joint Committee on Cancer) / UICC TNM- ВПЧ-ассоциированный рак ротоглотки (p16 положительный) выделен в отдельную нозологическую форму, также произошли некоторые изменения стадий (для ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки категория T4 не подразделяется на T4a и T4b, а также не включается T0, произошли значительные изменения в категории N) [9, 10].

Помимо того, возрастная и медико-социальная категория пациентов с ВПЧ-ассоциированным плоскоклеточным орофарингеальным раком отлична от пациентов с табак-ассоциированным раком. Дальнейшее углубление в этот вопрос выявило, что пациенты с ВПЧ-позитивным и ВПЧ-негативным плоскоклеточным орофарингеальным раком имеют различный ответ на химиолучевое лечение и различный прогноз [9,10].

Вирусология и канцерогенез

Выделяют более 130 типов ВПЧ, и они классифицированы в группы с низким или высоким уровнем онкологического риска в зависимости от их канцерогенного потенциала. ВПЧ — это ДНК вирусы. Их геном представлен кольцевой двуспиральной ДНК, заключенной в капсид. Геном кодирует ранние белки (early proteins: E1-E7) и поздние белки (late proteins: L1 и L2) [3, 6]. В зависимости от внутриклеточной формы существования ВПЧ возможно развитие следующих форм инфекционного процесса:

– Эписомальная (невстроенная в ДНК хозяина) — персистенция ВПЧ в латентной форме, что встречается при папилломах. В этих случаях определить существование вируса возможно только методами, позволяющими выявлять его ДНК;

– Интегрированная форма (встречается при дисплазиях и плоскоклеточных опухолях).

Цикл репликации ВПЧ тесно связан с дифференцировкой клеток многослойного плоского эпителия [3, 6, 7]. ВПЧ поражает слой базальных клеток плоского эпителия крипт миндалин. Первоначально за счет белков E1 и E2 происхо-

дит амплификация кольцевых геномов ВПЧ. E1 и E2-зависимая репликация ДНК вируса не связана с ДНК клетки и циклом клетки, таким образом ВПЧ «сохраняет» свой геном в виде эписомальных мульти копий [11]. Белок E2 также подавляет синтез E6 и E7. В недавнем исследовании, установлено, что белок E2 участвует в регуляции генома хозяина [12]. ДНК ВПЧ следующим этапом встраивается в ДНК клетки-хозяина, это одно из ключевых звеньев вирус-ассоциированного канцерогенеза. Клетка начинает синтезировать вирусные белки E5, E6 и E7, которые защищают зараженную клетку от апоптоза и помогают ей делиться. Белок E6 связывается с E6-AP (E6-ассоциированный белок) клетки и вызывает деградацию белка опухолевого супрессора p53 через убиквитин-протеасомный путь [3, 6, 7, 11, 13]. E6 блокирует также и p300, который активирует p53 [13]. Оба пути приводят к снижению (не мутированного) p53. В свою очередь, мутация p53 характерна для ВПЧ-неассоциированного рака [3, 6, 7]. Вирусный белок E7 конкурирует с фактором транскрипции E2F за связывание с геном-супрессором опухоли ретинобластомы (pRb). Это приводит к инактивации pRb, высвобождению E2F и переходом

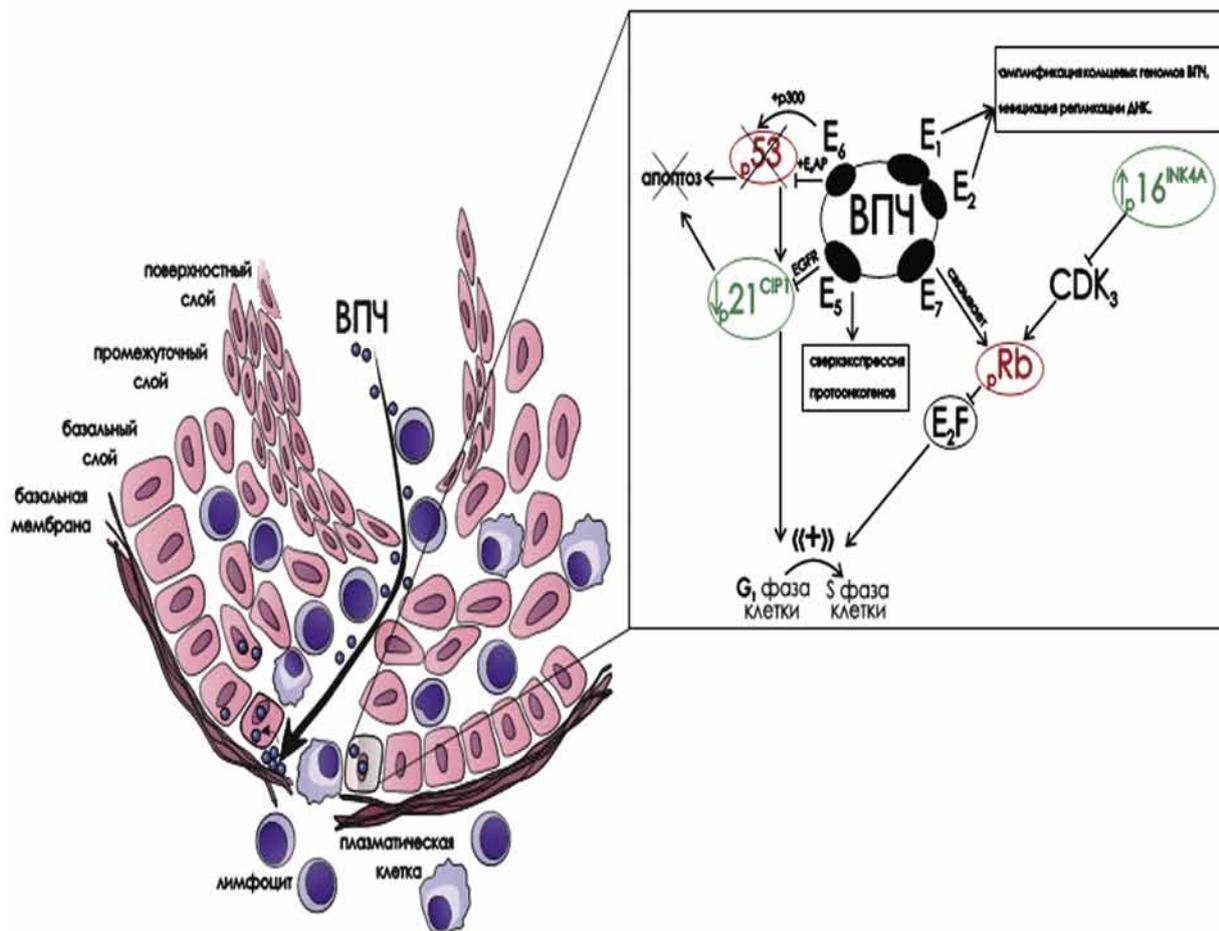


Рис. Схема ВПЧ-ассоциированного канцерогенеза рака ротоглотки. На схеме: красным цветом указаны опухолевые супрессоры (p53 и pRb), зеленым цветом - блокаторы клеточного цикла (p21^{CIP1}, p16^{INK4A}). ↑ и ↓ указывают на торможение и активацию нижестоящей цели. E1, E2, E5, E6, E7- вирусные белки

клетки из G1 фазы в S-фазу, и соответственно к повышению экспрессии p16, которую можно обнаружить при иммуногистохимическом исследовании (ИГХ) [3, 6, 7]. Таким образом, именно ИГХ исследование экспрессии p16 является первым и ключевым звеном диагностики ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки. Аффинность связывания вирусных белков E6 и E7 с p53 и pRb, соответственно, лежит в основе деления ВПЧ на типы «высокого» и «низкого» риска [3]. Немаловажную роль играет белок E5, который усиливает экспрессию рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), что приводит к сверхэкспрессии протоонкогенов, а также к снижению экспрессии белка p21, контролирующего апоптоз и дифференцировку клеток [3]. Таким образом вирусные белки E5, E6 и E7 «выталкивают» клетку из ее «привычного» жизненного цикла и «предлагают» альтернативное развитие, приводящее клетку к автономности.

Диагностика ВПЧ-ассоциированного плоскоклеточного рака ротоглотки

В настоящее время нет единого мнения о методе диагностики ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки. А обнаружение вируса в опухоли еще не означает, что это ВПЧ-индуцированная опухоль, и что вирус транскрипционно активен [14, 15]. Основные направления в диагностике ВПЧ при плоскоклеточном раке головы и шеи включают:

- обнаружение гиперэкспрессии p16 как маркера ВПЧ-ассоциированного канцерогенеза иммуногистохимическими (ИГХp16) и иммуноцитохимическими (ИЦХ p16) методами,
- обнаружение ДНК вируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР),
- обнаружение ДНК вируса с помощью метода гибридизации in situ (ISH),
- обнаружение мРНК вируса (мРНК E6/E7) с помощью ПЦР или метода ISH.

Материалом для исследования могут служить:

- гистологические препараты (резецированные опухоли, биопсии),
- цитологические препараты, полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ), соскоба с удаленных опухолей и биопсийного материала,
- слюна, мазки из ротоглотки.

Определение гиперэкспрессии p16

1. Иммуногистохимическое исследование экспрессии p16

В рекомендациях Американского Колледжа патологов от 2018г [16] отмечено, что для

диагностики ВПЧ ИГХ исследование экспрессии p16 необходимо проводить на образцах ткани ротоглотки, а также на ткани из метастазов плоскоклеточного рака в шейные лимфатические узлы II и III группы без первичного очага [16]. Исследование материала из лимфоузлов очень актуально, так как у 85% пациентов с ВПЧ-ассоциированным плоскоклеточным раком ротоглотки обнаруживаются метастазы в шейные лимфатические узлы [16].

Экспрессия p16 в шейных лимфатических узлах предполагает метастазирование опухоли ротоглотки [16]. Согласно этим рекомендациям, при локализации метастаза плоскоклеточного неороговевающего рака в шейных лимфоузлах II и III групп для установления статуса ВПЧ-ассоциированной опухоли достаточно только ИГХ исследования с моноклональными антителами к p16 [16]. В случае, если при гистологическом исследовании установлен ороговевающий плоскоклеточный рак и /или метастаз расположен за пределами II и III групп шейных лимфатических узлов, требуется обнаружение ДНК вируса даже при положительном результате ИГХ исследования экспрессии p16 [16].

Преимущество ИГХ исследования экспрессии p16 заключается в том, что его легко проводить на ткани, фиксированной в формалине, и что немаловажно, моноклональные антитела на p16 коммерчески доступны.

Тем не менее, повышенная экспрессия p16 присутствует и в опухолях, по-видимому, не связанных с ВПЧ-инфекцией. В 20-30% плоскоклеточных раков головы и шеи может наблюдаться гиперэкспрессия p16, при отсутствии связи с ВПЧ [7, 17].

Исследования показали, что p16-положительные орофарингеальные плоскоклеточные опухоли, но в которых ВПЧ не выявлен другими методами, имеют сходное клиническое течение с опухолями, в которых ВПЧ подтвержден с использованием специфических анализов [7]. Возможно, это связано с тем, что эти опухоли связаны с другими типами ВПЧ, которые не охвачены типоспецифическими анализами. Напротив, p16-отрицательные опухоли ротоглотки, но ВПЧ-ДНК-положительные, имеют плохой прогноз, в сравнении с p16-положительным плоскоклеточным раком ротоглотки [7, 14].

ИГХ исследование экспрессии p16 важно в диагностике распространенных опухолей с вовлечением ротоглотки в целях дифференциальной диагностики первичных ВПЧ-ассоциированных плоскоклеточных карцином ротоглотки и опухолей другой локализации, распространяющихся на ротоглотку [7].

Для оценки экспрессии p16 в гистологических препаратах применяется количественный

критерий. Большинство исследователей рекомендуют считать положительным результатом те случаи, в которых наблюдается не менее 70% опухолевых клеток с ядерной и цитоплазматической реакцией средней и высокой интенсивности [16]. Согласно рекомендациям, изложенным в 8-ом издании TNM (AJCC/UICC) для констатации гиперэкспрессии p16 необходимо обнаружение $\geq 75\%$ клеток с диффузным окрашиванием и умеренной интенсивностью окрашивания [9, 10].

ИГХ исследование экспрессии p16 обладает высокой чувствительностью (97%), но недостаточной специфичностью, что связано с повышением экспрессии p16 при ВПЧ-негативных опухолях, поэтому и были рекомендованы диагностические алгоритмы, сочетающие ИГХ определение экспрессии p16 и специфические тесты ВПЧ (ПЦР или ISH) [10, 14, 15, 16, 18, 19, 20].

2. Иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование экспрессии p16

Преимуществами определения ВПЧ в цитологическом материале является простота и малоинвазивность получения материала, а зачастую цитологический материал является единственным субстратом для определения ВПЧ.

В литературе описывается ИЦХ исследование экспрессии p16 только на материале ТАБ лимфоузлов, и количество сообщений ограничено. Некоторые авторы [21-23] за критерий положительной ИЦХ экспрессии p16 принимали цитоплазматическое и ядерное окрашивание, независимо от интенсивности, другие авторы [18, 24, 25] — сильное цитоплазматическое и ядерное окрашивание, также варьировал порог положительных клеток ($>10\%$, $>15\%$, $>90\%$). Так, Xu B. et al. показали, что пороговое значение 10% «положительных клеток» при ИЦХ экспрессии p16 имело большее соответствие с ИГХ экспрессией p16 на хирургических образцах, а также с ДНК-ISH на образцах ТАБ. Применение порогового значения в 70% для образцов ТАБ показало низкую чувствительность (39%). При отрицательном результате ИЦХ экспрессии p16 на образце ТАБ, авторы рекомендовали ИГХ исследование экспрессии p16 на хирургических образцах во избежание ложноотрицательного результата [24].

Ограничения и трудности, связанные с исследованием цитологических образцов:

- необходимость предусматривать сохранение материала в виде клеточных блоков или цитоспиновых препаратов,
- использование различных фиксаторов оказывает влияние на ИЦХ экспрессию p16. Так в исследовании Buonocore DJ 2019г, доказали,

что клеточные блоки фиксированные формальном имели $\geq 70\%$ диффузное окрашивание, коррелирующее с определением ДНК ВПЧ методом ISH, в то время как цитолитовые клеточные блоки показали более слабую картину окрашивания ($<70\%$) [26].

- возможная низкая клеточность образцов в аспиратах тонкой иглы, а также деградация клеток.

Обнаружение ДНК вируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР ДНК ВПЧ представляет собой метод амплификации ДНК в любом биологическом материале. С помощью различных наборов праймеров возможно выполнить генотипирование ВПЧ и обнаружить широкий спектр типов ВПЧ. Это высоко чувствительный, экономически эффективный и широко используемый метод. Однако высокая чувствительность данного метода ограничивается его низкой специфичностью. Во-первых, это связано с возможностью перекрестного загрязнения образцов. Во-вторых, невозможности различить клинически значимую инфекцию, то есть отличить ВПЧ, вызвавшего канцерогенез, от ВПЧ персистирующего. В-третьих, невозможно определить из чего выделилась вирусная ДНК (из окружающих опухоль тканей или из популяции раковых клеток) [15].

Обнаружение ДНК вируса с помощью метода гибридизации *in situ* — метод визуализации связывания ДНК-зондов с комплементарными вирусными последовательностями ДНК. ISH позволяет обнаружить и идентифицировать интегрированную и эписомальную форму ВПЧ и увидеть результат с помощью простой световой или люминесцентной микроскопии. ISH обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что подтверждено многими исследованиями. Jordan et al. определили чувствительность, специфичность, прогностическую ценность ИГХ исследования экспрессии p16 и ISH ВПЧ-16 [27]. ISH ВПЧ-16 обладала высокой специфичностью — 94,7%, чувствительностью 88%, тогда как ИГХ исследование экспрессии p16 обладало высокой чувствительностью — 96,8%, но низкой специфичностью — 83,8% [27]. Комбинация этих методов (ИГХ p16 и ISH ВПЧ-16) показала более высокую специфичность в сравнении с эталонным методом диагностики ВПЧ [27].

Стоит отметить, что авторы используют различный порог гибридизационных сигналов для положительного результата ДНК ISH, что может приводить к ложноположительному заключению по ISH. Чаще всего используют любое количе-

ство точечных гибридизационных сигналов из ядер клеток [24, 27, 28, 29], но некоторые авторы используют порог >10% [23, 30].

Обнаружение мРНК вируса (мРНК E6/E7) с помощью ПЦР или метода ISH

Методика, позволяющая определить, что вирус встроился в геном клетки и транскрипционно активен, направлена на обнаружение мРНК E6/E7. Обнаружение мРНК вируса (мРНК E6/E7) с помощью количественной обратной транскриптазы ПЦР (кОТ-ПЦР) — является эталонным методом (методом сравнения) диагностики ВПЧ-ассоциированного плоскоклеточного рака головы и шеи [19]. Это исследование выполняется на свежемороженом материале, что ограничивает широкое применение этого метода в клинических условиях.

На образцах ткани, используемых для проведения рутинного гистологического исследования, возможно проведение гибридизации *in situ* на основе мРНК (ISH мРНК E6/E7). Schache et al. сравнили этот метод с контрольным — кОТ-ПЦР для ВПЧ-16,18,33 [19]. Чувствительность и специфичность ISH мРНК E6/E7 по сравнению с контрольным тестом 97% и 93% соответственно [19]. Самая низкая специфичность у методов — ИГХ исследования экспрессии p16 и ДНК-кПЦР. Однако комбинация этих методов улучшает специфичность: ИГХ p16/ ISH ДНК и ИГХ p16/ ДНК-кПЦР.

Жидкостные анализы определения генетического материала ВПЧ

Метод жидкостной цитологии, применяемый для скрининга рака шейки матки, также может быть использован в тестировании на ВПЧ при орофарингеальном раке, хотя производители тест систем не указывают на данную возможность. Материал ТАБ, помещенный в жидкую среду пригоден для определения ДНК ВПЧ методом ПЦР, методом ISH и определения мРНК E6/E7 ВПЧ.

При обзоре литературы обнаружено ограниченное количество статей, в которых исследованы жидкостные анализы при ВПЧ-ассоциированном плоскоклеточном раке ротоглотки [28, 31-34]. Проанализированные нами исследования имели небольшое количество образцов. Для исследований использовали различный цитологический материал (материал, полученный при ТАБ (прямые мазки, фиксированные спиртом или фиксированные в специальных средах, образцы-соскобы, полученные с удаленных опухолей, слюна, мазки со слизистой ротоглотки). В зависимости от тест-систем

результаты по различным исследованиям вариabельны. Одни авторы заявляют о полном соответствии результатов по диагностике ВПЧ в цитологических образцах методом ПЦР (на образцах ТАБ из метастатических лимфоузлов) в сравнении со стандартными методиками (ISH и ИГХ p16) [28]. В двух исследованиях высокая чувствительность метода на основе ПЦР на образцах ТАБ лимфатических узлов (91-100%), сочеталась с относительно низкой специфичностью (82-86%) [28, 31], однако в недавнем исследовании Baldassarri (2015) [32] была подтверждена высокая чувствительность и специфичность этого метода (90% и 100% соответственно). Другой метод обнаружения ДНК ВПЧ на основе гибридизации *in situ* также подтвердил возможность использования при орофарингеальном раке [33] с высокой чувствительностью и специфичностью (100%), это исследование проведено на анализе цитологических образцов с хирургических резекций. Ограничением этого метода является возможность ложноположительного результата, так как в системе отсутствует внутренний контроль. Еще один жидкофазный анализ, основанный на определении ДНК ВПЧ с помощью усиления сигнала при химической реакции, изучался при орофарингеальном раке [31, 34]. Одни авторы заявляют о высоком проценте соответствия со стандартными методами диагностики (ПЦР ДНК) [31], другие [34] о нулевой чувствительности для образцов ТАБ лимфатических узлов, но высокой специфичности.

Выводы

ВПЧ-позитивные и ВПЧ-негативные плоскоклеточные орофарингеальные раки представляют собой два различных заболевания. Поэтому определение статуса ВПЧ является важной задачей, поскольку влияет на все аспекты ведения пациентов: стадию, выбор тактики лечения, прогноз. Таким образом, задачей онкологического общества является внедрение в клиническую практику высокоточного, экономически эффективного, оптимального, технически осуществимого лабораторного метода диагностики ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки. Решение существующих на данный момент трудностей стандартизации использования цитологического материала расширит возможности предоперационной диагностики ВПЧ-ассоциированного рака ротоглотки.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zandberg D.P., Bhargava R., Badin S., Cullen K.J. The role of human papillomavirus in nongenital cancers // *CA Cancer J. Clin.* – 2013. – Vol. 63(1). – P. 57-81. –doi: 10.3322/caac.21167.
2. Van Kempen P.M., Noorlag R., Braunius W.W. et al. Differences in methylation profiles between HPV-positive and HPV-negative oropharynx squamous cell carcinoma: A systematic review // *Epigenetics.* – 2014. – Vol. 9. – P. 194–203.
3. Best S.R., Niparko K.J., Pai S.I. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers // *Otolaryngol. Clin. North Am.* – 2012. – Vol. 45(4). – P. 807-22. – doi: 10.1016/j.otc.2012.04.005.
4. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. – Lyon, France, World Health Organisation, 2007. – P. 670.
5. Tanaka T.I., Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer // *Dent. Clin. North Am.* – 2018. – Vol. 62(1). – P. 111-120. – doi: 10.1016/j.cden.2017.08.008.
6. Marur S., D'Souza G., Westra W.H., Forastiere A.A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11(8). – P. 781-789. –doi: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.
7. Holmes B.J., Wenig B.M. Virus-associated carcinomas of the head & neck: Update from the 2017 WHO classification // *Ann Diagn Pathol.* – 2019. – Vol. 38. – P. 29-42. – doi:10.1016/j.anndiagpath.2018.10.008.
8. Мудунов А.М. Вирус папилломы человека- новый этиологический фактор в развитии органов головы и шеи. Проблемы и перспективы их решения. Практические аспекты эпидемиологии и вакцинопрофилактики. – 2018. – Т. 18(5). – С. 100-105. – doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-100-105.
9. Wrdemann N., Wagner S., Sharma S.J. et al. Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma // *Front Oncol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 129. – doi: 10.3389/fonc.2017.00129.
10. Lydiatt W.M., Patel S.G., O'Sullivan B. et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual // *CA Cancer J. Clin.* – 2017. – Vol. 67(2). – P. 122-137. – doi: 10.3322/caac.21389.
11. Kadaja M., Isok-Paas H., Laos T. et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5(4). – P. e1000397. – doi: 10.1371/journal.ppat.1000397.
12. Evans M.R., James C.D., Bristol M.L. et al. Human Papillomavirus 16 E2 Regulates Keratinocyte Gene Expression Relevant to Cancer and the Viral Life Cycle // *J. Virol.* – 2019. – Vol. 93(4). – doi: 10.1128/JVI.01941-18.
13. Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D., Howley P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53 // *Cell.* –1993. – Vol. 75. – P. 495-505.
14. Bussu F., Ragin C., Boscolo-Rizzo P. et al. HPV as a marker for molecular characterization in head and neck oncology: Looking for a standardization of clinical use and of detection method(s) in clinical practice // *Head Neck.* – 2019. – Vol. 41(4). – P. 1104-1111. – doi: 10.1002/hed.25591.
15. Westra W.H. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas // *Oral. Oncol.* – 2014. – Vol. 50(9). – P. 771-779. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.05.004.
16. Lewis J.S. Jr, 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. – Vol. 142(5). – P. 559-597. – doi: 10.5858/arpa.2017-0286-CP.
17. Beadle B.M., William W.N. Jr, McLemore M.S., Sturgis E.M. Williams MD. p16 expression in cutaneous squamous carcinomas with neck metastases: a potential pitfall in identifying unknown primaries of the head and neck // *Head Neck.* – 2013. – Vol. 35(11). – P. 1527–1533. – doi: 10.1002/hed.23188.
18. Jakscha J., Zlobec I., Storck C. et al. The clinical impact of p16 status in fine-needle aspirates of cervical lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinomas // *Eur Arch Otorhinolaryngol.* – 2013. – Vol. 270(2). – P. 661–667. – doi: 10.1007/s00405-012-2039-y.
19. Schache A.G., Liloglou T., Risk Robinson J.M. et al. Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma // *Br. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 108(6). – P. 1332–1339. – doi: 10.1038/bjc.2013.63.
20. Sepiashvili L., Bruce J.P., Huang S.H. et al. Novel insights into head and neck cancer using next-generation “omic” technologies // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75(3). – P. 480-486. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3124.
21. Holmes B.J., Maleki Z., Westra W.H. The Fidelity of p16 Staining as a Surrogate Marker of Human Papillomavirus Status in Fine-Needle Aspirates and Core Biopsies of Neck Node Metastases: Implications for HPV Testing Protocols // *Acta Cytol.* – 2015. – Vol. 59(1). – P. 97-103. – doi: 10.1159/000375148.
22. Begum S., Gillison M.L., Nicol T.L., Westra W.H. Detection of Human Papillomavirus-16 in Fine-Needle Aspirates to Determine Tumor Origin in Patients with Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. – 2007. – doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1690.
23. Jannapureddy S., Cohen C., Lau S. et al. Assessing for primary oropharyngeal or nasopharyngeal squamous cell carcinoma from fine needle aspiration of cervical lymph node metastases // *Diagn Cytopathol.* – 2010. – Vol. 38(11). – P. 795-800. – doi: 10.1002/dc.21293.
24. Xu B., Ghossein R., Lane J. et al. The utility of p16 immunostaining in fine needle aspiration in p16-positive head and neck squamous cell carcinoma // *Hum Pathol.* – 2016. – Vol. 54. – P. 193–200. – doi: 10.1016/j.humpath.2016.04.002.
25. Jalaly J.B., Lewis J.S. Jr, Collins B.T. et al. Correlation of p16 immunohistochemistry in FNA biopsies with corresponding tissue specimens in HPV-related squamous cell carcinomas of the oropharynx // *Cancer Cytopathol.* – 2015. – Vol. 123(12). – P. 723–731. – doi: 10.1002/cncy.21600.
26. Buonocore D.J., Fowle E., Lin O. et al. Cytologic evaluation of p16 staining in head and neck squamous cell carcinoma in CytoLyt versus formalin-fixed material // *Cancer Cytopathol.* – 2019. – doi: 10.1002/cncy.22191.
27. Jordan R.C., Lingen M.W., Perez-Ordenez B. et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials // *Am J.*

- Surg Pathol. – 2012. — Vol. 36(7). — P. 945-954. — doi: 10.1097/PAS.0b013e318253a2d1.
28. Kerr D.A., Pitman M.B., Sweeney B. et al. Performance of the Roche cobas 4800 high-risk human papillomavirus test in cytologic preparations of squamous cell carcinoma of the head and neck // *Cancer Cytopathol.* – 2014. — Vol. 122. — P. 167-174. — doi:10.1002/cncy.21372.
 29. Lin R.J., Lubpairee T., Liu K.Y. et al. Cyclin D1 overexpression is associated with poor prognosis in oropharyngeal cancer // *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2013. — Vol. 42. — P. 23. — doi:10.1186/1916-0216-42-23.
 30. Kuo K.T., Hsiao C.H., Lin C.H. et al. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome // *Mod Pathol.* — 2008. — Vol. 21(4). — P. 376-386. — doi: 10.1038/modpathol.3800979.
 31. Guo M., Khanna A., Dhillon J. et al. Cervista HPV assays for fine-needle aspiration specimens are a valid option for human papillomavirus testing in patients with oropharyngeal carcinoma // *Cancer Cytopathol.* – 2014. — Vol. 122(2). — P. 96-103. — doi: 10.1002/cncy.21375.
 32. Baldassarri R., Aronberg R., Levi A.W. et al. Detection and genotype of high-risk human papillomavirus in fine-needle aspirates of patients with metastatic squamous cell carcinoma is helpful in determining tumor origin // *Am J Clin Pathol.* – 2015. — Vol. 143(5). — P. 694-700. — doi: 10.1309/AJCPZA4PSZCFHQ4.
 33. Bishop J.A., Maleki Z., Valsamakis A. et al. Application of the hybrid capture 2 assay to squamous cell carcinomas of the head and neck: a convenient liquid-phase approach for the reliable determination of human papillomavirus status // *Cancer Cytopathol.* – 2012. — Vol. 120(1). — P. 18-25. — doi: 10.1002/cncy.20175.
 34. Cohen N., Gupta M., Doerwald-Munoz L. et al. Developing a new diagnostic algorithm for human papilloma virus associated oropharyngeal carcinoma: an investigation of HPV DNA assays // *J. Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2017. — Vol. 46(1). — P. 11. — doi: 10.1186/s40463-017-0189-z.

*M.V. Mirochnik³, V.V. Dvornichenko^{1,2,3},
U.K. Masnikova³, K.V. Tolmachev², I.V. Lisichnikova³,
I.E. Mitroshina³*

The role of papillomavirus in the development of tumors of the oropharyngeal zone and diagnostic features of HPV

¹ISMAPgE – Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia,

²Department of Oncology and Radiotherapy of the FSBEI HE Irkutsk State Medical University MOH Russia,

³Irkutsk Regional Cancer Center, Irkutsk

Given the growing role of human papillomavirus infection in carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck, the understanding that HPV-associated cancer and HPV non-associated cancer are two different nosological forms of oropharyngeal cancer, the lack of common standards and approaches in the diagnosis of HPV infection. Therefore, the main objective of the oncological society is to introduce into clinical practice high-precision, cost-effective, optimal, technically feasible laboratory method for the diagnosis of HPV-associated oropharyngeal cancer.

This review of the literature reflects modern views on carcinogenesis and diagnostic methods for HPV-associated oropharyngeal cancer, analyzes the strengths and weaknesses sides of the methods, as well as the difficulties that doctors face in their clinical practice in diagnosing HPV in various materials (cytological and histological).

Key words: oropharyngeal cancer, HPV-associated oropharyngeal cancer, HPV DNA polymerase chain reaction, in situ hybridization, immunohistochemical and immunocytochemical expression of p16

Поступила в редакцию 06.01.2020 г.