

# IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCIA TUMOR SUPRESORICKÉHO PROTEÍNU P16 V TKANIVE BAZOCELULÁRNEHO KARCINÓMU KOŽE

## IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF THE TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN P16 IN CUTANEOUS BASAL CELL CARCINOMA

BARTOŠ Vladimír

*Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin*

### ABSTRAKT

**Úvod:** Proteín p16 je multifunkčný tumor supresorický proteín, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v regulácii bunkového cyklu, procese starnutia buniek a vzniku zhubných nádorov. Cieľom prezentovanej štúdie bolo hodnotenie imunohistochemickej expresie p16 v tkanive bazocelulárneho karcinómu (BCC) kože.

**Materiál a Metodika:** Súbor pozostával z bioptických vzoriek 65 primárnych BCC, ktoré mali monoklonálnymi protilátkami vyšetrený p16 (klon E6H4) a proliferatívny antigén Ki-67 (klon MIB1).

**Výsledky:** Expresia p16 v nádorovom tkanive bola potvrdená v 45 prípadoch (69,2 %). Väčšinou bola fokálna/zonálna s akcentáciou najmä v periférnych častiach nádorových hniezd. V skupine p16-pozitívnych a p16-negatívnych BCC bolo percentuálne zastúpenie nádorov vyrastajúcich na hlave a krku (60 % a 65 %) a na ostatných častiach tela (40 % a 35 %) takmer rovnaké ( $p = 0,7$ ). P16-pozitívne BCC mali v porovnaní s p16-negatívnymi BCC častejšie infiltratívny rastový vzor (31,1 % vs. 15,0 %), ale bez štatistickej významnosti ( $p = 0,1$ ). Pozorovaný bol inverzný vzťah medzi expresiou p16 a antigénu Ki-67. **Záver:** V tkanive BCC kože je expresia p16 častá, ale veľmi nepravidelne distribuovaná, čo môže byť dôsledkom intratumorálnej fenotypovej heterogenity. Sprevádzaná je poklesom proliferatívnej aktivity nádorových buniek. Imunohistochemické vyšetrenie p16 sa nezdá byť relevantné na predikciu biologického správania tejto malignity.

**Kľúčové slová:** Bazocelulárny karcinóm. Proteín p16. Antigén Ki-67.

### ABSTRACT

**Introduction:** Protein p16 is a multifunctional tumor suppressor protein that plays an important role in cell cycle regulation, cellular senescence, and development of malignant neoplasms. The goal of this study was to evaluate the immunohistochemical expression status of p16 in basal cell carcinoma (BCC) of the skin.

**Material and Methods:** The study group consisted of 65 BCC biopsy samples that were investigated by monoclonal antibodies against p16 (clone E6H4) and proliferation antigen Ki-67 (clone MIB1).

**Results:** Expression of p16 was found in 45 carcinomas (69.2 %). It was usually focal/zonal with a predominance at the periphery of the tumor nests. In p16-positive and p16-negative BCCs, the percentages of lesions arising on the head and neck region (60 % vs 65 %) and the other parts of the body (40% vs 35 %) were almost equal ( $p = 0.7$ ). The p16-positive BCCs more frequently had an infiltrative growth pattern compared with the p16-negative BCCs (31,1 % vs 15,0 %), but without a statistical significance ( $p = 0.1$ ). There was seen an inverse relationship between the p16 and antigen Ki-67 staining.

**Conclusion:** In cutaneous BCC, the expression of p16 is frequent, but it shows very uneven spacial distribution which may be a consequence of intratumoral phenotypic heterogeneity. It is accompanied by reduced proliferative activity of the neoplastic cells. P16 immunohistochemistry does not appear to be useful for predicting the biological behaviour of this malignancy.

**Key words:** Basal cell carcinoma. Protein p16. Antigen Ki67.

### ÚVOD

Proteín p16 (označovaný aj ako p16<sup>INK4a</sup>, v ďalšom texte skrátene p16) je multifunkčný tumor supresorický proteín, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v regulácii bunkového cyklu, procese starnutia (senescencii) buniek a vzniku zhubných nádorov. Fyziologicky funguje ako inhibítor cyklín-dependentnej kinázy (CDK), čím v konečnom dôsledku spomaľuje rast buniek. Za normálnych okolností sa CKD4/6 viažu na cyklín D a vytvárajú komplex, ktorý fosforyláciou inaktivuje retinoblastómový (Rb) proteín. Fosforylovaný Rb proteín sa uvoľňuje z transkripčného faktora E2F a tým mu umožňuje vstupovať do jadra. Faktor E2F v jadre následne zahajuje transkripciu cieľových génov, ktoré sprostredkujú progresiu bunkového cyklu z G1 do S fázy. Tým, že sa p16 viaže na CDK4/6, zamedzuje ich interakciu s cyklínom D, preto ostáva Rb proteín naviazaný na faktor E2F. Celá táto kaskáda má za následok spomalenie až zastavenie bunkového cyklu zamedzením prechodu G1 do S fázy [1].

Alterácie génu p16 (CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2a) či aberantná tvorba p16 (v zmysle „up-regulácie“ alebo „down-regulácie“) sa vyskytujú takmer v 50 % všetkých malignít u ľudí [1, 2]. V nádorových bunkách s mutáciami génov RB alebo CDK4/6 býva p16 často nadprodukovaný („overexpresia“), ale funkčne neschopný zastaviť bunkový cyklus. U niektorých nádorov (prekancerózy či skvamocelulárny karcinóm krčka maternice, niektoré karcinómy perianálnej oblasti a oblasti hlavy a krku) súvisí expresia p16 priamo s infekciou HPV (ľudský papilomavírus) ako vyvolávateľom ochorenia a tým má aj diagnostický

význam [2]. Maligne neoplázie obsahujúce veľké množstvo p16-pozitívnych nádorových buniek sú vo všeobecnosti považované za agresívnejšie [2, 3]. U niektorých (napr. karcinóm prsníka, kolonický adenokarcinóm, neuroblastóm, gastrointestinálny stromálny tumor) predstavuje „overexpresia“ p16 nepriaznivý prognostický ukazovateľ a v literatúre sa diskutuje aj o potenciálnom využití anti-p16 terapie pri onkologických ochoreniach [2, 3]. V rámci zhubných nádorov kože bol p16 doposiaľ študovaný aj pri bazocelulárnom karcinóme (basal cell carcinoma, ďalej BCC), ale s veľmi nesúrodými výsledkami [4-12].

Ďalším dôležitým regulátorom bunkového cyklu je antigén Ki-67. Tento nehistónový proteín je exprimovaný v jadrách buniek počas aktívnych fáz bunkového cyklu (G1, S, G2 a mitózy), zatiaľ čo v kľudovej (G0) fáze absentuje [13]. K maximu expresie dochádza na rozhraní G2 fázy a mitózy. Imunohistochemická detekcia antigénu Ki-67 (Ki-67 index) umožňuje kvantitatívne stanovenie proliferatívneho stavu buniek a patrí k základným prognostickým indikátorom pri bioptickom vyšetrení [13].

## CIEĽ

Cieľom predkladanej práce bolo hodnotenie imunohistochemickej expresie p16 v tkanive BCC kože a jej potenciálneho súvisu s anatomickou lokalitou, histologickým typom BCC a proliferatívnou aktivitou nádoru.

## MATERIÁL A METÓDY

Hodnotený súbor pozostával z bioptických vzoriek 65 primárnych BCC kože získaných od 63 pacientov (32 mužov, 31 žien) vo vekovom rozpätí 42 – 93 rokov (priemerný vek 72,1 rokov). Topografická distribúcia nádorov v súbore bola nasledovná: tvárová časť hlavy (n = 22) (Obr. 1), mimotvárová časť hlavy (n = 16), krk (n = 2), trup (n = 15) a končatiny (n = 10). Podľa predchádzajúcej publikácie autorov Donati et al. [4] sme rozlišovali dve topografické kategórie: a) hlava a krk (40 prípadov), ktorá je chronicky vystavená slnečnému žiareniu a b) ostatné časti tela (25 prípadov), ktoré predstavujú lokality s menej intenzívnou (intermittentnou alebo len minimálnou) expozíciou UV žiareniu. Do kategórie vystavenej chronickej solárnej expozícii patrí aj zápästie, postihnutie tejto časti tela sme však v našom súbore nezaznamenali. Podľa vyššie uvedenej práce [4] sme pacientov zatriedili

na dve vekové skupiny: a)  $\leq 60$  rokov a b)  $\geq 61$  rokov.

Jednotlivé BCC zahrňovali nasledovné histologické typy: superficiálny (n = 10), nodulárny (n = 31) a zmiešaný superficiálno-nodulárny (n = 7), súhrnne kategorizované ako neagresívne BCC a infiltratívny/morfeaformný (n = 4), zmiešaný nodulárno-infiltratívny (n = 12), a metatypický (bazoskvamózny) karcinóm (n = 1), súhrnne kategorizované ako agresívne BCC [13-15].

Vzorky sme po zaliatí do formalínu štandardne laboratórne spracovali vo forme parafinových bločkov, farbili hematoxylínom a eozínom a hodnotili vo svetelnom mikroskope (Nicon Eclipse Ci). Všetky prípady boli simultánne imunohistochemicky vyšetrené monoklonálnou protilátkou proti p16 (klon E6H4, ROCHE, ready-to-use) aj proliferatívnemu antigénu Ki-67 (klon MIB1, DAKO, ready-to-use). Pri oboch markeroch sme imunoreaktivitu kvantifikovali ako priemerné percentuálne zastúpenie pozitívnych nádorových buniek v celom nádorovom tkanive vyšetřovaného histologického rezu. Podľa publikácie autorov Zheng et al. [5] sme aplikovali nasledovný semikvantitatívny skórovací model expresie p16: grade 0 (< 5 % pozitívnych buniek), grade 1+ (5 – 25 % pozitívnych buniek), grade 2+ (26 – 50 % pozitívnych buniek), grade 3+ (51 – 75 % pozitívnych buniek) a grade 4+ (> 75 % pozitívnych buniek). V zhode s uvedenou prácou sme za p16-pozitívne BCC považovali tie, v ktorých množstvo nádorových buniek exprimujúcich p16 dosahoval minimálne 5 %, ostatné boli definované ako negatívne.



Obrázok 1. Ulcerovaný BCC na ľavom líci u staršieho muža.



Spracovanie, deskriptívne a štatistické vyhodnotenie súboru bolo vykonané v programe SPSS Statistics (Verzia 19) s použitím chí-kvadrátového testu, pričom hodnota  $p < 0,05$  bola považovaná za signifikantnú.

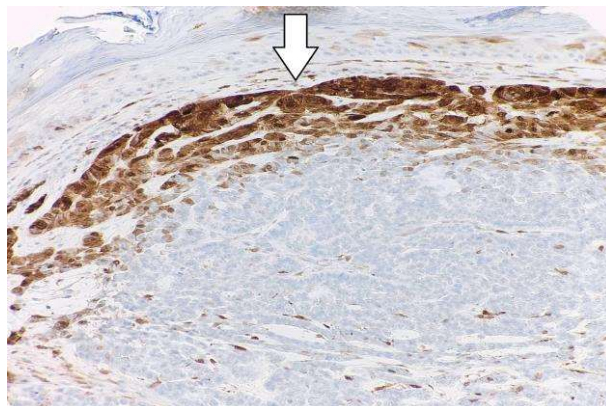
## VÝSLEDKY

V analyzovanom súbore bolo zastúpenie jednotlivých semikvantitatívnych stupňov expresie p16 nasledovné: grade 0 (20 karcinómov; 30,8 %), grade 1+ (26 karcinómov; 40,0 %), grade 2+ (7 karcinómov; 10,75 %), grade 3+ (7 karcinómov; 10,75 %) a grade 4+ (5 karcinómov; 7,7 %). Podiel p16-pozitívnych BCC predstavoval 69,2 % všetkých prípadov. Cytoplazmatická expresia p16 varírovala v rozsahu 0 – 80 % nádorového tkaniva (priemerne 23 %). U prevažnej väčšiny karcinómov bola fokálna/zonálna s akcentáciou v periférnych častiach nádorových hniezd. V týchto prípadoch zóny s intenzívnym cytoplazmatickým farbením ostro kontrastovali s okolitým p16-negatívnym nádorovým tkanivom (Obr. 2). Zriedkavejšie bolo farbenie v nádorových hniezdach difúznejšie (hoci taktiež nerovnomerné) bez ostrého rozhrania medzi p16-pozitívnou a p16-negatívnou bunkovou populáciou (Obr. 3 a 4). Vtedy zvyčajne vykazovala ložiskovú imunoreaktivitu aj povrchová epiderma.

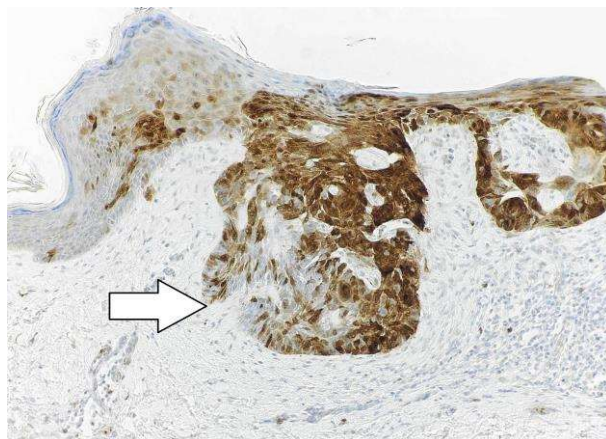
V skupine p16-pozitívnych a p16-negatívnych BCC bolo percentuálne zastúpenie nádorov vyrastajúcich na hlave a krku (60 % a 65 %) a na ostatných častiach tela (40 % a 35 %) takmer rovnaké a štatisticky nevýznamné ( $p = 0,7$ ). Podobné výsledky sme potvrdili aj pri kategorizácii pacientov podľa veku na skupinu  $\leq 60$  rokov a  $\geq 61$  rokov ( $p = 0,6$ ).

P16-pozitívne BCC mali v porovnaní s p16-negatívnymi BCC častejšie infiltratívne rastové črty (31,1 % vs 15,0 %), ale tento súvis sa nepreukázal ako štatisticky významný ( $p = 0,1$ ). Expresia proliferáčného antigénu Ki-67 v jadrách buniek varírovala v rozsahu 10 – 100 % (priemerne 42,2 %) nádorového tkaniva a bola taktiež veľmi nerovnomerná. Priemerná hodnota Ki-67 indexu bola v skupine p16-pozitívnych BCC čiastočne nižšia (39,5 %) v porovnaní s p16-negatívnymi BCC (45 %). Pri komparácii priestorovej distribúcie bol pozorovaný inverzný vzťah medzi expresiou p16 a antigénu Ki-67. Kompaktnejšie zóny p16-pozitívnej nádorobunkovej populácie boli zvyčajne sprevádzané nízkym proliferáčným Ki-67 indexom (porovnaj Obr. 2/5 a 3/6). Prehľad základných klinicko-patologic-

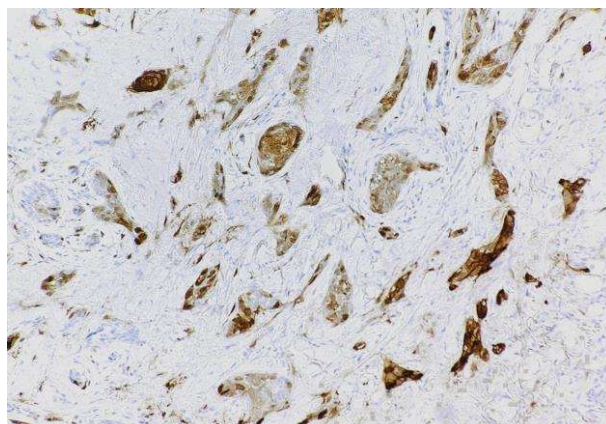
kých parametrov v prezentovanom súbore pacientov je uvedený v Tab. 1.



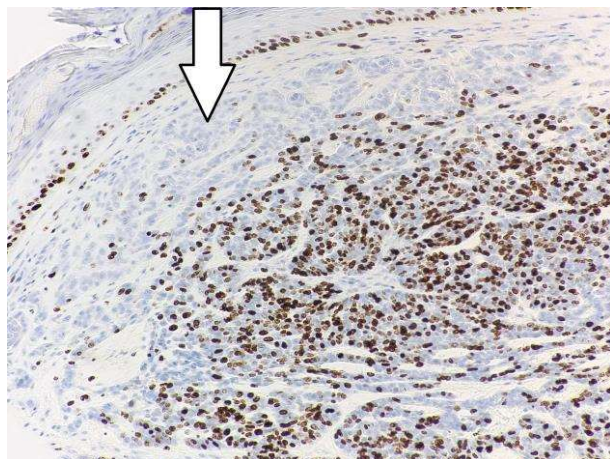
**Obrázok 2** Zonálna expresia p16 (grade 1+) na periférii nádorového hniezda (šípka) nodulárneho BCC. V centrálnej časti je nádorové tkanivo negatívne. (zväčšenie 20x)



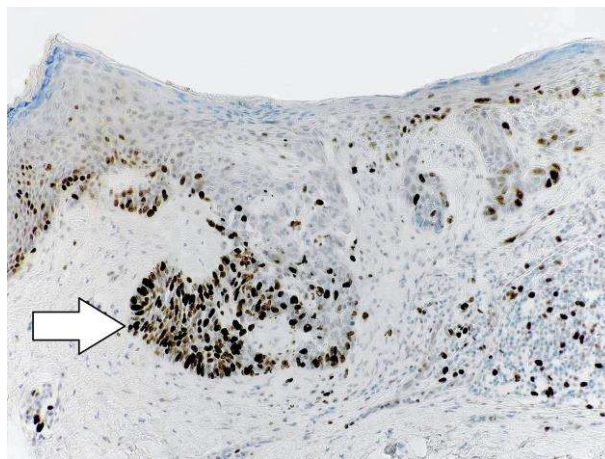
**Obrázok 3** Výrazná expresia p16 (grade 4+) v tkanive superficiálneho BCC. V jednom úseku (šípka) je nádorobunková populácia sčasti negatívna. (zväčšenie 20x)



**Obrázok 4** Výrazná expresia p16 (grade 4+) v tkanive infiltratívneho BCC. (zväčšenie 30x)



**Obrázok 5** Absentujúca reaktivita antigénu Ki-67 v periférnej zóne nodulárneho BCC (šípka), ktorá bola pozitívna na p16. Naopak, centrálna časť má vysokú proliferáciu aktivitu. (nálež korešponduje s obrázkom 2). (zväčšenie 20x)



**Obrázok 6** Akcentovaná reaktivita antigénu Ki-67 v tej časti superficiálneho BCC (šípka), ktorá vykazovala redukovanú expresiu p16. Ostatná časť nádorového tkaniva, ktorá bola intenzívne pozitívna na p16, má minimálnu proliferáciu aktivitu. (nálež korešponduje s obrázkom 3). (zväčšenie 10x)

**Tabuľka 1** Sumarizácia základných klinicko-patologických parametrov pacientov v prezentovanom súbore.

Parametre	BCC p16+ (n = 45)	BCC p16- (n = 20)
<b>Pohlavie</b>		
• muži	23/45 (51,1 %)	11/20 (55,0 %)
• ženy	22/45 (48,9 %)	9/20 (45,0 %)
<b>Vek</b>		
• priemerná hodnota	72,4 r.	71,6 r.
• ≤ 60 rokov	5/45 (11,1 %)	3/20 (15,0 %)
• ≥ 61 rokov	40/45 (88,9 %)	17/20 (85,0 %)
<b>Lokalizácia BCC</b>		
• hlava a krk	27/45 (60,0 %)	13/20 (65,0 %)
• iná lokalita	18/45 (40,0 %)	7/20 (35,0 %)
<b>BCC variant</b>		
• agresívny variant	14/45 (31,1 %)	3/20 (15,0 %)
• neagresívny variant	31/45 (68,9 %)	17/20 (85,0 %)
<b>Proliferačný Ki-67 index</b>		
• priemerná hodnota	39,5 %	45,0 %

## DISKUSIA

BCC kože je v súčasnosti najčastejším zhubným onkologickým ochorením u ľudí. Na rozdiel od väčšiny iných malignít rastie len lokálne invazívne a prakticky nikdy nemetastázuje. Podľa biologického správania rozlišujeme neagresívne (lower risk) a agresívne (higher risk) varianty BCC kože. Do prvej skupiny sa zaraďujú najmä superficiálny a nodulárny BCC, ktorých terapia a prognóza sú vo väčšine prípadov excelentné. Do druhej skupiny patria infiltratívny, sklerotizujúci/morfeaformný, mikronodulárny BCC a bazoskvamózny karcinóm [13-15]. Tieto typy majú horší klinický priebeh v dôsledku invazívnejšieho rastu a častých recidív po liečbe. Hoci základné etiopatogenetické faktory

vzniku BCC kože sú dobre známe, poznatky o molekulovo-genetických mechanizmoch zodpovedných za jeho biologické správanie a progresiu (či naopak, neschopnosť metastázovať) sú zatiaľ nedostatočné. Pri tejto malignite bolo doteraz študované široké spektrum rôznych biomarkerov súvisiacich s proliferáciou a apoptózou buniek, mechanizmami bunkovej signalizácie, proeolytickými zmenami peritumoróznej strómy či vzájomnou interakciou neoplastických buniek a zložiek extracelulárnej matrix. Ani v súčasnosti však neexistuje špecifický marker, ktorý by v rutínnej biopтической praxi spoľahlivo rozlíšil agresívne typy od menej agresívnych [14].



**Tabuľka 2** Zastúpenie p16-pozitívnych prípadov BCC kože v doteraz publikovaných štúdiách [5-12]

Literárny zdroj	Počet BCC	p16-pozitívne BCC
Ramezani et al., 2016	53	42 prípadov (79,2 %)
Cretnik et al., 2009	20	16 prípadov (80 %)
Paolini et al., 2011	35	33 prípadov (94,3 %)
Svensson et al., 2003	47	42 prípadov (89,4 %)
Conscience et al., 2006	10	5 prípadov (50 %)
Zheng et al., 2005	47	7 prípadov (14,9 %)
Villada et al., 2018	10	0 prípadov (0 %)
Bartoš, 2020	23	7 prípadov (29,1 %)
táto štúdia	65	45 prípadov (69,2 %)

Predkladaná štúdia sa zaoberá hodnotením imunohistochemickej expresie tumor supresorického proteínu p16 v súbore 65 BCC kože. Jeho produkcia v nádorových bunkách bola detegovaná približne v 70 % prípadov, na základe čoho ju možno považovať za častý nález. Výsledky dosiaľ publikovaných štúdií sa však v tomto smere veľmi odlišujú. Ako dokumentuje Tab. 2, prítomnosť p16 v tkanive BCC kože varíruje v rozsahu 0 – 94 % prípadov [5-12].

Na uvedených diskrepanciách sa pravdepodobne podieľajú: a) rozdielna metodika laboratórneho spracovania vzoriek, b) odlišné množstvo analyzovaných prípadov, c) selekčný „bias“ v zmysle prevalencie určitých histologických typov BCC a d) rozdielne „cut-off“ hodnoty definujúce „p16-pozitivitu“ karcinómu. Najmä k poslednému parametru pristupujú mnohí autori rozdielne. Napríklad Paolini et al. [8] považovali za p16-pozitívne BCC tie, ktoré v tkanive obsahovali minimálne 1 % imunoreaktívnych nádorových buniek. Zheng et al. [5] definovali pozitivitu od 5 % a Ramezani et al. [10] až od 10 %. Iní autori [9] zasa neuvádzajú žiadnu percentuálnu hranicu čo napovedá, že všetky prípady s akoukoľvek prítomnosťou p16-imunoreaktívnych nádorových buniek považovali za pozitívne.

Jeden z faktorov, ktorý môže ovplyvňovať syntézu p16 v nádorových bunkách BCC kože je pôsobenie ultrafialového (UV) žiarenia. Je známe [16], že tvorba p16 v epidermálnych keratinocytoch je indukovaná UV-B žiarením. Viaceré štúdie skutočne potvrdili [4, 6, 7], že nadprodukcia („overexpresia“) p16 sa častejšie vyskytovala v tých karcinómoch kože, ktoré vyrastali na častiach tela chronicky vystavených slnečným lúčom. Iní autori [8, 11] však takýto súvis nepozorovali. Aj v našej štúdií bolo zastúpenie p16-pozitívnych a p16-negatívnych BCC

vyrastajúcich na hlave a krku a na ostatných častiach tela vyrovnané. Talianski autori [4] zároveň uvádzajú, že u pacientov nad 60 rokov sa p16-pozitívne karcinómy kože vyskytovali signifikantne častejšie v porovnaní s mladšími osobami. Tento fakt najskôr opäť súvisí s dlhodobějšíou solárnou expozíciou, keďže starší ľudia majú prirodzene väčšiu kumulatívnu dávku UV žiarenia počas života. V našej štúdií sme pri rovnakej diskriminačnej vekovej hranici štatisticky významný súvis nepotvrdili.

V literatúre zatiaľ pretrvávajú kontroverzné názory, či sú BCC kože s agresívnejším klinicko-patologickým fenotypom sprevádzané odlišnou (resp. vyššou) tvorbou p16 v porovnaní s neagresívnymi variantami a tým je diskutabilný aj jeho prognostický význam. Svensson et al. [9] demonštrovali, že expresia p16 sa častejšie vyskytovala v infiltratívne rastúcich BCC a tento proteín bol nadprodukovaný najmä v invazívnych okrajoch nádorových zoskupení. Pri superficiálnom, nodulárnom a infiltratívnom type BCC zistili pozitivitu p16 v 75 %, 88,8 % a 100 % prípadov. Iní autori [6, 10] nepotvrdili presvedčivý vzťah medzi histologickým typom BCC a imunoreaktivitou p16. V našom súbore síce agresívne varianty BCC produkovali p16 častejšie, ale bez štatisticky významnej korelácie.

Keďže p16 aj proliferáčny antigén Ki-67 sa významne podieľajú na regulácii bunkového cyklu, pri imunohistochemickom vyšetrení tkaniva možno medzi nimi predpokladať vzájomnú súvislosť. V našej štúdií boli úseky p16-pozitívnej nádorovo-bunkovej populácie sprevádzané redukovanou expresiou antigénu Ki-67. Podobné výsledky potvrdili aj Svensson et al [9], ale iba v invazívne rastúcich periférnych častiach nádorových zoskupení BCC. Predpokladajú, že pri progresii a invazivite BCC kože dochádza k fenotypovej transformácii nádorových buniek, ktorá je sprevádzaná nadprodukciou

p16 s následným poklesom ich rastového potenciálu. Tento, na prvý pohľad nelogický jav vysvetľujú tým, že invazivita a proliferácia nádorových buniek v skutočnosti predstavujú dva odlišné fenomény.

## ZÁVER

V tkanive BCC kože je expresia p16 častá, ale veľmi nepravidelne distribuovaná, čo môže byť dôsledkom intratumoróznej fenotypovej heterogenity. Sprevedaná je poklesom proliferatívnej aktivity nádorových buniek. Výsledky prezentovanej štúdie napovedajú, že imunohistochemické vyšetrenie p16 nemôže slúžiť na predikciu biologického správania tejto malignity.

## ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] LI J., POI M.J., TSAI M.D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry*. 2011; 50 (25): 5566-5582.
- [2] ROMAGOSA C., SIMONETTI S., LÓPEZ-VICENTE L., et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011; 30 (18): 2087-2097.
- [3] DEMARIA M. Gene therapy for p16-overexpressing cells. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10 (4): 518-519.
- [4] DONATI P., PAOLINO G., PANETTA C., et al. Another point of view on p16 and Ki67 expression in melanocytic and non-melanocytic cutaneous lesions. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2013; 21 (3): 149-154.
- [5] ZHENG Z., KYE Y., ZHANG X., et al. Expression of p63, bcl-2, bcl-6 and p16 in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Korean J Pathol*. 2005; 39 (2): 91-98.
- [6] CRETNIK M., POJE G., MUSANI V., et al. Involvement of p16 and PTCH in pathogenesis of melanoma and basal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2009; 34 (4): 1045-1050.
- [7] CONSCIENCE I., JOVENIN N., COISSARD C., et al. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. *Eur J Dermatol*. 2006; 16 (5): 518-522.
- [8] PAOLINI F., CARBONE A., BENEVOLO M., et al. Human Papillomaviruses, p16INK4a and Akt expression in basal cell carcinoma. *J Exp Clin Canc Res*. 2011; 30 (1): 108.
- [9] SVENSSON S., NILSSON K., RINGBERG A. et al. Invade or proliferate ? Two contrasting events in malignant behavior governed by p16<sup>INK4a</sup> and an intact Rb pathway illustrated by a model system of basal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63 (8): 1737-1742.
- [10] RAMEZANI M., ABDALI E., KHAZAEI S., et al. P16INK4a immunostaining but lack of human papilloma virus type 16 in cutaneous squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma: a report from West Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17 (3): 1093-1096.
- [11] VILLADA G., KRYVENKO O.N., CAMPUZANO-ZULUAGA G., et al. A limited immunohistochemical panel to distinguish basal cell carcinoma of cutaneous origin from basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018; 26 (2): 126-131.
- [12] BARTOŠ V. Expression of p16 protein in cutaneous basal cell carcinoma: still far from being clearly understood. *Acta Derm Croat*. 2020; 28 (1): 43-44.
- [13] BARTOŠ V., ADAMICOVÁ K., KULLOVÁ M. et al. Immunohistochemical evaluation of proliferative activity (Ki-67 index) in different histological types of cutaneous basal cell carcinoma. *Biologia*. 2012; 67 (3): 610-615.
- [14] BARTOŠ V., ADAMICOVÁ K., KULLOVÁ M. et al. Bazocelulárny karcinóm kože: biologické správanie nádoru a prehľad najvýznamnejších molekulových ukazovateľov progresie ochorenia v praxi patológa. *Klin Onkol*. 2011; 24 (1): 8-17.
- [15] ELDER D.E., MASSI D., SCOLYER R. et al. (Eds). *WHO Classification of skin tumours. 4th Edition*. Lyon, IARC; 2018. ISBN978-92-832-2440-2
- [16] CHAZAL M., MARIONNET C., MICHEL L., et al. P16INK4A is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene*. 2002; 21 (17): 2652-2661.