

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**На правах рукописи**

**КОНОНЕНКО ВЛАДИМИР ИВАНОВИЧ**

**ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ РАННЕГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ  
ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ  
ПОЛОСТИ РТА**

**14.01.14 - стоматология**

**14.01.12 – онкология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени**

**доктора медицинских наук**

**Научные консультанты:**

**доктор медицинских наук,  
профессор Кит О.И.**

**доктор медицинских наук,  
Максюков С.Ю.**

**Ростов-на-Дону-2017**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Страницы
<b>Введение</b>	5
<b>Глава 1.</b> Обзор современных эпидемиологических и диагностических особенностей рака слизистой оболочки полости рта	18
1.1. Эпидемиологические особенности и классификация злокачественных опухолей полости рта	18
1.2. Молекулярно-генетические маркеры рака слизистой оболочки полости рта	24
1.3. Биологические функции гипоксия индуцибельного фактора-1 и его роль в онкогенезе	37
1.4. Гипоксия-индуцибельный фактор-1 и прогноз больных раком слизистой оболочки полости рта	43
1.5. Роль гипоксия-индуцибельного фактора-1 и васкулоэндотелиального фактора роста VEGF в опухолевом неоангиогенезе и значимость опухолевого ангиогенеза для лимфогенного метастазирования	50
<b>Глава 2.</b> Материалы и методы исследования	55
2.1. Дизайн исследования.	55
2.2. Общая характеристика групп больных	58
2.3. Методы исследования	68
2.4. Методы статистической обработки результатов исследования	76
<b>Глава 3.</b> Частота и структура гнойных осложнений, прогрессирования основного заболевания у больных раком слизистой оболочки полости рта	83
<b>Глава 4.</b> Влияние опухолевой экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ на течение основного заболевания, транскрипционную и апоптическую активность опухолевых клеток, неоангиогенез у больных раком слизистой оболочки полости рта	113
4.1. Содержание гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ в гомогенате опухолевой и гистологически неизменной ткани у больных раком слизистой оболочки полости рта в зависимости от стадии и распространенности опухолевого процесса	113

4.2. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ в ткани рака слизистой оболочки полости рта и ее связь с клиническими характеристиками заболевания	126
4.3. Взаимосвязь экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ с активностью транскрипционных, апоптических, ростовых, антимикробных и провоспалительных факторов у больных раком слизистой оболочки ротовой полости	134
4.4. Изучение показателей экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ при оценке общей выживаемости больных раком слизистой оболочки полости рта	144
<b>Глава 5.</b> Патогенетические особенности развития гнойных осложнений комбинированного лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта и новые подходы в противоопухолевой терапии для коррекции гнойных осложнений и прогрессирования заболевания	149
5.1. Экспрессия факторов транскрипции, неоангиогенеза, апоптоза в ткани опухоли и ротовой жидкости у больных раком слизистой оболочки полости рта при развитии гнойных осложнений комбинированного лечения	149
5.2. Экспрессия факторов транскрипции, неоангиогенеза, апоптоза в ткани опухоли и ротовой жидкости у больных раком слизистой оболочки полости рта при прогрессии основного заболевания	162
<b>Глава 6.</b> Раннее прогнозирование развития гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания у больных раком слизистой оболочки полости рта и эффективность оптимизации противоопухолевой терапии	173
6.1. Прогнозирование развития гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания у больных раком слизистой оболочки полости рта	173
6.2. Эффективность оптимизации противоопухолевой терапии рака слизистой оболочки полости рта с целью профилактики и коррекции гнойных осложнений путем активации врожденных антимикробных механизмов и стабилизации транскрипционной активности гипоксия индуцибельного фактора-1	185
<b>Заключение</b>	197
<b>Выводы</b>	208
<b>Практические рекомендации</b>	211
<b>Указатель литературы</b>	212

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ГО - гнойные осложнения

ИГХ исследование – иммуногистохимическое исследование

ИЛ – интерлейкин

КЗК - клинически значимая концентрация

ЛФ – лактоферрин

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЭА - раково-эмбриональный антиген

СОПР – слизистая оболочка полости рта

ЧЛЮ - челюстно-лицевая область

AUC (Area Under Curve) – площадь под ROC кривой

Cut-off – точка разделения

HIF (hypoxia-inducible factor) – гипоксия-индуцибельный фактор

MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry) - времяпролетная масс-спектрометрия на основе ионизации вещества с помощью матрицы и лазерного излучения

MMP (Matrix Metalloproteinase) - матриксные металлопротеиназы

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B cells) - ядерные транскрипционные факторы каппа-B

ROC (Receiver operating characteristic) - график, позволяющий оценить качество бинарной классификации

TIMP (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases) - тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ

VEGF (Vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

В настоящее время рак слизистой оболочки полости рта (СОПР) занимает 11-е место среди всех онкологических заболеваний в мире (Сувырина М.Б. с соавт., 2016), а в Российской Федерации среди мужчин - 7-е место (среди женщин встречается в 5-7 раз реже) (Юркевич Н.В., 2015). Распространенность злокачественных новообразований полости рта в Российской Федерации в 2014 г. составила 25,3 на 100 тыс. населения (Каприн А.Д. с соавт., 2015, 2016). В 2014 г. в Российской Федерации на I - II стадиях заболевания были диагностированы 36,1% злокачественных новообразований полости рта; на III стадии - 32,4% (Каприн А.Д. с соавт., 2015, 2016). Удельный вес больных со злокачественными новообразованиями полости рта с запущенным опухолевым процессом (IV стадия) в 2014 г. составил 29,6 % (Каприн А.Д. с соавт., 2015). Рак СОПР на III-IV стадии сопровождается низким уровнем пятилетней выживаемости (Сувырина М.Б. с соавт., 2015; Сао Н. et al., 2016), составляющей 48,3% (Чиссов В.И. с соавт., 2012). Между тем, выявление заболевания на I-II стадии увеличивает уровень пятилетней выживаемости до 80% (Гельфанд И.М. с соавт., 2016).

Рак СОПР характеризуются долгим бессимптомным течением, поздним обращением в специализированные учреждения, ранним возникновением метастазов в региональные лимфатические узлы и высокой смертностью уже на первом году после постановки диагноза (Пачес А.И., 2000; Чойнзонов Е.Л. и др., 2003). Несмотря на кажущуюся простоту клинической визуализации изменений СОПР, ранняя диагностика рака СОПР затруднительна, поскольку клинические признаки появляются позднее реально возникшей злокачественной трансформации (Guerra E.N. et al., 2016). За последние годы в нашей стране существенно улучшилась оснащенность медицинских учреждений высокоэффективным диагностическим оборудованием, появились новые диагностические методики. Однако, несмотря на рост диагностических возможностей, удельный вес активно

выявленных больных раком СОПР на стоматологических осмотрах небольшой, частота диагностических ошибок в отношении дифференцировки предраковых и ранних проявлений злокачественных заболеваний полости рта составляет 58,4-70% (Скородумова Л.О. с соавт., 2012). Удельный вес больных со злокачественными новообразованиями полости рта, выявленных активно, в 2014 г. составил 14,0% от общего числа больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования данной локализации (Каприн А.Д. с соавт., 2015, 2016).

Применяемые в настоящее время диагностические методы достаточно субъективны, так как носят лишь описательный характер качественных изменений в пораженных тканях (Ahn M.J. et al., 2016; Javaid M.A. et al., 2016). Около 25% пациентов имеют скрытые метастазы в лимфатические узлы, которые не проявляются клинически (Kleiner D.E., 2009; Irani S., 2016), поэтому на ранних стадиях опухолевого процесса многие клинико-морфологические прогностические факторы порой малоинформативны.

Агрессивное химиолучевое лечение больных раком СОПР сказывается на иммунном статусе организма и проблеме развития гнойных осложнений в послеоперационный период, что обуславливает необходимость проведения специальных осмотров ротовой полости с профилактическими и лечебными мероприятиями, изучать и совершенствовать методы прогнозирования и лечения гнойных осложнений (Vajaria B.N. et al., 2016; Shridhar K. et al., 2016). Для решения подобных практических задач возникает потребность в дополнительных молекулярных прогностических маркерах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и определять объективный прогноз развития заболевания (Игнатова А.В., 2014 с соавт.; Parkinson E.K. et al., 2016).

Среди потенциальных маркеров онкогенеза в настоящее время выделяют семейство ядерных транскрипционных факторов каппа-В (NF-κB) ответственных за регуляцию свыше 150 генов-мишеней (Sahin K. et al., 2016). В большинстве опухолевых клеток NF-κB постоянно активирован и

находится в ядре в отличие от нормальных клеток, где он находится в цитоплазме в неактивном состоянии (Maruyama W. et al., 2016). Активация этого фактора не только защищает клетки от апоптоза, но также увеличивает их пролиферативную активность, инвазивный, метастатический и ангиогенный потенциал (Yang N. et al., 2016). Регуляция NF-κB сигнального пути нарушена во многих опухолях человека, в том числе и при раке СОПР (Спирина Л.В. и соавт., 2010). Содержание в ткани опухоли рака СОПР NF-κB сопряжено с вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов. Кроме того, ядерные факторы транскрипции регулируют экспрессию воспалительных цитокинов, иммунорецепторов и молекул клеточной адгезии. Важность транскрипционных факторов NF-κB в процессах воспаления и механизмах развития злокачественных заболеваний делает его привлекательной мишенью для потенциальных терапевтических средств (Mc Daniel D.K. et al., 2016).

В существующих системах прогнозирования риска злокачественной трансформации, инвазии и метастазирования при раке СОПР отсутствуют сведения о диагностической значимости кислород-зависимых факторов, которые активируются при гипоксии и запускают в дальнейшем транскрипционную коактивацию в клетках (Кирова Ю.И. 2012). Гипоксия ограничивает рост опухоли, при этом, через стимуляцию факторов ангиогенеза ведет к росту новых сосудов и к метастазированию опухолевых клеток (Новиков В.Е. с соавт., 2015). Кроме того, гипоксия может стимулировать транскрипционные факторы, а следовательно способствовать быстрому делению клеток, включая опухолевые, и наоборот, транскрипционные факторы через активацию кислородчувствительного протеина могут стимулировать развитие гипоксии (Лукьянова Л.Д., 2011).

Таким образом, разработка объективного метода определения злокачественного потенциала рака СОПР и риска развития гнойных осложнений после комплексного лечения заболевания с помощью молекулярных, иммунологических и иммуногистохимических маркеров

является актуальной. Исследований с таким дизайном проведено крайне мало, что не позволяет решить поставленную проблему на современном этапе.

### **Степень разработанности темы**

В настоящее время известно, что самым мощным кислородчувствительным протеиновым комплексом, обладающим транскрипционной активностью является гипоксия-индуцибельный фактор (hypoxia-inducible factor — HIF) (Шабанов П.Д. с соавт., 2010; Новиков В.Е. с соавт., 2013; de Lima P., et al. 2014). Он активируется в физиологически важных местах регуляции кислородных путей внутри клетки, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, включая гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз (Левина А.А., 2009; Perez-Sayans M. et al., 2011; Kang F.W. et al., 2013). В тканях с низким парциальным напряжением кислорода в цитоплазме клеток повышается содержание HIF-1 $\alpha$ , что способствует перемещению HIF1 $\alpha$  к ядру, где он активирует несколько генов-мишеней (Lukyanova L.D. et al., 2013). Известно, что HIF-1 $\alpha$  является активатором экспрессии p53 (Sendoel A. et al., 2010). Однако, в исследованиях показано влияние ядерного транскрипционного фактора карра В (NF- $\kappa$ B) на экспрессию HIF-1 $\alpha$  и его активацию даже в условиях нормоксии (Портниченко В.И. и др., 2012; Van Uden P. et al., 2008).

Рак СОПР относится к опухолям, сопровождающимся обширными зонами некроза, в которых имеет место высокая кислотность и выраженный уровень гипоксии (De Lima P.O. et al., 2014). Гипоксия изменяет потенциал факторов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток (Новиков В.Е.с соавт., 2015). Существуют противоречивые данные о возможности использования HIF-1 $\alpha$  в качестве прогностического критерия для оценки риска прогрессии рака СОПР (Fillies T. et al., 2005; Liang X.H. et al., 2011; Santos M. et al., 2012). Большинство авторов склоняются, что повышенный уровень HIF-1 $\alpha$  в тканях опухоли по сравнению с

окружающими нормальными тканями коррелирует со степенью распространенности рака СОПР и смертностью (Lin P.Y. et al., 2008; De Lima P.O. et al., 2014). Полученные факты позволяют предположить, что HIF-1 $\alpha$  представляет собой патогенетически значимый фактор в развитии рака СОПР, что определяет перспективность изучения путей модуляции его активности в опухолевых клетках.

HIF-1 $\alpha$  влияет на выживание клеток путем изменения местных механизмов врожденного иммунитета, что может сказаться на сроках послеоперационного заживления раны и на последствиях химиолучевого воздействия (Freeman R.S. et al., 2005; Myllyharju J. et al., 2013). Повышенная активность HIF-1 $\alpha$  содействует синтезу защитных факторов биологических жидкостей и увеличивает их бактерицидную активность, обеспечивает усиление реакций врожденного иммунитета на микробную, в том числе бактериальную, инфекцию (Semenza G.L. et al., 2007). Однако, сопряжение «гипоксия-индуцибельный фактор - опухолевая прогрессия - местный иммунный статус» при раке СОПР не изучено ни в одном из современных научных исследований. Неизученной остается также взаимосвязь между прогрессированием рака СОПР, гнойными осложнениями специфического комбинированного лечения и исходными особенностями микробной флоры зубного налета.

Определение иммуногистохимических маркеров является одним из способов количественной оценки пролиферации и апоптоза клеток, а также изменений, идентифицирующих активацию онкогенов или генов-супрессоров (Кутукова С.И. с соавт., 2014). Среди множества прогностических признаков прогрессии рака СОПР, таких как bcl-2, HER2/neu, p53 (Леонтьева Е.С. с соавт., 2013; Кочурова Е.В. с соавт., 2015), на сегодняшний день не выявлены маркеры для оценки риска злокачественной трансформации клеток СОПР с высокой диагностической значимостью, что явилось основанием для проведения настоящей работы.

**Цель работы:** Изучить на основе молекулярно-биологических изменений опухолевой ткани, ротовой жидкости и микробиологических исследований зубного налета больных раком слизистой оболочки полости рта патогенетические взаимосвязи развития гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования рака слизистой оболочки полости рта для выявления факторов прогноза их развития и оптимизации подходов к лечению.

### **Задачи исследования**

1. Изучить особенности клинического течения рака слизистой оболочки полости рта при развитии гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.

2. Исследовать особенности экспрессии транскрипционных факторов, факторов неоангиогенеза и апоптоза в ткани опухоли, ротовой жидкости при развитии гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта.

3. Дать оценку значимости исходных особенностей масс-спектров белков, антимикробного и цитокинового профиля ротовой жидкости, параметров облигатно-анаэробных видов бактерий в зубном налете у больных раком слизистой оболочки рта для развития гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.

4. Изучить патогенетические взаимосвязи между опухолевой экспрессией гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ , его стабилизацией в цитоплазме опухолевых клеток и экспрессией факторов транскрипции, неоангиогенеза и апоптоза в опухоли, концентрацией антимикробного пептида лактоферрина в ротовой жидкости больных раком слизистой оболочки полости рта.

5. У больных раком слизистой оболочки полости рта определить зависимость общей выживаемости больных, частоты гнойных осложнений, прогрессирования заболевания от выраженности экспрессии гипоксия-

индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в ткани опухоли.

6. Выявить оптимальное сочетание исходных диагностических исследований для разделения больных раком СОПР на группы риска по развитию гнойных осложнений, стратификации пациентов по степени риска рецидивирования рака СОПР и метастазирования в регионарные лимфатические узлы.

7. Разработать новые патогенетически обоснованные подходы к противоопухолевой терапии рака СОПР, связанные с профилактикой и коррекцией гнойных осложнений путем применения препарата на основе активации врожденных антимикробных механизмов и стабилизации транскрипционной активности гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ .

#### **Научная новизна исследования.**

Вследствие проведенного научного исследования впервые:

1. Изучена экспрессия факторов транскрипции HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, маркера апоптоза bax в опухолевой ткани в сравнительном аспекте с гистологически неизменной тканью и тканью, граничащей с опухолью, у больных раком СОПР.

2. Определена связь между содержанием в ротовой жидкости ИЛ-8 и лактоферрина, выраженности экспрессии транскрипционных факторов HIF-1 $\alpha$  и NF- $\kappa$ B в ткани опухоли больных раком СОПР с развитием гнойных осложнений комбинированного лечения.

3. В ходе протеомного анализа ротовой жидкости у больных раком СОПР выделен комплекс белков молекулярного профиля слюны, включая гипоксия-индуцибельный фактор-1 $\alpha$ , лактоферрин, с высокой прогностической значимостью для развития гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.

4. Осуществлена оценка связи исходных качественно-количественных характеристик облигатных анаэробов в зубном налете с развитием

последующих гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком СОПР.

5. Оценена роль выраженности опухолевой экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  на клиническое течение рака СОПР, транскрипционную и апоптическую активность опухолевых клеток, неоангиогенез.

6. Предложен новый алгоритм лабораторной, морфологической и иммуногистохимической диагностики для прогноза течения рака СОПР с учетом развития гнойных осложнений после комбинированного лечения.

7. У больных раком СОПР разработаны способы терапевтического воздействия, основанные на профилактике и коррекции гнойных осложнений комбинированного лечения путем стабилизации транскрипционной активности HIF-1 $\alpha$  с ограничением транслокации фактора в ядро.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

- У больных раком СОПР установлен факт прямой зависимости пролиферативного потенциала опухолевых клеток, активности неоангиогенеза, апоптоза, прогрессии опухоли от активности гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в клетках опухоли, что патогенетически обосновывает необходимость лечебного воздействия на стабилизацию гипоксия-зависимого фактора транскрипции.

- Впервые выявлена взаимосвязь экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в клетках опухоли у больных раком СОПР и клинической характеристики заболевания, усиливающаяся с повышением размеров опухоли, стадии заболевания, наличием регионарных метастазов в лимфатические узлы, отдаленных метастазов, гнойных осложнений комбинированного лечения, снижением гистопатологической дифференцировки опухоли, что определяет прогностическую значимость выраженности экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  как фактора прогрессии опухоли.

– Определена прямая связь активации врожденных иммунных механизмов и провоспалительных факторов ротовой жидкости с экспрессией гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в клетках опухоли, что лежит в основе патогенетических механизмов сопряжения развития гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессии опухоли.

– У больных раком СОПР в ходе протеомного анализа ротовой жидкости определены белки молекулярного профиля слюны (гипоксия индуцибельный фактор-1 $\alpha$ , лактоферрин), ассоциированные с развитием гнойных осложнений после комбинированного лечения, что расширяет возможности скрининговой диагностической значимости протеомики слюны.

– Разработаны лечебные способы стабилизации гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в клетках опухоли путем системного и местного применения препарата на основе лактоферрина, что позволяет прогнозировать и предупредить гнойные осложнения комбинированного лечения и снизить способность опухоли к раннему рецидивированию и метастазированию.

– Патогенетически обосновано применение оптимальных сочетаний диагностических тестов для раннего прогнозирования рецидивов и метастазов рака СОПР, гнойных осложнений после комбинированного специализированного лечения.

– Внедрение алгоритма определения риска гнойных осложнений оперативного лечения рака СОПР позволит своевременно определить объем лечебных мероприятий для их профилактики.

– Разработанный алгоритм оценки факторов транскрипции, апоптоза, неоангиогенеза в операционном материале, показателей врожденного иммунитета в ротовой жидкости способствует повышению эффективности раннего прогнозирования рецидивов и метастазов рака СОПР за счет определения наиболее успешных комбинаций тестов.

– Успешная комбинация иммуногистохимических и иммунологических тестов как система контроля риска гнойных осложнений, а также прогрессирования опухоли обеспечивает своевременность и эффективность профилактических мероприятий.

### **Методология и методы исследования.**

Работа выполнена в соответствии с методологическими принципами доказательной медицины и проведения сравнительного анализа скрининговых, диагностических, прогностических тестов, клинической эффективности терапевтических мероприятий в группах больных по типу «случай-контроль», оценки достоверности относительных величин риска, чувствительности, специфичности.

При проведении исследования были использованы клинические методы (жалобы, анамнез, осмотр, пальпация, общий и биохимический анализы крови, МРТ), морфологические (световая микроскопия, иммуногистохимическое исследование образцов тканей, полученных при биопсии и операции), масс-спектрометрия MALDI-ToF белков ротовой жидкости, метод ПЦР в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, современные статистические способы обработки полученных результатов.

### **Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту.**

1. Низкая стабилизация гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ , зависящая от концентрации лактоферрина в ротовой жидкости, транслокация NF-1 $\alpha$  в ядро из цитоплазмы с последующей активацией транскрипционных ядерных факторов каппа-B, стимуляцией ангиогенеза за счет усиленной экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в опухоли являются патогенетической основной высокого риска прогрессирования рака СОПР.

2. У больных раком СОПР высокий риск развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения патогенетически обусловлен снижением содержания антимикробных белков в ротовой

жидкости, повышением титра патогенной микробиоты ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF-A, регулирующего проницаемость сосудов.

3. С проспективной прогрессией злокачественного заболевания у больных раком СОПР сопряжено развитие гнойных осложнений при комплексном лечении, что определяет необходимость активной профилактики осложненного течения комбинированного противоопухолевого лечения, эффективных лечебных мер по купированию гнойно-некротических последствий хирургического вмешательства.

4. У больных раком СОПР с высоким риском гнойных осложнений системное и местное использование препарата на основе антимикробного белка лактоферрина в послеоперационный период позволило профилактировать осложненное течение после операции, снизить пролиферативный и метастатический потенциал клеток опухоли за счет стабилизации гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в цитоплазме.

#### **Степень достоверности и апробация работы.**

Достоверность проведенного исследования определялась формированием клинического исследования на достаточном количестве пациентов в группах (n=162), наличием групп сравнения, использованием современных методов диагностики и лечения больных, обработкой полученных результатов современными методами статистического анализа.

Результаты проведенной научной работы доложены и обсуждены на межкафедральном заседании федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на Международной научной конференции «Инновационные медицинские технологии» (Сочи, 8-11 октября 2015), Международном конгрессе «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» (Москва, 17-19 ноября 2015), XVII Ежегодном научном форуме «Стоматология 2015», «Новое в стоматологии» (г. Москва, 7 декабря

2015 г.), Ежегодном совещании Американского общества клинической онкологии 16ASCO (Чикаго, 3-7 июня, 2016), IX съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 15-17 июня 2016), II Петербургском форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 22-24 июня, 2016).

#### **Внедрение результатов исследования.**

Полученные результаты исследования внедрены в клиничко-диагностическую практику лечебных учреждений: отделение опухолей головы и шеи ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, отделения челюстно-лицевой хирургии МБУЗ «Городская больница №20 г. Ростова-на-Дону», ГАУ РО «Стоматологическая поликлиника», стоматологическая поликлиника федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертации внедрены в учебный процесс кафедры онкологии, кафедры стоматологии №3 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

#### **Публикации результатов исследования.**

По материалам диссертации опубликовано 27 научных работ в отечественной и зарубежной печати, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ для публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

#### **Личный вклад автора в исследование.**

Автором проведен аналитический обзор источников отечественной и зарубежной литературы, лично разработаны и апробированы методологические и методические основы данного научного исследования. Автор принимал непосредственное участие в клинических исследованиях и лечении больных. Диссертант самостоятельно разработал основные идеи и алгоритм обработки полученных результатов проведенных исследований, проводил их анализ, обобщения и подготовку публикаций. На основании

полученных результатов исследования сделаны обоснованные выводы и предложены практические рекомендации.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертационная работа изложена на 234 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, четырех результативных глав, заключения, выводов и научно-практических рекомендаций, библиографии, включающей 63 источников на русском и 137 на иностранных языках, всего 200 источников. Работа содержит 47 рисунков и 97 таблиц.

## ГЛАВА 1

# ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

### 1.1. Эпидемиологические особенности и классификация злокачественных опухолей полости рта

В структуре онкологической заболеваемости и смертности плоскоклеточные карциномы слизистой оболочки полости рта удерживают одни из ведущих позиций, демонстрируя зависимость распространенности от территории проживания пациентов и национальных традиций питания, вредных привычек. В мире ежегодно выявляются 500000 новых случаев злокачественных опухолей головы и шеи, из них около 270000 больных умирают в течение первого года после диагностирования заболевания (Спирин А.С. с соавт., 2016).

Злокачественные опухоли полости рта эпителиального строения в 90-95% случаев представлены плоскоклеточным ороговевающим раком (Будовский А.И. с соавт., 2014; Чойнзонов Е.А. с соавт., 2015). В мире плоскоклеточная карцинома СОПР находится на 6 месте по частоте среди злокачественных опухолей всех локализаций (Chaitanya N.C. et al., 2016). В европейской части России на 100000 населения число заболевших злокачественными опухолями СОПР составляет от 1,3 до 2,7 (Гарбузов М.И. с соавт., 2012; Иванов В.М. с соавт., 2012). По всей Российской Федерации от общего числа заболевших злокачественными онкологическими заболеваниями на рак полости рта приходится 2-4% пациентов (Викулова Ю.В., 2012), на долю плоскоклеточных опухолей головы и шеи - 4,4%, а среди мужчин – 7,9% (Агабекян Г.О. с соавт., 2014) . В странах Средней Азии число больных с плоскоклеточными карциномами СОПР достигает в среднем 4,3 на 100 000 человек (Пачес А.И., 2013). В Узбекистане заболеваемость составляет 8,7% (Соловьев М.М., 2003). В Индии на

злокачественные заболевания СОПР приходится рекордный процент от общего числа злокачественных опухолей всех локализаций - 52% (Larsen-Reindorf R. et al., 2014). В США от общего числа заболевших злокачественными онкологическими заболеваниями на рак полости рта приходится 8% больных (Larsen-Reindorf R. et al., 2014). 65% злокачественных опухолей в полости рта поражают язык, в 12,9% - слизистую щек, 10,9% приходятся на дно полости рта, 9% - на слизистую оболочку альвеолярных отростков верхней челюсти и твердого неба, 6,2% - на мягкое небо, 6% - на слизистую оболочку альвеолярного отростка нижней челюсти, 1,5% опухолей выявляются в области язычка мягкого неба и 1,3% - на область передних небных дужек (Неробеев А.И. с соавт., 2010; Янова Н.А. с соавт., 2009; Brown J.S. et al., 2016).

При развитии рака СОПР имеются гендерные особенности. Данная группа онкологических заболеваний у мужчин по сравнению с женщинами встречается в 5-7 раз чаще (Бузов Д.А. с соавт., 2012; Кропотов М.А. с соавт., 2010). Больные раком СОПР находятся в основном в возрастном диапазоне от 60 до 70 лет. До 40 лет и после 80 лет заболевание встречается редко (Mirabile A. et al., 2016). Число больных раком СОПР нарастает после 40 лет (Gogarty D.S. et al., 2016). Однако, злокачественные образования полости рта могут встречаться и у детей от 14 лет. В своем руководстве А.И. Пачес (2013) приводит клинические случаи развития заболевания у детей 4-летнего возраста.

Эффективное выявление признаков малигнизации предраковых заболеваний СОПР остается актуальной задачей стоматологии. По итогам исследований В.П. Харченко (2005) 75% больных при обращении в специализированные лечебно-профилактические учреждения имели проявления злокачественного заболевания III–IV стадии. Причинами поздней диагностики злокачественных образований СОПР является недостаточная настороженность стоматологов, диагностические ошибки, низкий профессионализм (Кулаков А.А. с соавт., 2015; Спицына В.И. с соавт., 2008).

Так, только 42,8% стоматологов могут правильно дифференцировать предраковые и ранние проявления злокачественных заболеваний СОПР, только 4,2% применяют к пациентам обоснованный комплекс диагностических мероприятий для выявления рака СОПР. При этом, частота диагностических ошибок в отношении его выявления составляет 58,4-70% (Скородумова Л.О. с соавт., 2012).

Кроме поздней диагностики рака СОПР, к анатомо-топографическим особенностям рака данной локализации относят раннее поражение регионарных лимфатических узлов (Zhan K.Y. et al., 2016). Данное обстоятельство требует проведения комбинированного лечения, что сказывается на иммунном статусе организма и проблеме развития гнойных осложнений в послеоперационный период (Иванов В.М. с соавт., 2013;

Xie L. et al., 2016). У пациентов с карциномами СОПР после лучевого, химиотерапевтического и оперативного воздействия эрозивно-язвенные изменения развиваются в 85,1%, инфекционные раневые осложнения, связанные с некрозом кожно-мышечного или кожно-жирового лоскутов в 55,4%, ангулярный стоматит в 13,8%, остеомиелит челюсти в 13,4% (Иванов В.М. с соавт., 2009; Матякин Е.Г. с соавт., 2013; Javed F. et al., 2016).

Клиническая картина рака СОПР зависит от локализации, формы роста и гистологического строения опухоли. Согласно Международной гистологической классификации злокачественных опухолей полости рта и ротоглотки четвертого пересмотра среди эпителиальных злокачественных новообразований выделяют интраэпителиальную карциному (*carcinoma in situ*) и плоскоклеточный рак. Интраэпителиальная карцинома поражает эпителий без нарушения базальной мембраны и встречается в 5-10% случаев (Kimple A. et al., 2014). Плоскоклеточный рак прорастает в подлежащую соединительную ткань. К разновидностям плоскоклеточного рака относят ороговевающий плоскоклеточный рак, объединяющий массивы ороговевшего эпителия с эндофитными выростами ("раковые жемчужины"); неороговевающий плоскоклеточный рак с разрастанием

плоскоэпителиальных клеток без эндофитных выростов и низкодифференцированный рак (Скил Роланд Т., 2011).

Критериями степени малигнизации или злокачественности выступают выраженность пролиферации и дифференциация опухолевой ткани (Almeida F.T. et al., 2016). Выделяют три степени малигнизации. Для 1 степени малигнизации характерно наличие большого числа эпителиальных жемчужин, выраженное ороговение клеток, минимальные проявления ядерного и клеточного полиморфизма при отсутствии митозов, сохраняются межклеточные мостики.

При 2 степени малигнизации отсутствуют эпителиальные жемчужины, ороговение межклеточные мостики. Полиморфизм клеток и ядер умеренный, встречаются 2-4 фигуры митоза с атипизмом, редкие многоядерные гигантские клетки.

При 3 степени малигнизации отсутствуют эпителиальные жемчужины, ороговение межклеточные мостики. Число митозов более 4, часто наблюдаются атипичные митозы, выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, типичны многоядерные гигантские клетки (Лукиных Л.М. с соавт., 2015).

Согласно морфологическим проявлениям злокачественных опухолей полости рта выделяют папиллярные, язвенные и узловые формы опухолей (Петров Н.Н., 2004; Черемисин В.М. с соавт., 2009). В работе Пачес А.И. с соавт. (2013) были выделены две формы злокачественных опухолей полости рта: бородавчатые (экзофитные) и инфильтрирующие (эндофитные). Эндофитные формы опухолей более злокачественные и имеют худший прогноз.

По Международной гистологической классификации злокачественных опухолей полости рта и ротоглотки четвертого пересмотра помимо карцином выделяют гемангиоэндотелиому (ангиосаркому), фибросаркому, липосаркому, рабдомиосаркому, лейомиосаркому, хондросаркому, гемангиоперицитому.

Регионарное метастазирование рака СОПР в 40-70% носит лимфогенный характер (Любаев В.Л. с соавт., 2006). Частота и локализация регионарных метастазов определяется такими факторами как гистологическое строение, локализация и размеры опухоли, степень ее дифференцировки, особенности лимфоангиоархитектоники в пораженном органе (Ваккер А.В., 2002; Paudyal P. et al., 2014). Рак дистального отдела языка метастазирует в 2 раза чаще проксимального отдела (75% против 35%). При локализации рака в среднебоковых отделах и в области кончика языка метастазы встречаются в подчелюстных, средних глубоких шейных лимфотических узлах шеи (Khan Z. et al., 2014). В случае рака дна полости рта, слизистой оболочки щек и альвеолярных отростков нижней челюсти метастазирование происходит в поднижнечелюстные лимфоузлы (Choby G.W. et al., 2014). В средние и верхние яремные лимфоузлы чаще метастазируют опухоли дистальных отделов полости рта (Коваль И.В., 2012). Метастатическое поражение подбородочных, надключичных лимфоузлов происходит редко. При локализации опухоли в области оральной поверхности альвеолярных отростков верхней челюсти метастазы встречаются в позадиглочных узлах, с трудным доступом при пальпации и удалении (Аладин А.С., с соавт., 2012). При дистальных локализациях рака СОПР и регионарных метастазах прогноз выживаемости больных резко ухудшается (Машкиллейсон А.Л., 1970).

Частота отдаленных метастазов рака СОПР 2-5%, а по данным онкологического регистра США – 1-5% (Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990-2013). Отдаленное метастазирование происходит в легкие, сердце, печень, мозг, кости скелета и свидетельствует об инкурабельном состоянии больного (Clark C.M. et al., 2014; Kimple A.J. et al., 2014).

Определение степени распространенности рака СОПР по системе TNM происходит с учетом критериев, отраженных в таблице 1.1.

Таблица 1.1

## Классификация рака СОПР по системе TNM (Собин С.Х. с соавт., 2011)

Т – первичная опухоль	N - региональные лимфатические узлы	M – Отдаленные метастазы
<p>ТХ - первичная опухоль не может быть оценена;  Т0 – отсутствие данных о первичной опухоли;  Тis - карцинома in situ;  Т1 - опухоль не более 2,0 см в наибольшем измерении;  Т2 - опухоль от 2,0 до 4,0 см;  Т3 - опухоль более 4,0 см в наибольшем измерении;  Т4а - <i>Губа</i>: опухоль прорастает в кортикальный слой кости, нижний альвеолярный нерв, дно ротовой полости или кожу (подбородка или носа)  <i>Полость рта</i>: опухоль прорастает в кортикальный слой кости, глубокие/наружные мышцы языка (подбородочно-язычную, подъязычно-язычную, нёбно-язычную и шило-язычную), верхнечелюстную пазуху или кожу лица;  Т4б - <i>Губа и полость рта</i>: опухоль прорастает в жевательное пространство, крыловидную пластинку, основание черепа или внутреннюю сонную артерию.  Примечание: Первичная поверхностная эрозия кости/зубов в области лунки десны не является основанием для классификации опухоли как Т4.</p>	<p>NX – региональные лимфатические узлы не могут быть оценены  N0 – нет метастазов в региональных лимфатических узлах  N1 – метастаз не более 3 см в наибольшем измерении в одном лимфатическом узле на стороне поражения  N2 – метастазы:  N2а – метастаз более 3 см, но не более 6 см в наибольшем измерении в одном лимфатическом узле на стороне поражения  N2b - метастаз не более 6 см в наибольшем измерении в нескольких лимфатических узлах на стороне поражения  N2с- метастаз не более 6 см в наибольшем измерении в лимфатических узлах с двух сторон или с противоположной стороны  N3 – метастаз более 6 см в наибольшем измерении в лимфатическом узле  Примечание: срединные узлы рассматриваются как узлы на стороне поражения</p>	<p>Mo – отдаленных метастазов нет  M1 – есть отдаленные метастазы  Mx – недостаточно данных для определения отдаленных метастазов.</p>

*Патологоанатомическая классификация pTNM*

Категории pT и pN соответствуют T и N; pM - отдаленный метастаз подтвержден при гистологическом исследовании. pNO - при частичной

лимфодиссекции узлов шеи гистологическое исследование должно включать не менее 6 лимфатических узлов, при радикальной или модифицированной лимфодиссекции узлов шеи гистологическое исследование должно включать не менее 10 лимфатических узлов.

Если в лимфатических узлах метастазы не выявлены, но исследовано меньшее количество узлов, то классифицируют как pNO.

Если для классификации pN в качестве критерия используют размер метастаза, то измеряют его, а не весь лимфатический узел.

Известно, что приблизительно 25% пациентов имеют скрытые метастазы в лимфатические узлы (Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G., 1999). Тактика лечения пациентов в этом случае сложная – как выявить скрытые метастазы в лимфоузлы, назначать ли полный комплекс лечения больным? Потребность к использованию дополнительных прогностических маркеров в таких клинических ситуациях острая.

Молекулярные механизмы прогрессии злокачественных образований СОПР, а следовательно и молекулярно-генетические маркеры прогрессии изучены недостаточно. Накапливание генетических повреждений при малигнизации приводит к изменению синтеза белков, необходимых для роста опухоли, ее распространения и метастазирования. При увеличении злокачественности и прогрессии опухоли спектр маркеров, ввиду протекания различных биохимических реакций, изменяется. Однако, маркеры прогресси рака СОПР, имеющие высокое прогностическое значение, изучены недостаточно, что определяет актуальность исследования в этом направлении. Выявление таких биохимических маркеров крайне важно для определения индивидуализации тактики лечения и мониторинга за больными раком СОПР.

## **1.2. Молекулярно-генетические маркеры рака слизистой оболочки полости рта**

В процессе жизнедеятельности опухолевая ткань начинает

продуцировать вещества, необходимые для реализации тех или иных функций. Такие продукты жизнедеятельности клеток не свойственны нормальным клеткам и получили название маркеров опухолевой прогрессии (Спирина Л.В., 2013; Lynch С.С., Matrisian L.M., 2002). Маркеры опухолевой прогрессии необходимы для характеристики инвазивного роста, экстравазации, разрушения барьеров на пути распространения опухоли - базальных мембран, внеклеточного матрикса, тканевых элементов.

Вне зависимости от локализации при малигнизации в клетках опухоли наблюдается активация онкогенов или генов-супрессоров, активность которых может идентифицироваться иммуногистохимическим методом. К таким онкогенам относят bcl-2 (B-cell lymphoma 2), ras p21 (обладает ГТФ-азной активностью и играет ключевую роль во внутриклеточной передаче сигналов), HER2/neu (ген, кодирующий рецептор типа 2 для человеческого эпителиального фактора роста) и гены-супрессоры p53 и Rb (retinoblastoma gene) (Дибиров Р.К. с соавт., 2013). Их рассматривают как независимые прогностические признаки онкопрогрессии. Эпителий СОПР является наиболее частой локализацией рака. Причиной этому может быть сбой механизмов контролирования гиперплазии эпителия и плоскоклеточной метаплазии. Кроме того, может наблюдаться нарушение дифференцировки клеток, поскольку при раке СОПР происходит активация маркеров дифференцировки эпителиальных клеток - цитокератинового фенотипа (Бабиченко И.И. с соавт., 2011), наблюдается гиперэкспрессия раково-эмбрионального антигена (РЭА), маркера пролиферации Ki - 67 (Скородумова Л.О. с соавт., 2012).

Остановимся на особенностях экспрессии известных генетических маркеров при раке СОПР.

Белковый продукт опухолевого гена-супрессора p53 относится к ядерному транскрипционному фактору. Под влиянием данного маркера происходит блокирование клеточного цикла в эпителии СОПР и индуцируется апоптоз (Asay R.R. et al., 2006). Блок клеточного цикла под

влиянием белка p53 при экспрессии соответствующего гена происходит во многих клетках, поэтому эпителий СОПР не является исключением. Если повреждения гена p53 отсутствуют, то белок p53 находится в неактивном состоянии. Если же происходят мутации гена p53, то соответствующий белок начинает активироваться. Его активация проявляется в способности связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов, содержащих в регуляторной области специфичную нуклеотидную последовательность p53-response element. Мутации гена p53 в раковых клетках наблюдаются в 50%. Белок p53 накапливается в ядре и при иммуногистохимическом исследовании обеспечивает отчетливое ядерное прокрашивание.

Для развития апоптоза ведущую роль играет «дикий» тип гена-онкосупрессора wt-53, который кодирует соответствующий белок p53. При мутации ДНК наблюдается экспрессия гена wt53 и синтез протеина p53, который блокирует клеточный цикл в G1-S фазе. В результате происходит ингибция дальнейшего процесса репликации поврежденной ДНК, поврежденный локус удаляется, наступает репарация поврежденного локуса. У больных раком СОПР было обнаружено, что при достижении репарации клетка делится и генерирует здоровый пул клеток. В случае отсутствия репарации запускаются механизмы, ответственные за гибель эпителиальной клетки СОПР с мутагенной ДНК (апоптоз) (Ebrahimi M. et al., 2008).

В работе Murti P.R. et al. (1998) при красном плоском лишае СОПР иммуногистохимическим методом была проведена оценка прогностической значимости экспрессии p53 в ткани относительно вероятности развития малигнизации (Murti P.R. et al., 1998). Авторы не выявили диагностической информативности гиперэкспрессии p53 в отношении злокачественного потенциала при красном плоском лишае СОПР. Было высказано предположение, что пик гиперэкспрессии p53 совпадает с этапом перехода предрака в рак и не имеет диагностической информативности в отношении своевременного прогноза.

Напротив, в работе De Sousa F.A. et al. (2009) была подтверждена прогностическая значимость p53 как маркера злокачественного потенциала при трансформации предрака в рак СОПР.

В работе Ebrahimi M. et al. (2008) было установлено, что ген TP53 кодирует около 9 различных изоформ белка с разной прогностической значимостью в отношении развития рака СОПР. Кроме того, p63 семейства p53 кодирует 6 различных изоформ белка и имеет большую роль в отношении развития рака СОПР. Экспрессия белка p63 отмечается исключительно в эпителиальных клетках. Причем, в норме p63 в отличие от p53 детектируется в многослойном плоском эпителии, его экспрессия ограничена базальными клетками. Изоформа p63 без N-терминального домена трансактивации ( $\Delta Np63\alpha$ ) может экспрессироваться в интактном эпителии (Westfall M. D. et al., 2004), а изоформа p63 с N-терминальным доменом трансактивации (TAp63) активирует транскрипцию генов-мишеней и функционирует как p53.  $\Delta Np63$  может функционировать как онкоген и является его антагонистом – репрессором, в неизменном эпителии отвечает за окончательную дифференциацию кератиноцитов и обуславливает наличие камбиальных (стволовых) клеток (Moll U. M. et al., 2004; Koster M. I. et al., 2007). Для гена p63 не характерны мутации, а могут наблюдаться амплификации, что является причиной оверэкспрессии или избыточного синтеза белка p63 (Weber A. et al., 2002). При злокачественной трансформации лейкоплакии чрезмерная экспрессия белка p63 в клеточных элементах базального слоя сопровождается его накоплением в дифференцированных клетках. Это приводит к детекции белка p63 по всему пласту эпителия (Bortoluzzi M. C. et al., 2004; Chen Y. K. et al., 2005; Saintigny P. et al., 2009). При воспалительном процессе в эпителии белок p63 детектируется только в пределах базального слоя (Chen Y. K. et al., 2005). Количество ядер с позитивным окрашиванием антителами к p63 сопряжено с тяжестью дисплазии (Choi H.R. et al., 2002). Однако, в работах Haniffa A.M. et al. (2007) такой связи не обнаружено. Наличие оверэкспрессии  $\Delta Np63\alpha$

сопровождается высоким риском перехода лейкоплакии СОПР в плоскоклеточный рак в течение трехлетнего периода (Saintigny P. et al., 2009). У 61% больных лейкоплакией при одновременной экспрессии  $\Delta Np63\alpha$ , подоплатина и воспалительных изменениях за 5 лет наблюдения развивался рак СОПР (Saintigny P. et al., 2009). Данный факт выявлен в проспективном когортном исследовании. Авторы выдвинули предположение, что именно p63 ассоциирован с развитием плоскоклеточной карциномы органов головы и шеи. В то же время, есть мнение, что p53 либо p63 не может быть использован как единственный маркер для прогнозирования развития рака СОПР и требует комбинированного применения с другими маркерами (Asay R.R. et al., 2006).

Пролиферативный потенциал раковых клеток в СОПР может контролироваться с помощью маркеров пролиферации. Изученным маркером пролиферативной активности клеток при предраковых процессах, а также уже после формирования опухоли является антиген Ki-67 (Бабиченко И.И. с соавт., 2010). Данный антиген экспрессируется во все фазы клеточного цикла, что хорошо отражает интенсивность пролиферации. Ген, который кодирует Ki-67, находится на длинном плече 10-й хромосомы (Петров С.В. et al., 2004). Белок Ki-67 относится к регуляторным, обнаружение белка совпадает с наступлением митоза клетки, в связи с чем, его относят к универсальному маркеру пролиферации и рак СОПР исключением не является (Asay R.R. et al., 2006). Кроме Ki-67 к маркерам пролиферации относят антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA, протеин эндотелия AgNORs (Ивина А.А. с соавт., 2014). Однако, последние мало изучены при плоскоклеточных карциномах СОПР.

Наряду с инактивацией генов-супрессоров p21, p27, p53, p63, p73, к известным молекулярным маркерам риска развития рака СОПР в регионах с предраковыми изменениями относят микросателлитную нестабильность, активацию протоонкогенов c-ras, c-myc, ploидность ДНК, потерю гетерозиготности, молекулы адгезии - интегрины, кадгерин, CD44,

маркеры дифференциации - кератины, углеводные антигены, а также маркеры ангиогенеза - VEGF, индуцированная синтаза оксида азота iNOS, FGFBP1 – белок 1, связывающий фактор роста фибробластов.

Плоидность ДНК, которая определяется с помощью флуоресцентной проточной или оптической цитометрии, позволяет дать первоначальную оценку генетической нестабильности и аббераций ДНК в клетке. Оценку плоидности ДНК обычно проводят в биопсийных образцах, но можно использовать и соскобы со СОПР (Maraki D. et al., 2004; Pektas Z. O. et al., 2006). В нормальных клетках СОПР определяются генетически стабильные диплоидные клетки. Напротив, в опухолевых клетках, встречаются генетически нестабильные анеуплоидные клетки. Анеуплоидия ДНК в биопсийных образцах из мест лейкоплакии в области языка, мягкого неба, дна полости рта, сопряжена с высоким риском злокачественной трансформации (Torres-Rendon A. et al., 2009; Bradley G. et al., 2010; Islam M. N. et al., 2010).

Под потерей гетерозиготности (loss of heterozygosity – LOH) понимают потерю генетического материала одной из пары хромосом, что устанавливают с помощью микросателлитных маркеров. Например, в локусах 3p14-25 расположен FHIT (fragile histidine triad), в локусах 5q21-23 находится APC (adenomatous polyposis coli), в локусе 9p21 должен присутствовать p16INK4a, представляющий ингибитор циклин-зависимых киназ, на длинном плече хромосомы 13 (13q14) локализован ген Rb, а ген tp53 размещается в локусах 17p12-14. Потеря микросателлитов в этих локусах может быть причиной нестабильности мРНК, сдвига рамки считывания, что приводит к вероятной инактивации гена опухолевого супрессора и последующей злокачественной трансформации. Потеря гетерозиготности при злокачественной трансформации лейкоплакии в 77-100% была выявлена для хромосомных плеч 3p и/или 9p (Rosin M. P. et al., 2000; Jiang W. W. et al., 2001; Zhang L. et al., 2001). При лейкоплакии потеря гетерозиготности в этих локусах приводит к риску развития рака в 3,8 раза, а

присоединение потери микросателлитов в локусах 4q, 8p, 11q или 17p сопровождается повышением риска в 33 раза (Rosin M. P. et al., 2000; Zhang L. et al., 2001; Epstein J. B. et al., 2002).

В исследовании Ye H. et al. (2008) были определены гены, экспрессия которых статистически значимо отличалась в опухолевой ткани плоскоклеточного рака СОПР и неизменной слизистой. Усиление экспрессии было отмечено для генов, кодирующих белки MMP1, MMP10, MMP3, MMP12, PTHLH, INHBA, LAMC2, IL8, KRT17, COL1A2, IFI6, ISG15, PLAU, GREM1, MMP9, IFI44, CXCL1, а ослабление экспрессии для генов, отвечающих за синтез KRT4, MAL, CRNN, SCEL, CRISP3, SPINK5, CLCA4, ADH1B, P11, TGM3, RHCG, PPP1R3C, CEACAM7, HPGD, CFD, ABCA8, CLU, CYP3A5. Наиболее выраженные различия были сформированы для синтеза интерлейкина-8 и ММП-9.

В работе Markopoulos A. et al. (2010) была обобщена информация о молекулярно-генетических маркерах, используемых в диагностике рака СОПР, которая представлена в таблице 1.2.

Не только генетические, но и эпигенетические изменения могут способствовать злокачественной трансформации предраковых изменений в СОПР. В работе Naganuma K. et al. (2014) было доказано, что эпигенетические изменения гена KRT13 (кератин 13) коррелируют со злокачественной трансформацией эпителиальных клеток слизистой ротовой полости и развитием плоскоклеточного рака.

В последнее время в качестве онкомаркера рака СОПР рассматривают белок подопанин, который выявляется в тканях иммуногистохимическим методом. Подопанин является мукопротеином, относится к интегральным мембранным белкам. В клетках СОПР подопанин экспрессируется эндотелиальными клетками лимфатических капилляров в здоровых участках, а также в области воспаления либо неоплазии (Breiteneder Gelef S. et al., 1999). Ebrahimi M. et al. (2008) было установлено, что существует сопряжение между переходом предрака в рак при красном плоском лишае

СОПР и экспрессией подопланина и АТФ-связывающего белка подгруппы G2 (ABCG2).

**Таблица 1.2**

**Молекулярно-генетические маркеры, используемые в диагностике рака СОПР**

Изменения внутриклеточной ДНК	Повреждение транскрипции мРНК	Изменения уровней белковых маркеров
Аллельный локус хромосомы 9p	Презентация интерлейкина-8	Повышение уровня дефензина-1
Мутации митохондриальной ДНК	Презентация интерлейкина-1 $\beta$	Повышение CD44
Мутации гена p53	DUSP1 (двойная специфичность распознавания гена phosphatase 1)	Повышение уровней ИЛ-6 и ИЛ-8
Гиперметилирование промотора генов p16, MGMT, DAP-K	H3F3A (H3 гистон, семейства 3A)	Ингибиторы апоптоза (IAP)
Амплификация гена циклин D1	OAZ1 (орнитина декарбоксилаза антизим 1)	Антиген, ассоциированный с плоскоклеточной карциномой
Увеличение экспрессии маркера Ki67	S100P (S100 кальцийзависимый протеин P)	СЕА (карцинома-эмбриональный антиген), антиген СА-19-9, СА 125, СА 128
Микросателлитные повреждения ДНК	SAT (спермидин/спермин N1-ацетилтрансфераза)	СЕА (карцинома-эмбриональный антиген), антиген СА-19-9, СА 125, СА 128
Присутствие вируса папилломы человека		Промежуточный филамент белка Cyfra 21-1
		Тканевой полипептидный специфический антиген (TPS)
		Химически активности разновидности азота (RNS)
		8-ОНdG маркер повреждения ДНК
		Лактатдегидрогеназа
		Иммуноглобулин IgG
		Секреторный иммуноглобулин А (s-IgA)
		Инсулиноподобный фактор роста IGF
Металлопротеиназы MMP-2 и MMP-11		

При одновременной гиперэкспрессии подопланина и ABCG2 риск малигнизации и развитие рака СОПР повышался по сравнению с оценкой экспрессии факторов по отдельности. Подоплантин признан независимым

маркером повышенного риска злокачественной трансформации эпителия в рак СОПР (Kawaguchi H. et al., 2008).

К биомаркерам развития рака СОПР можно отнести уровень экспрессии Fas/FasL в ткани. Fas (или APO-I, CD95) относится к трансмембранным гликопротеинам I типа и отвечает за индукцию апоптоза. Он экспрессирован во многих тканях, опухолевой ткани, в инфицированных вирусом папилломы человека клетках. При связи Fas с Fas-лигандом (FasL) или агонистами (моноклональные антитела против Fas) происходит индукция апоптоза. Причиной устойчивости различных типов клеток к Fas-зависимому апоптозу может быть повышенная продукция растворимого Fas этими клетками.

При инвазивном росте либо экстравазации опухолевые клетки преодолевают барьеры в виде базальных мембран, внеклеточного матрикса и тканевых элементов с помощью протеолитических ферментов. В норме баланс между протеазами и их ингибиторами поддерживает необходимый уровень протеолиза. В работе Спириной Л.В. (2013) было доказано, что определение тканевой экспрессии протеаз и их ингибиторов позволяет дать оценку прогноза опухолевой прогрессии и риска рецидивирования и метастазирования. Автором было установлено, что у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи по мере распространения опухоли и увеличения стадии злокачественного новообразования, лимфогенного метастазирования наблюдалось повышение тотальной активности протеасом наряду со снижением экспрессии иммунной протеолитической субъединицы LMP2. При активации неспецифического протеолиза в опухолевой ткани происходит накопление дефектных и аномальных белков и полипептидов, что служит толчком к прогрессированию заболевания (Спирина Л.В. с соавт., 2010). Лимфогенное метастазирование плоскоклеточных карцином головы и шеи было сопряжено с изменением содержания в ткани опухоли транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B p50. При вовлечении в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов

происходит повышение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB p50, что коррелируется с ростом активности протеасом. Однако, на стадии опухоли T2-3 на пике активности протеасом наблюдалась минимальная экспрессия транскрипционного фактора NF-κB. Но соотношение субъединиц транскрипционного фактора было смещено в сторону преобладания его активированных форм (Чойнзонов Е.Л. с соавт., 2012).

У больных раком СОПР в экспрессии транскрипционного фактора NF-κB p50 большое значение имеют также кальпаины. Кальпаины относятся к семейству цистеиновых нелизосомальных протеаз, которое представлено 14 изоформами. Специфическим ингибитором кальпаинов является кальпаистатин (Goll D.E. et al., 2003). Кальпаины локализуются преимущественно в цитоплазме. Их активация сопровождается увеличением концентрации внутриклеточного кальция (Немова Н.Н. с соавт., 2010). Субстратом для кальпаинов в зависимости от типа клеток являются белки цитоскелета, - актин, виментин, фодрины (Guicciardi M.E. et al., 2003), а также белки, участвующие в процессах пролиферации клеток и апоптозе: Bax, Bid, Bcl-XL, p53, c-Fos (Goll D.E. et al., 2003; Guicciardi M.E. et al., 2003). Кальпаины участвуют в протеолизе некоторых онкосупрессорных белков - p53, NF2, p107, что сопровождается стимуляцией роста опухолевых клеток (Jang J.S. et al., 2009). Наряду с этим, установлено участие кальпаинов в разрушении таких онкогенных продуктов как рецептор эпидермального фактора роста, тромбоцитарный фактор роста (Rock K.L. et al., 2009), протеинкиназы C, что сопровождается снижением опухолевой прогрессии (Hiwasa T. et al., 2002). Установлено участие изоформы кальпаина-2 в опухолевом ангиогенезе. Повышение экспрессии кальпаина-2 сочетается с повышением основного фактора ангиогенеза VEGF (Su Y. et al., 2006).

С развитием плоскоклеточных карцином связана экспрессия изоформ кальпаина-1 и кальпаина-10 (Reichardt J., 2003; Moreno-Luna R. et al., 2011). В работе Спириной Л.В. (2013) установлено, что у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи в ткани опухоли по сравнению с гистологически

неизменной тканью наблюдалось почти трехкратное увеличение активности кальпаинов. Повышение активности ферментов было зарегистрировано при лимфогенном метастазировании опухоли и при увеличении количества пораженных лимфоузлов. Таким образом, влияние внутриклеточных протеиназ кальпаинов на онкогенез при плоскоклеточных карциномах головы и шеи связано с влиянием на ростовые и транскрипционные факторы, пролиферацию, апоптоз и лимфогенное распространение раковых клеток в организме.

Матриксные металлопротеиназы (ММП, matrix metalloproteinase) представляют собой комплекс цинк-зависимых протеиназ, отвечающих за протеолиз веществ внеклеточного матрикса. ММП вызывают деградацию компонентов базальной мембраны как первого барьера на пути распространения опухолевых клеток. Матриксные металлопротеиназы наряду с тканевыми ингибиторами (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases – TIMP) создают систему, отвечающую за ремоделирование внеклеточного матрикса. От организации внеклеточного матрикса зависит эмбриогенез, ангиогенез, сократость заживления при тканевой деструкции. У больных раком СОПР имеет место гиперэкспрессия ММП, оверэкспрессия TIMP, ассоциированная с повышением инвазии опухоли, лимфогенным метастазированием, поражением большого количества лимфатических узлов, плохой выживаемостью (Чойнзонов Е.Л., с соавт., 2012; Sutinen M. et al., 1998; Katayama A. et al., 2004; de Vicente J. C. et al., 2005). Прогрессия опухоли при раке СОПР сопряжена, прежде всего, с экспрессией ММП-2 и ММП-9, TIMP-1 и TIMP-2 в сыворотке крови (Кондакова И.В. с соавт., 2008). Увеличение уровня экспрессии ММП происходит на уровне мРНК и белка. В работе Jordan R.C. et al. (2004) было выявлено, что уровни мРНК ММП 1 и ММП 9 многократно выше у больных раком СОПР по сравнению с предраком СОПР без злокачественной трансформации. В работе Munck-Wikland E. et al. (1998) показано, что экспрессия стромелизина 3 (ММП 11) является независимым фактором риска малигнизации в области предраковых

изменений СОПР. У 75% больных со стромелизин-3-позитивными дисплазиями СОПР плоскоклеточный рак был диагностирован в течение 5 месяцев.

В работе Клишо Е.В. (2011) было доказано, что для прогноза общей выживаемости больных с плоскоклеточными карциномами головы и шеи можно ориентироваться на экспрессию изоформы ММП-2, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа  $\mu$ -РА, внутриклеточных протеаз катепсинов D и H, а также внутриклеточных ингибиторов цистеиновых протеиназ стефинов A и B в сыворотке крови и опухолевой ткани. Для прогноза безрецидивной выживаемости необходимо оценивать в сыворотке крови и ткани опухоли концентрацию рецептора активатора плазминогена урокиназного типа  $\mu$ -РА (Матякин Е.Г. с соавт., 2009; Герштейн Е.С. с соавт., 2010), опухолевую экспрессию ММП-9, катепсина H, стефинов A и B. При прогнозировании эффективности химиотерапии у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи нужно определять уровень опухолевой экспрессии ММП-2 и ММП-9 (Клишо Е.В., 2011).

В большинстве исследований динамика изменения уровня экспрессии ММП по мере прогрессии предракового заболевания СОПР не отслеживалась. Такие исследования позволяют сделать лишь предварительные заключения о прогностическом значении уровня экспрессии металлопротеиназ (Sutinen M. et al., 1998). Выводы о наличии прогностического значения уровней ММП-1 и ММП-9, которое было выявлено в единичном проспективном когортном исследовании, должны быть подтверждены в аналогичных исследованиях.

В раковых клетках при плоскоклеточной карциноме головы обнаруживается обширная экспрессия белка сурвивина, который является ингибитором апоптоза и регулирует митотическую активность (Lo Muzio L. et al., 2003; Tanaka C. et al., 2003; Khan Z. et al., 2009). В норме в клетках СОПР экспрессия сурвивина происходит в единичных случаях в базальных клетках. У больных раком СОПР при экспрессии сурвивина наблюдается

плохой прогноз в отношении выживаемости (Lo Muzio L., 2003). При дисплазии СОПР отмечают чрезмерную экспрессию сурвивина, уровень которого коррелирует с тяжестью дисплазии (Lo Muzio L. et al., 2003).

Литературный анализ возможностей использования молекулярно-генетических маркеров в отношении выявления риска малигнизации и опухолевой прогрессии при раке СОПР позволил выявить, что на современном этапе система прогнозирования распространенности и метастазирования рака СОПР на основе использования иммуногистохимических, молекулярно-генетических методов в сочетании с клиническими методами диагностики достаточно не разработана. Существующие сведения по изучению иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров при плоскоклеточных карциномах органов головы и шеи, требуют разработки стройной ранжированной диагностической системы по определению риска опухолевой прогрессии. В существующих системах прогнозирования риска злокачественной трансформации, инвазии и метастазирования при раке СОПР отсутствуют сведения о диагностической значимости кислород-зависимых факторов, которые активируются при гипоксии и запускают в дальнейшем транскрипционную коактивацию в клетках. Кроме того, кислород-чувствительные факторы, среди которых самым мощным является гипоксия-индуцибельный фактор-1 $\alpha$ , влияют на выживание клеток путем изменения местных механизмов врожденного иммунитета, что может сказаться на сроках послеоперационного заживления раны и на последствиях после химиолучевого воздействия. Однако, сопряжение «гипоксия - опухолевая прогрессия - местный иммунный статус» при раке СОПР не изучено ни в одном из современных научных исследований. Причиной тому может быть короткий срок известности о гипоксияиндуцибельном факторе, его роли в онкогенезе, воспалении.

### 1.3. Биологические функции гипоксия-индуцибельного фактора-1 и его роль в онкогенезе

Комплекс HIF является гетеродимером, состоящим из одной альфа-субъединицы (HIF- $\alpha$ ) и одной бета-субъединицы (HIF- $\beta$ ) (рис.1.1).

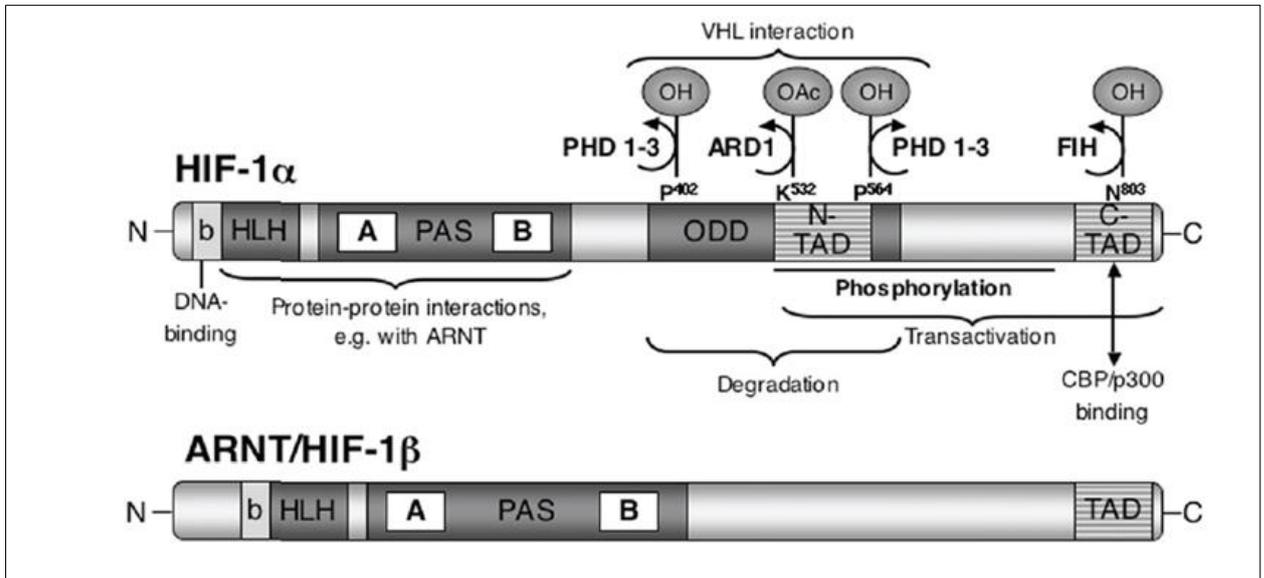


Рис.1.1. Доменная структура HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  (ARNT), внутридоменная локализация основных пост-трансляционных модификаций HIF-1 $\alpha$  и взаимодействий с HIF-1 $\alpha$ . Кислородзависимая деградация домена (ODD) HIF-1 $\alpha$  регулируется путем гидроксирования пролина (P)-402 и -564 (-405 и -531 в HIF-2 $\alpha$ ) с помощью ферментов PHD 1-3. HLH (helix-loop-helix) - спираль-петля-спираль, PAS домен - зоны гомологии  $\beta$ HLH/PerARNT-Sim.

HIF- $\alpha$  существует в виде множества изоформ (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ ) с различными биологическими свойствами. Бета-субъединица названа aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT/ HIF-1 $\beta$ ) (Wang G. L. et al., 1993; Flamme I. et al., 1997; Lando D. et al., 2003). Как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -субъединицы принадлежат к базисному семейству транскрипционных факторов, имеющих в своем составе мотив типа "спираль-петля-спираль" (helix-loop-helix, HLH) и зоны гомологии  $\beta$ HLH/PerARNT-Sim (PAS домен) (рис.1.1). Наличие домена  $\beta$ HLH определяет принадлежность к большому семейству димерных эукариотических факторов транскрипции, в которых домен HLH отвечает за димеризацию, связывание с ДНК и взаимодействие с РНК-полимеразой. Субъединица HIF-1 $\alpha$  является кислород-чувствительной,

она имеет специфическую функцию в стимулированной гипоксией генной регуляции и является мишенью для кислород-чувствительных сигнальных путей. Субъединица HIF-1 $\beta$  является кислород- нечувствительным конститутивным ядерным протеином, который имеет различных партнеров димеризации в других системах генной регуляции (Gu Y. Z. et al., 2000). Обе HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$  субъединицы подвергаются быстрой гипоксической белковой стабилизации и соединяются с идентичной мишенью в последовательности ДНК (Uchida T. et al., 2004).

Локализация ядерного сигнала на С-терминальном конце HIF1 $\alpha$  позволяет ему перемещаться из цитоплазмы в ядро, где он формирует активный HIF-1-комплекс. Таким образом, количество белка HIF1 $\alpha$  в ядре ограничено и определяет функциональную активность HIF-1-комплекса. HIF1 $\alpha$  связывается с 6-bp[5'-ACGTG(C/G)-3'] в гипоксия-реакционных элементах, которые функционируют как усилители транскрипции в гипоксия-ассоциированных генах (Ryu M.H. et al., 2010) (рис.1.2).

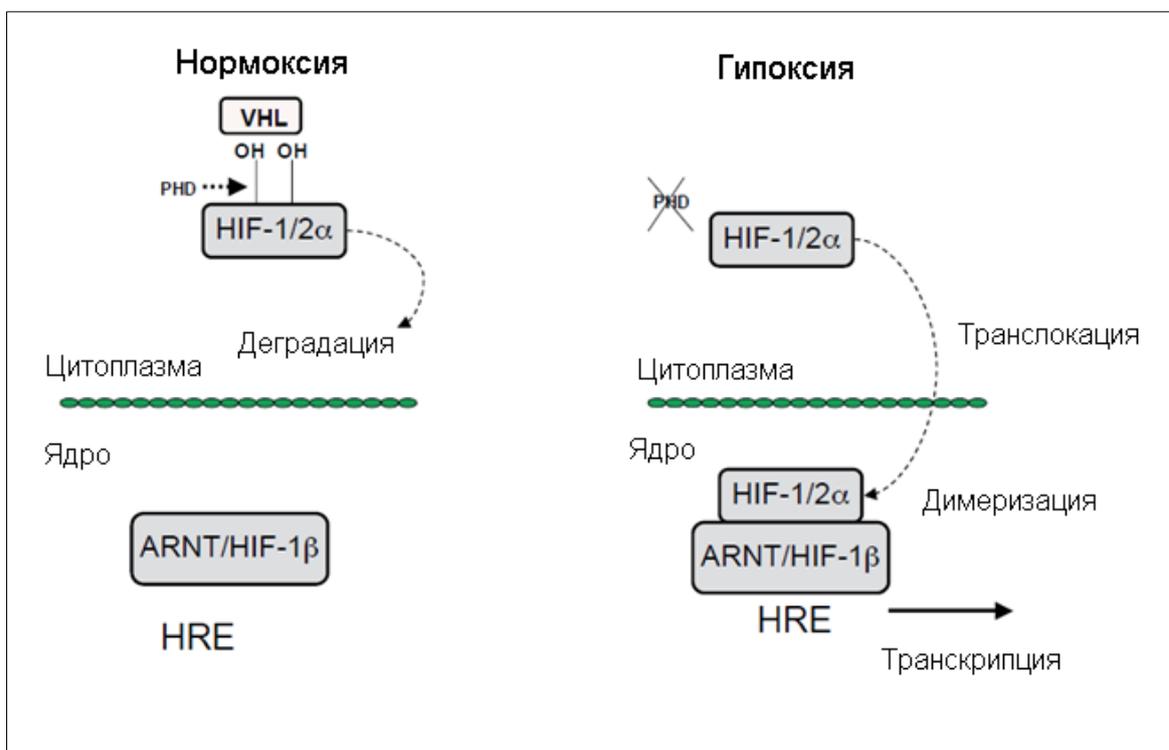


Рисунок 1.2. Кислород-зависимая регуляция HIF- $\alpha$  активации. При нормоксии происходит гидроксирование ферментом пролилгидроксилазой (PHD). Это изменение вызывает конформационные изменения, которые при участии белка опухолевого супрессора VHL (von Hippel-Lindau) ведут к протеосомной деградации и низкой концентрации HIF- $\alpha$  в

ткани. При гипоксии ферменты PHD неактивны и фактор HIF- $\alpha$  перемещается к ядру, подвергается димеризации и способствует синтезу транскрипционных факторов.

Способность кислорода влиять на активацию HIF осуществляется на нескольких стадиях, включающих регулируемый синтез, процессинг и стабилизацию HIF1 $\alpha$ , ядерную локализацию, димеризацию и взаимодействие с транскрипционными коактиваторами. На сегодняшний день анализ регуляторных механизмов, обеспечивающих активацию HIF гипоксическими и негипоксическими стимулами, позволяет говорить о вовлечении различных способов активации HIF (Jiang J. et al., 2011).

В нормоксических условиях субъединицы HIF-1 $\alpha$  постоянно присутствуют в клетке, но характеризуются исключительно коротким периодом полураспада. Их концентрация поддерживается на низком уровне благодаря нескольким процессам, и в первую очередь двумя независимыми путями гидроксилирования: пролил и аспарагин гидроксилированию. Присутствие кислорода запускает гидроксилирование пролинового остатка HIF-кислородзависимого домена деградации ODD (oxygen-dependent degradation domain). Это гидроксилирование катализируется семейством внутриклеточных пролин гидролаз (PHD). Присутствие кислорода также вызывает гидроксилирование аспарагинового остатка С-терминального домена трансактивации (С-TAD) HIF-1 $\alpha$ , блокируя взаимодействие с ко-активатором транскрипции p300/CBP [18]. Этот процесс регулируется специфической аспарагин\_гидроксилазой, названной FHN-1 (factor-inhibiting HIF-1) (Hewitson K. S. et al., 2002; Masson N. et al., 2003). В результате, в присутствии кислорода активные ферменты PHD и FHN инактивируют HIF, тем самым блокируя опосредованную HIF генную транскрипцию. В условиях гипоксии PHD и FHN ферменты инактивируются, и отсутствие гидроксилирования ведет к стабилизации HIF и активации С-TAD, который способен формировать ДНК-связанный гетеродимер с постоянно присутствующей HIF- $\beta$  субъединицей и усиливать ко-активатор p300/CBP.

Иными словами, недостаток кислорода инактивирует PHD и FIH ферменты, что ведет к активации HIF, который в свою очередь запускает экспрессию гипоксия-зависимых генов, таких как эритропоэтин (EPO) и сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF (Серебровская Т.В. 2005; De Lima P.O. e al., 2014).

Нарушения перехода опухолевой клетки от G1 фазы к S фазе может вызывать HIF1 $\alpha$ -опосредованная активация циклин-зависимых ингибиторов киназы p21 и p27 (Soengas M.S. et al., 1999). Гипоксия может индуцировать апоптоз в нормальных и опухолевых клетках (Серебровская Т.В. 2005). Повышенный уровень p53 в условиях гипоксии может привести к активации апоптоза посредством эффекторов - APAF1 (apoptotic protease activating factor-1 и каспазы-9 (Soengas M.S. et al., 1999). Однако, гипоксия может запускать p53-независимый апоптоз с участием генов В-клеточной лимфомы 2 (BCL2) (De Lima P.O. e al., 2014). Длительное гипоксическое воздействие ведет к ограничению энергетического обмена и некротической гибели клеток (Soengas M.S. et al., 1999).

Гипоксия может также воздействовать на более общие механизмы регуляции генов, в частности на процесс метилирования. Центральный связывающий участок HIF-1 (5'-CGTG-3') содержит островок CpG, метилирование которого, как было показано, может «снимать» активацию гена. Большинство регулируемых гипоксией генов зависят от HIF-1 $\alpha$ , но при гипоксии активируются и другие транскрипционные факторы, такие, как NF $\kappa$ B, AP-1, c/EBP $\beta$  и Egr-1.

Генетические аномалии, часто наблюдаемые в опухолях человека, включая мутации потери функции (например, VHL, p53 и PTEN), также связаны с увеличенной экспрессией HIF-1 $\alpha$  и HIF-1-индуцибельных генов. К настоящему времени установлено, что HIF-1 $\alpha$  активирует более 70 «мишеных» генов.

Бактериальная инфекция вызывает HIF-1 $\alpha$  экспрессию в миелоидных клетках даже при нормоксии. HIF-1 $\alpha$  регулирует синтез важных молекулярных эффекторов иммунной защиты, включая гранулированные протеазы, антимикробные пептиды, оксид азота и TNF- $\alpha$ . Бактериальная инфекция активирует подкласс HIF-1 $\alpha$  генов-мишеней, специфически связанных с уничтожением микробов. Данный факт свидетельствует о том, что HIF-1 $\alpha$  обладает жизненно важной функцией во врожденном иммунитете, отличной от гипоксической реакции. Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  является важным регуляторным фактором для бактерицидной активности миелоидных клеток, что способствует ограничению системного распространения инфекции из первичного очага воспаления. Повышение активности HIF-1 $\alpha$  путем vHL делеции приводит к синтезу миелоидными клетками защитных факторов, что увеличивает бактерицидную активность и уничтожение бактерий, усиление врожденных иммунных реакций на микробную инфекцию.

Развитие агрессивности опухоли, как правило, связано с возникновением мутаций в онкогене или опухоль-супрессорных генах. Гипоксия способствует геномной нестабильности за счет увеличения числа мутаций (Shang Z.J. et al., 2007). Опухолевые клетки с протеомной и геномной адаптацией к гипоксии имеют преимущества в выживании, их количество увеличивается благодаря клоновой селекции. Увеличение числа этих клонов ведет к формированию порочного круга, включающего гипоксию, прогрессирование злокачественной опухоли и формирование сопротивления к терапевтическому воздействию (Brennan P.A. et al., 2005).

Гипоксия изменяет потенциал факторов, регулирующих дифференцировку клеток, за счет поддержания раковых стволовых клеток, что позволяет накапливать множество генетических и эпигенетических изменений в течение длительного периода времени, способствующих озлокачествлению (Weinberg R.A., 2014). Кроме того, некоторые авторы

предположили, что гипоксические факторы в окружении опухоли способствуют экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП) (De Lima P.O. et al., 2014).

В различных условиях HIF1 $\alpha$  может провоцировать как образование злокачественных опухолей, так и апоптоз. Существуют противоречивые данные о возможности использования этого фактора в качестве прогностического (Liang X.H. et al., 2011). Во всяком случае, повышенная экспрессия HIF-1 зарегистрирована при всех онкологических заболеваниях человека (Liang X.H. et al., 2011). Это подтверждается иммуногистохимическими изучениями биопсий опухолевых тканей. Повышенный уровень HIF-1 $\alpha$  в этих тканях по сравнению с уровнем в окружающих нормальных тканях обычно коррелирует со степенью развития рака и смертностью (Lin P.Y. et al., 2008).

Итак, пока первичная опухоль не сформировала адекватное кровоснабжение, уменьшенная диффузия кислорода из окружающих тканей лимитирует ее рост. Нерегулируемая пролиферация неопластических клеток, недостаточное кислородное обеспечение, ввиду хаотично расположенных внутриопухолевых микрососудов, приводит к созданию гипоксии опухоли. Гипоксия усиливает геномную нестабильность и неоднородность, обеспечивая селективное положение для клеток, которые могут выжить и размножиться в концентрациях даже с очень низким содержанием кислорода. Этот адаптивный ответ к гипоксии в опухоли приводит к возникновению раковых клеток с повышенным потенциалом для ангиогенеза, вторжения в ткани и распространения опухоли, а также сопротивления к химиотерапии. Гипоксические условия в раковых опухолях вызывают освобождение цитокинов, которые стимулируют экспрессию VEGF, а следовательно, васкуляризацию и тем самым увеличивают рост опухоли и метастазирование (рис.1.3).

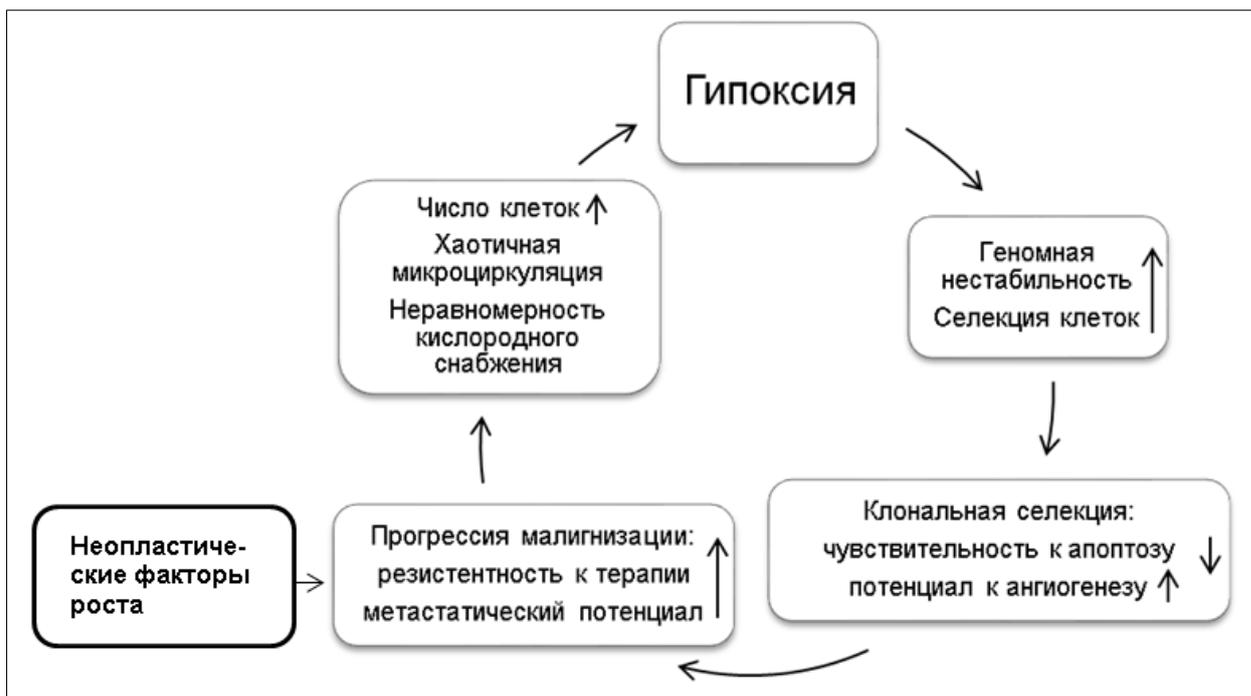


Рис. 1.3. Роль гипоксии в злокачественной прогрессии солидных опухолей.

Последние исследования раскрыли механизм, благодаря которому стабилизация HIF1 $\alpha$  ведет к инициации транскрипции генов-мишеней, включенных в рост кровеносных сосудов (Brennan P.A. et al., 2005). Вместе с тем, остается невыясненным, на каких стадиях развития заболевания следует тормозить продукцию HIF1 $\alpha$ .

#### 1.4. Гипоксия-индуцибельный фактор-1 и прогноз больных раком слизистой оболочки полости рта

Рак СОПР зачастую сопровождается быстрым и неограниченным ростом, что ведет к формированию тканевой гипоксии (Brennan P.A., 2005; Eckert A.W., 2012). Гипоксия индуцибельный фактор-1 (Hypoxia-inducible factor-1, HIF1) является ключевым регулятором клеточного ответа на гипоксию (Lin P.Y. et al., 2008). HIF1 $\alpha$  функционирует как активатор транскрипции при гипоксии. Связываясь с промоторами более 100 генов, задействованных в биологии опухолей, фактор HIF1 $\alpha$  участвует в канцерогенезе (Gu Y. Z. et al., 2000; Eckert A.W. et al., 2011). HIF1 $\alpha$  при развитии гипоксии в опухолевой ткани стимулирует ген синтеза фактора

роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Данное обстоятельство усиливает ангиогенез и адаптацию ткани к гипоксии. Экспериментальные исследования показали связь между секрецией HIF1 $\alpha$ , VEGF и прогнозом плоскоклеточной карциномы языка (Kang F.W. et al., 2013). Пациенты с отсутствием или слабой экспрессией HIF1 $\alpha$  имели более высокие показатели выживаемости, чем больные раком СОПР с умеренной или высокой экспрессией HIF1 $\alpha$  (Kang F.W. et al., 2013).

Гипоксия способствует накоплению HIF1 $\alpha$ , который в свою очередь играет важную роль в запуске транскрипционной активности генов (рис. 1.4), кодирующих синтез факторов проангиогенеза, в том числе VEGF (Huang C. et al., 2012; Liehara K.T. et al., 2012).

Блокада гена HIF1 $\alpha$  или нарушение транскрипции HIF1 $\alpha$  ведет к подавлению ангиогенеза и задержке опухолевого роста (Santos M. e al., 2012). Shang Z.J. et al. (2006) в своих работах показал, что секреция VEGF повышена в супернатантах опухоли при раке СОПР. Mohamed K.M. et al. (2004) также продемонстрировали, что экспрессия VEGF и HIF1 $\alpha$  выше в опухолевых клетках по сравнению с нормальными кератиноцитами. Таким образом, VEGF играет ключевую роль в росте опухоли и метастазировании. Однако, роль HIF1 $\alpha$  в качестве регулятора VEGF в опухолевых клетках при раке СОПР плохо понятна (Huang C. et al., 2012).

Huang C. et al. (2012) исследовали HIF1 $\alpha$ -индуцированную экспрессию VEGF и ангиогенез при раке языка. Сверхэкспрессия HIF1 $\alpha$  сопровождалась VEGF сверхэкспрессией и сочеталась с повышением лимфатической плотности сосудов и метастазами в регионарные лимфатические узлы. На основе этих результатов, авторы предположили, что HIF1 $\alpha$  может играть решающую роль в метастазировании опухолевых клеток в региональные лимфоузлы, способствует лимфоангиогенезу и ангиогенезу (Liang X.H. et al., 2011).

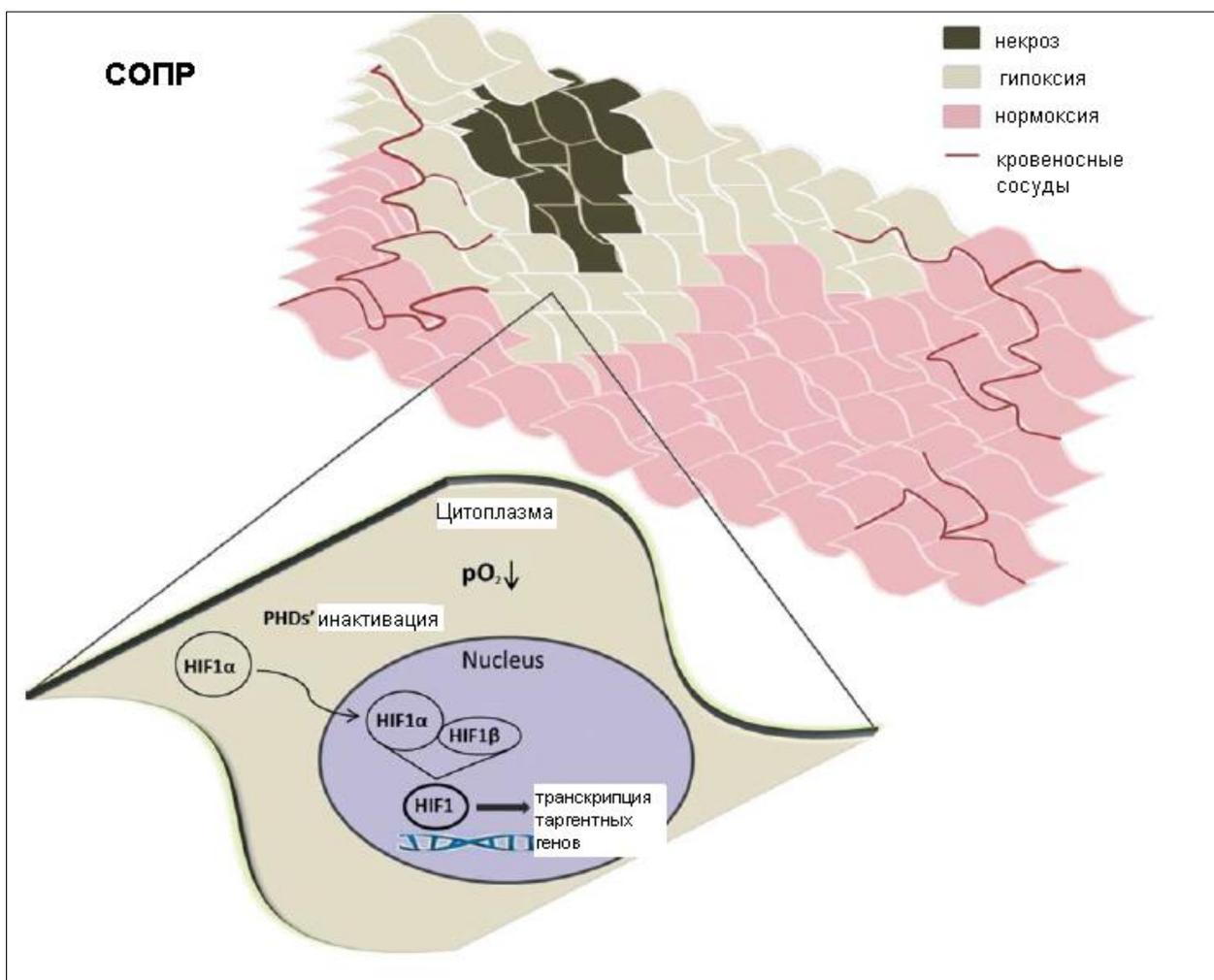


Рис. 1.4. Активация гипоксия-индуцибельного фактора-1α (HIF1α) в зоне гипоксии при раке СОПР. В областях с низким парциальным напряжением кислорода инактивируется фермент пролилгидроксилаза (PHD), что ведет к накоплению HIF1α в цитоплазме клетки. HIF1α перемещается к ядру, где димеризуется с HIF1β в форме HIF1, отвечающий за активацию нескольких генов-мишеней.

Рак СОПР относится к агрессивным опухолям, сопровождающимся обширными зонами некроза, в которых кислотность высокая, а уровень гипоксии выражен значительно (De Lima P.O. et al., 2014). В солидных злокачественных опухолях полости рта в 50-60% наблюдений формируются гипоксические и аноксические зоны (Vock J.M. et al., 2008), что ведет к дисбалансу между потребностями и потреблением кислорода (Brennan P.A. et al., 2005). Если в нормальной СОПР насыщение тканей кислородом соответствует метаболическим требованиям, то в злокачественных новообразованиях потребление кислорода превышает предложение, что ведет к формированию зон с низким уровнем кислорода (Denko N.C., 2008).

Формированию гипоксических зон в опухолевой ткани способствуют также сосудистая сеть с хаотичным расположением сосудов, неравномерный кровоток, структурные и функциональные аномалии опухолевых микрососудов, низкий уровень диффузии кислорода в расширяющейся опухолевой зоне, анемия, часто возникающая при химиотерапии (Jiang J. et al., 2011). Развитие гипоксии в области злокачественных новообразований головы и шеи ассоциировано с худшим прогнозом в отношении общей и безрецидивной выживаемости. Экспозиция клеток в гипоксии ведет к ограничению пролиферации и последующей их гибели вследствие снижения общего синтеза белка. Устойчивая гипоксия может также изменить структуру клеточного цикла, продолжительность фазы покоя клетки (Denko N.C., 2008).

Экспрессия HIF1 $\alpha$  является ранним событием в канцерогенезе в ротовой полости (Eckert A.W. et al., 2012). Выявлено скачкообразное и значительное увеличение экспрессии ядерных HIF1 $\alpha$  при эпителиальной дисплазии СОПР в отличие от нормальной слизистой, а также при раке СОПР (Mohamed K.M. et al., 2004). Табакокурение и хронический прием алкоголя усиливают экспрессию HIF1 $\alpha$  напрямую или косвенно (Ministerio da Saude et al., 2012). Установленный факт подтверждают результаты исследования Lin P.Y. et al. (2008), свидетельствующие о возрастании экспрессии HIF1 $\alpha$  в клетках опухоли СОПР пьющих и курящих по сравнению с непьющими и некурящими.

Экспрессия HIF1 $\alpha$  в ядре опухолевых клеток является биомаркером для прогнозирования прогрессии у больных раком СОПР (Lieberman K.T. et al., 2012). Несколько исследований показали значительную корреляцию между активацией HIF1 $\alpha$  в ядре и плохим прогнозом (Lieberman K.T. et al., 2012). В работе Liang X.H. et al. (2011) сообщается, что экспрессия HIF1 $\alpha$  в клетках сопряжена с размером опухоли, поражением лимфатических узлов, гистологической дифференциацией и плотностью микрососудов. Пациенты с

положительным выявлением маркеров HIF1 $\alpha$  в ядре имели худшие условия для общей и безрецидивной выживаемости.

Kang F.W. et al. (2013) также установили, что сверхэкспрессия HIF1 $\alpha$  напрямую связана с плохими показателями общей и безрецидивной выживаемостью, независимо от T стадии опухоли и лимфатического метастазирования. Авторы, используя регрессионную модель Кокса продемонстрировали, что уровень экспрессии HIF1 $\alpha$  является независимым прогностическим фактором для рака СОПР (Kang F.W. et al., 2013).

Eckert A.W. et al. продемонстрировали, что увеличение экспрессии HIF1 $\alpha$  в отдельности, так и при сочетании с низкой экспрессией CAIX (carbonic anhydrase IX), достоверно коррелирует с неблагоприятным прогнозом рака СОПР (Eckert A.W. et al., 2012). Основываясь на этих результатах, авторы предложили пересмотреть варианты лечения для пациентов с низкодифференцированными и местно-распространенными опухолями и низкой экспрессией HIF1 $\alpha$  и CAIX. Лечение этих пациентов может потребовать полной резекции опухоли и лимфатических узлов, но не потребует адъювантной химиолучевой терапии (Eckert A.W. et al., 2010).

В отличие от вышеуказанных работ, Fillies T. et al. продемонстрировали, что экспрессия HIF1 $\alpha$  соотносилась с улучшенной 5-летней выживаемостью, продолжительностью периода ремиссии (Fillies T. et al., 2005). Аналогично, Santos M. et al. показали корреляцию между сильной экспрессией HIF1 $\alpha$  и выживаемостью пациентов, которые проводят в послеоперационном периоде радиотерапию (Santos M. et al., 2012). Примечательно, что у пациентов раком СОПР, которым проведено только оперативное лечение, корреляции между экспрессией HIF1 $\alpha$  и безрецидивной выживаемости не обнаружено (Santos M. et al., 2012).

Для снижения роста опухолевых образований в последнее время разрабатываются фармакологические механизмы, ингибирующие активность HIF. В таких механизмах относят снижение активности мРНК и угнетение синтеза HIF1 $\alpha$ , усиление деградации HIF1 $\alpha$ , ограничение гетеродимеризации

субъединицы HIF, транскрипционной активности HIF (Semenza G.L. et al., 2013).

В специальном исследовании, посвященном лечению рака слизистой оболочки полости рта, Kang F.W. et al. (2013) сообщили об ингибиторе гистондеацетилазы, трихостатине А (TSA), который ингибирует клеточную пролиферацию и инвазию, блокирует клеточный цикл клеток в фазе G1 при плоскоклеточной карциноме языка линии клеток в пробирке. Трихостатин может быть использован для изменения экспрессии генов путем регулирования количества ацетильных групп у ядерных белков — гистонов, ингибируя гидролитические ферменты гистондеацетилазы и облегчая доступ и проникновение факторов транскрипции к молекулам ДНК внутри хроматина. Одним из противоопухолевым механизмом трихостатина является снижение уровня HIF1 $\alpha$  при одновременной суперэкспрессии VEGF (Kang F.W. et al., 2013).

В другом исследовании Jung J. et al. (2011) были отмечены антипролиферативный, супрессивный в отношении факторов роста и проапоптотический эффекты глюкозамина-гидрохлорида на клетках из плоскоклеточной карциномы полости рта. Лечение этим препаратом выражено ингибирует пролиферацию и вызывает апоптоз опухолевых клеток. Авторы обратили внимание, что при применении глюкозамина-гидрохлорида происходит активация каспазы-3, накопление цитозольного цитохрома С, снижение активности HIF1 $\alpha$  и инактивация активных форм кислорода.

В заключении необходимо отметить, что HIF1 $\alpha$  способствует образованию новых кровеносных сосудов в опухоли посредством изменения синтеза фактора ангиогенеза VEGF. Сверхэкспрессия HIF1 $\alpha$  и VEGF обнаружены в клетках карциномы СОПР, что было сопряжено с повышенной плотностью лимфатических сосудов и наличием метастазов в лимфатических узлах (Fillies T. et al., 2005). Опухоли головы и шеи являются гетерогенными заболеваниями, отличающимися разным биологическим поведением и

ответом на лечение. Дополнительные генетические и молекулярные маркеры прогрессии рака СОПР крайне важны для решения тактических вопросов при реабилитации больных.

Гипоксия, являющаяся одной из наиболее характерных черт злокачественной опухоли, выражено влияет на биологию опухолевой клетки, участвуя, в частности, в опухолевой прогрессии. В последние годы в клетках эукариот идентифицирован клеточный сенсор, реагирующий на гипоксию и гипоксия-индуцибельный фактор, выявлены некоторые эффекторные пути, которые участвуют в регуляции генов в условиях гипоксии. Гипоксия-индуцибельный фактор индуцирует экспрессию ряда генов, и количество индуцируемых гипоксией генов продолжает прогрессивно возрастать. При гипоксии в клетках эукариот отмечается экспрессия генов, вовлеченных в клеточный метаболизм, эритропоэз, клеточную пролиферацию, ангиогенез. Среди критических генов, которые реагируют на гипоксию, обнаружены онкогены, гены, кодирующие факторы роста, транскрипции. Гипоксия-индуцибельный фактор стимулирует различные клеточные сигналы, экспрессию белка p53, индуцирует синтазу оксида азота, резистентность к облучению, лекарственным препаратам, существенно усиливает инвазивные свойства клеток и метастазирование. Хотя дальнейшее подтверждение в экспериментальных моделях роли гипоксия-индуцибельного фактора необходимо, уже полученные факты позволяют предположить, что HIF1 $\alpha$  представлять собой важный неинвазивный путь для прогноза развития метастазирования рака СОПР в лимфатические узлы и является потенциальной мишенью для анти-лимфоангиогенной и анти-ангиогенной терапии у онкологических больных.

### **1.5. Роль HIF- $\alpha$ и васкулоэндотелиального фактора роста VEGF в опухолевом неоангиогенезе и значимость опухолевого ангиогенеза для лимфогенного метастазирования**

Эффективность функционирования любой ткани зависит от регулярного кислородного обеспечения посредством микрососудов. Первично у эмбрионов из предшественников эндотелиальных клеток формируются новые сосуды. Этот процесс получил название васкулогенеза. Ангиогенез – это формирование ранее не существовавших сосудов из готовой системы кровеносных сосудов. Ангиогенез наблюдается при развитии организма, раневом воспалении, репродуктивном цикле, при опухолевых заболеваниях. В последнем случае опухолевый ангиогенез играет одну из ключевых ролей при росте, распространении и метастазировании опухоли. При активации опухолевого ангиогенеза происходит поступление факторов роста в кровь, что имеет диагностическое значение. Факторами роста называются полипептиды с молекулярной массой от 5 до 50 кДа, которые объединены по признаку трофического регуляторного действия и обладают эндокринным, паракринным и аутокринным действием. Спектр биологического действия на клетки у факторов роста широкий и направлен на стимуляцию либо ингибирование митогенеза, осуществление хемотаксиса, дифференцировки (Брусина Е.Б. с соавт., 2011). Продукция факторов роста осуществляется неспециализированными клетками.

Различают четыре стадии неоангиогенеза:

1. Усиление проницаемости эндотелиального слоя и деградация базальной мембраны;
2. Миграция эндотелиоцитов;
3. Пролиферация эндотелиоцитов;
4. Ремоделирование сосудов из миграционных эндотелиоцитов.

Миграция эндотелиальных клеток, прежде всего, происходит в посткапиллярных венулах с формированием в последующем новых сосудов.

Все этапы неангиогенеза регулируются факторами роста, которые продуцируются эндотелиоцитами, тучными клетками и макрофагами. Этап миграции эндотелиальных клеток, в основном, регулируется эндотелиальными молекулами адгезии, - прежде всего, E-селектином. Пролиферация эндотелиальных клеток в норме отсутствует, деление эндотелиоцитов наблюдается раз в 7-10 лет. Ангиогенные факторы роста и цитокины активируют пролиферацию эндотелиоцитов. Причем, интенсивность пролиферации клеток контролируется больше балансом ангиогенных стимуляторов и ингибиторов. При низкой активности стимуляторов по отношению к ингибиторам неангиогенез блокируется.

Вновь образованные сосуды опухоли имеют структурные и функциональные особенности. В сосудах отсутствуют перициты, которые в норме связаны с эндотелием и стабилизируют созревание сосудов. Сосуды в опухоли имеют хаотичную организацию, патологическую извитость, проницаемость сосудов повышена. Выраженность сосудистых аномалий зависит от концентрации в ткани факторов роста. Установленные структурные и функциональные особенности сосудов опухоли благоприятствуют росту опухоли, поэтому в опухолевой ткани стимуляторы неангиогенеза преобладают над ингибиторами. До созревания новых сосудов питательные вещества и кислород поступают к раковым клеткам путем диффузии. Образование новых сосудов дает толчок к росту опухоли и метастазированию. Блок опухолевого роста может произойти за счет подавления стимуляторов неангиогенеза. Такой способ не вызывает эррадикации опухоли, но сдерживает ее рост и распространение. В этом плане анти-VEGF терапия должна быть эффективным воздействием.

К стимуляторам неангиогенеза относят васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), ангиогенин, трансформирующие факторы роста  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) и  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), интерлейкин-8, NO, и неспецифические факторы, -

матриксные металлопротеиназы (MMPs). Самым мощным стимулятором неоангиогенеза является васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF).

Как ингибиторы неоангиогенеза объединяют следующие факторы: эндостатин, растворимые рецепторы VEGF (sVEGFR), ангиостатин (фрагмент плазминогена), тромбоспондин, рестин, вазостатин, ингибиторы MMP (TIMP-1, TIMP-2).

NEW VEGF представляет собой гетеродимерный гликопротеин с молекулярной массой от 34 до 42 кДа. Выделяют несколько изоформ VEGF: VEGF-A: VEGF121, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206, VEGF-B, -C, -D и плацентарный фактор роста PlGF. VEGF165 является преобладающей формой для большинства тканей (Vlahakis N.E. et al., 2005). Для эпителиальных клеток сосудов VEGF является потенциальным митогеном. VEGF вызывает избыточную проницаемость сосудов, нарушая функционирование многих барьеров, - например, гематоэнцефалического. VEGF-A посредством связи с NO-синтетазой способствует вазодилатации и активации, а также миграции моноцитов. Уровень VEGF-A определяется в плазме и сыворотке крови пациентов. Высокий уровень VEGF-A в сыворотке крови сопряжен с плохим прогнозом по выживаемости больных со злокачественными образованиями (Rissanen T.T. et al., 2003).

Блокирующие антитела к VEGF либо к одному из VEGF рецепторов, ингибиторы тирозинкиназы являются основой для создания лекарственных препаратов, направленных на блокаду опухолевого ангиогенеза и метастазирования (Neckman C.A. et al., 2008) . На настоящий момент 110 фармацевтических фирм осуществляют усилия в этом направлении (Whitehurst B. et al., 2007).

VEGF-C и -D обладают ангиогенными и лимфангиогенными свойствами. Два белка VEGF-C и -D, оказывают регуляторное влияние на эндотелиальные клетки лимфатических сосудов через рецептор VEGFR3, действуя как митогены. Экспрессия VEGF-C способствует выживаемости и пролиферации опухолевых клеток. VEGF-D близок по строению и свойствам

к VEGF-C. Часто VEGF-D и VEGF-C объединяют в одно подсемейство VEGF. VEGF-C и -D связываются на поверхности клеток с тирозинкиназным VEGF рецептором 2 (VEGF R2/Flk-1/KDR) и VEGFR3. Эти рецепторы локализованы на васкулярных и лимфатических эндотелиальных клетках и отвечают за ангио- и лимфогенез (Joukov V. et al., 2006).

Рецепторы VEGF (sVEGFR-1, sVEGFR-2) существуют в растворимой форме, возникающей после их протеолитического расщепления и отделения от клеточной поверхности. Эти растворимые рецепторы способны связывать и нейтрализовывать цитокины в циркуляции. Существуют три рецептора для VEGF-A: VEGFR-1 (Flt-1), -2 (KDR) и -3 (Flt-4). Все они содержат семь Ig-подобных повторов во внеклеточных доменах. VEGFR1-R3 в основном экспрессируются в пролиферирующем эндотелии выстилки сосудов и/ или проникающих солидных опухолях (Taipale J. et al., 2009).

В исследованиях Lopez de Cicco R. et al. (2004), Vaupel P., Mayer A. (2007), Margaritescu C. et al. (2010) было установлена повышенная экспрессия VEGF в ткани плоскоклеточных карцином полости рта, что было связано по мнению авторов с метастатическим потенциалом. Гипоксия играет ключевую роль в усилении продукции VEGF посредством стимуляции соответствующих генов HIF- $\alpha$  (Huang C. et al., 2012; Lin KT. et al., 2012). Удаление HIF1 $\alpha$  гена или нарушение транскрипции HIF1 $\alpha$  приводит к отсутствию VEGF секреции клетками опухоли. В результате подавляется ангиогенез и задерживается рост солидных опухолей (Huang C. et al., 2012).

Shang Z.J. et al. (2006) также было доказано, что продукция VEGF клетками плоскоклеточной карциномы СОПР зависит от уровня  $pO_2$  в ткани. Mohamed K.M. et al. (2004) также продемонстрировали, что базовый уровень экспрессии VEGF и HIF1 $\alpha$  были выше в раковых клетках СОПР по сравнению с нормальными кератиноцитами. Изоформы VEGF связаны с различными характеристиками рака СОПР: общей выживаемостью (Smith B.D., 2000), инвазией (Shang Z.J. et al., 2007; Faratzis G. et al., 2009; Naruse T.

et al., 2011), распространенностью (Shang Z.J. et al., 2007) и метастазированием опухоли (Shintani S. et al., 2004; Siriwardena B.S. et al., 2008). В частности, VEGF-C играет ключевую роль в росте опухоли и метастазировании. Однако роль HIF1 $\alpha$  в регуляции VEGF-C до сих пор не установлена. Huang et al. (2012) изучали HIF1 $\alpha$ -индуцированную продукцию VEGF и ангиогенеза у больных раком языка. Сверхэкспрессия HIF1 $\alpha$  коррелировала с гиперэкспрессией, плотностью лимфатических сосудов и количеством метастазов в региональные лимфатические узлы. Опираясь на эти факты, авторы считают, что HIF1 $\alpha$  играет решающую роль в лимфогенном метастазировании с участием VEGF-C (Liang X.H. et al., 2011).

Итак, разработка объективного метода определения злокачественного потенциала к прогрессии рака СОПР на основе использования иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов является актуальной задачей. Накоплен большой объем информации о происходящих при раке СОПР молекулярных изменениях. Однако, в большинстве исследований не отслеживалась динамика изменения маркеров по мере опухолевой прогрессии. Такие исследования могут дать лишь предварительные заключения о прогностическом значении биомаркеров в отношении злокачественной трансформации предраковых изменений в рак СОПР. Значение молекулярно-генетических изменений для оценки риска распространения и метастазирования рака СОПР может быть выявлено при комплексном клинико-генетическом, биохимическом и иммунологическом исследовании. Исследований с таким дизайном проведено гораздо меньше. Рандомизированные контролируемые когортные исследования могут разрешить поставленную проблему.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Дизайн исследования.

Клиническую группу составили 162 больных: 141 больной с первичным резектабельным раком СОПР  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$  и 21 пациент с раком СОПР  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$ . У всех пациентов, включенных в работу, диагноз плоскоклеточного рака СОПР был подтвержден при гистологическом исследовании биопсийного материала. Все пациенты ранее не подвергались специализированному лечению. В зависимости от наличия или отсутствия гнойных осложнений пациенты из клинической группы с раком СОПР  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$  на фоне стандартного химиолучевого и хирургического лечения были разделены на две группы: основная и группа сравнения. Основную группу ( $n=96$ ) составили больные, у которых после химиолучевого лечения и операции развились гнойно-деструктивные осложнения (местные раневые осложнения, некроз мышечного или кожно-жирового лоскута, используемого для пластики, остеомиелит нижней челюсти, флегмона нижней челюсти). У больных группы сравнения ( $n=45$ ) период химиолучевого и послеоперационного этапа лечения протекал без гнойных осложнений. Пациенты с терминальной стадией и распространенным онкологическим процессом ( $T_4N_{1-2}M_{0-1}$ ) в основную группу и группу сравнения не входили, поскольку имели кардинальные отличия прогрессирования основного заболевания, выживаемости пациентов.

Группу здоровых доноров составили 35 пациентов стоматологических отделений общего профиля, обратившихся по поводу установки зубных имплантов.

Логическая структура выделения групп пациентов, входящих в исследование, отражена в таблице 2.1.

Таблица 2.1

**Структура выделения клинических групп пациентов, входящих в исследование**

<b>Тип исследования</b>	<b>Группы</b>	<b>Содержание исследования</b>
Одномоментное исследование	<b>Клиническая группа</b> $T_{1-4} N_{0-2} M_{0-1}$ (n=162)	Исходная характеристика экспрессии факторов транскрипции, неоангиогенеза, апоптоза в различных биологических средах, микробиоты и показателей врожденного иммунитета ротовой полости в зависимости от pTNM
Ретроспективное исследование	<b>Основная группа</b> $T_{1-3} N_{0-2} M_0$ (n=96): гнойные осложнения комбинированного лечения присутствуют <b>Группа сравнения</b> $T_{1-3} N_{0-2} M_0$ (n=45): гнойные осложнения отсутствуют	Выявление патогенетических механизмов связи гнойно-деструктивных осложнений комбинированного лечения рака СОПР и прогрессии заболевания. Разработка методов прогноза течения заболевания и лечения гнойных осложнений
Перспективное исследование	<b>Перспективная группа</b> $T_{2-3} N_{0-1} M_0$ (n=50)	Оценка эффективности разработанной нами системы прогноза прогрессирования заболевания. Оценка эффективности оптимизации лечения.

В клинической группе была определена частота и структура гнойных осложнений в зависимости от стадии рака СОПР по TNM и их связь с прогрессированием основного заболевания (сроками и частотой

возникновения рецидивов и метастазов) в течение двух лет от начала комбинированного первичного специализированного лечения.

Для выявления патогенетических взаимосвязей между развитием гнойных осложнений и прогрессии рака СОПР и определения новых мишеней для разработки методов эффективного противоопухолевого воздействия *в ткани опухоли* больных раком СОПР, *биоптатах гистологически-неизменной* СОПР определяли содержание гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ , его экспрессию и тип окрашивания (цитоплазматический, ядерно-цитоплазматический), активность апоптоза по экспрессии маркеров Вах, пролиферативную активность клеток опухоли по содержанию и экспрессии ядерных транскрипционных факторов NF-kB p50 и NF-kB p65, уровень васкулоэндотелиального фактора роста А (VEGF-A) как маркера активности неоангиогенеза; *в ротовой жидкости* больных раком СОПР до операции - содержание антимикробного белка лактоферрина, провоспалительного медиатора интерлейкина-8, факторов HIF-1 $\alpha$  и VEGF, масс-спектров белков слюны с их идентификацией; *в зубном налете* у пациентов с раком СОПР до операции - качественно-количественные параметры содержания 7 микроорганизмов: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis*, а также качественный анализ масс-спектров зубного налета с идентификацией микроорганизмов.

Обобщение и анализ результатов исследования позволили установить патогенетические взаимосвязи между развитием гнойных осложнений и прогрессией рака СОПР и разработать метод эффективного противоопухолевого воздействия с профилактикой гнойных осложнений.

*Критерии включения* пациентов в клиническую группу:

- плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта,
- отсутствие ранее проводимого специализированного лечения до включения пациентов в исследование

-возраст больных до 75 лет включительно.

*Критерии исключения больных:*

-наличие тяжелой сопутствующей патологии с декомпенсацией дыхательной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной системы,

-наличие злокачественных заболеваний иной локализации,

-больные старше 75 лет.

Для оценки эффективности разработанной нами системы прогноза прогрессирования заболевания, а также анализа эффективности оптимизации лечения была сформирована проспективная группа больных раком СОПР со стадией T<sub>2-3</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub> (n=50). Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

## 2.2. Общая характеристика групп больных

Возраст пациентов клинической группы составлял от 28 до 73 лет. Распределение больных по возрастным периодам отражено в таблице 2.2. Наибольшее число больных было в возрасте от 50 до 59 лет: в основной группе – 38 (39,6%), группе сравнения – 19 (42,2%), клинической группе – 65 (40,1%), среди здоровых доноров – 12 (34,3%) пациентов.

**Таблица 2.2**

### Распределение больных клинических групп в зависимости от возраста

Возраст, годы	Основная группа		Группа сравнения		Клиническая группа		Здоровые доноры	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<30	1	1,0	1	2,2	2	1,2	-	-
30-39	11	11,5	7	15,6	18	11,1	5	14,3
40-49	27	28,1	9	20,0	39	24,1	9	25,7
50-59	38	39,6	19	42,2	65	40,1	12	34,3
60-69	15	15,6	6	13,3	31	19,1	9	25,7
>70	4	4,2	3	6,7	7	4,3	-	-
Всего	96	100,0	45	100,0	162	100,0	35	100,0

В основной группе средний возраст соответствовал – 56,2±2,5 года, группе сравнения – 55,7±3,1 лет, клинической группе – 58,9±2,1 лет и среди здоровых доноров 55,5±2,3 лет (табл.2.3). Межгрупповые различия по возрасту отсутствовали ( $p>0,05$ ).

Таблица 2.3

### Средний возраст больных клинических групп

Группа	M±m	Min-Max
Клиническая группа	58,9±2,1	29-73
Основная группа	56,2±2,5	28-72
Группа сравнения	55,7±3,1	29-73
Здоровые доноры	55,5±2,3	32-67
p	$p_{\text{осн-гр ср}}>0,05$ , $p_{\text{осн-к}}>0,05$ , $p_{\text{гр ср-к}}>0,05$ , $p_{\text{кл-к}}>0,05$	

Примечание: доверительную вероятность p оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Во всех клинических группах число мужчин превышало число женщин (табл. 2.4). Процентное соотношение между мужчинами и женщинами в основной группе составило 69,8% и 30,2%, в группе сравнения 57,8% и 42,2%, клинической группе 66,0% и 34,0%, среди здоровых доноров 60,0% и 40,0%. Превышение числа мужчин над женщинами во всех группах, кроме группы сравнения, было статистически значимым ( $p<0,05$ ).

Таблица 2.4

### Распределение больных клинических групп в зависимости от пола

Пол	Основная группа		Группа сравнения		Клиническая группа		Здоровые доноры	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Мужчины	67	69,8	26	57,8	107	66,0	21	60,0
Женщины	29	30,2	19	42,2	55	34,0	14	40,0
$p_{\text{м-ж}}$	<0,05		>0,05		<0,05		<0,05	
Всего	96	100,0	45	100,0	162	100,0	35	100,0

Примечание: доверительную вероятность p оценивали с помощью критерия Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

Распределение больных клинических групп в зависимости от локализации рака СОПР представлено в таблице 2.5.

Таблица 2.5

**Распределение больных клинических групп в зависимости от локализации рака СОПР**

Локализация	Основная группа		Группа сравнения		Клиническая группа		p
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Корень языка	3	3,1	1	2,2	5	3,1	>0,05
Подвижная часть языка	21	21,9	10	22,2	32	19,8	>0,05
Дно ротовой полости	49	51,0	23	51,1	83	51,2	>0,05
Щека	5	5,2	2	4,4	8	4,9	>0,05
Альвеолярный отросток нижней челюсти	12	12,5	7	15,6	25	15,4	>0,05
Альвеолярный отросток верхней челюсти	5	5,2	2	4,4	8	4,9	>0,05
Небные дужки	1	1,0	-	-	1	0,6	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	162	100,0	

Примечание: доверительную вероятность p оценивали с помощью критерия Пирсона

У больных основной группы и группы сравнения опухоль располагалась в области дна ротовой полости (51,0% и 51,1%), подвижной части языка (21,9% и 22,2%) и слизистой оболочки альвеолярного отростка нижней челюсти (12,5% и 15,6%, соответственно). Различия по локализации рака СОПР у больных основной группы и группы сравнения отсутствовали ( $p > 0,05$ ).

Среди пациентов клинической группы наибольшее число больных (42,6%) имело размер первичной опухоли более 4 см (T3) (табл. 2.6). На втором месте по частоте были опухоли от 2 до 4 см в наибольшем измерении (34%) (T2). Распространенные опухоли (T4) встречались в 13% и небольшие поражения до 2 см (T1) – в 10,5% (табл. 2.6).

Таблица 2.6

**Распределение больных клинической группы в зависимости от размера опухоли**

Размер опухоли	Абсолютное число	%
T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	17	10,5
T <sub>2</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>	55	34,0
T <sub>3</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>	69	42,6
T <sub>4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0-1</sub>	21	13,0
Всего	162	100,0

Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от размера опухоли не имело достоверных различий ( $p < 0,05$ ) (таблица 2.7).

Таблица 2.7

**Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от размера опухоли**

Размер опухоли	Основная группа		Группа сравнения		p
	Абс.	%	Абс.	%	
T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	11	11,5	6	13,3	>0,05
T <sub>2</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>	37	38,5	18	40,0	>0,05
T <sub>3</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>	48	50,0	21	46,7	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	

Распределение больных клинической группы в зависимости от классификации рака СОПР по TNM представлено в таблице 2.8. Чаще всего встречалась стадия болезни T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> (21,6%) и T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> (21,0%). В основной группе и группе сравнения достоверных отличий в зависимости от стадии рака СОПР по TNM не отмечалось ( $p > 0,05$ ) (табл. 2.9).

Таблица 2.8

**Распределение больных клинической группы в зависимости от стадии рака СОПР по TNM**

Стадия по TNM	Абсолютное число	%
T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	17	10,5
T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	35	21,6
T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	14	8,6
T <sub>2</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	6	3,7
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	19	11,7
T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	34	21,0
T <sub>3</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	16	9,9
T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	9	5,6
T <sub>4</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>1</sub>	7	4,3
T <sub>4</sub> N <sub>2c</sub> M <sub>1</sub>	5	3,1
Всего	162	100,0

Таблица 2.9

**Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от стадии рака СОПР по TNM**

Стадия по TNM	Основная группа		Группа сравнения		p
	Абс.	%	Абс.	%	
T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	11	11,5	6	13,3	>0,05
T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	24	25,0	11	24,4	>0,05
T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	9	9,4	5	11,1	>0,05
T <sub>2</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	4	4,2	2	4,4	>0,05
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	13	15,5	6	13,3	>0,05
T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	25	26,0	9	20,0	>0,05
T <sub>3</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	10	10,4	6	13,3	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	

В клинической группе III стадия болезни (41,4%) больных имела место чаще других стадий. I стадия рака СОПР была выявлена в 10,5%, II стадия в 21,6% и IV стадия в 26,5% (табл. 2.10). Та же тенденция распределения прослеживалась в основной группе и группе сравнения (табл. 2.11). Межгрупповые различия отсутствовали ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2.10**

**Распределение больных клинической группы в зависимости от стадии заболевания**

Стадия заболевания	Абсолютное число	%
I	17	10,5
II	35	21,6
III	67	41,4
IV	43	26,5
Всего	162	100,0

**Таблица 2.11**

**Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от стадии заболевания**

Стадия заболевания	Основная группа		Группа сравнения		p
	Абс.	%	Абс.	%	
I	11	11,5	6	13,3	>0,05
II	24	25,0	11	24,4	>0,05
III	47	49,0	20	44,4	>0,05
IV	14	14,5	8	17,9	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	

Региональное метастазирование в лимфатические узлы у больных клинической группы наблюдалось у 91 (56,2%) пациентов, а у 71 (43,8%) больного отсутствовало. При этом метастазы в одном лимфоузле на стороне поражения до 3 см и менее в наибольшем измерении (статус N<sub>1</sub>) отмечались у 57 (35,2%) больных, метастазы в одном лимфоузле на стороне поражения до 6 см в наибольшем измерении (N<sub>2a</sub>) имели место у 22 (13,6%), метастазы в нескольких лимфоузлах на стороне поражения до 6 см в наибольшем измерении (N<sub>2b</sub>) у 7 (4,3%) и метастазы в лимфоузлы с обеих сторон или с противоположной стороны до 6 см в наибольшем измерении (N<sub>2c</sub>) у 5 (3,1%) пациентов (табл. 2.12).

Таблица 2.12

**Распределение больных клинической группы в зависимости от исходного статуса по регионарному метастазированию в лимфатические узлы**

Регионарное метастазирование	Абсолютное число	%
T <sub>1-3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	71	43,8
T <sub>2-4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	57	35,2
T <sub>2-3</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	22	13,6
T <sub>4</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>1</sub>	7	4,3
T <sub>4</sub> N <sub>2c</sub> M <sub>1</sub>	5	3,1
Всего	162	100,0

У больных основной группы (50%) и группы сравнения (51,1%) в половине случаев регионарное метастазирование в лимфатические узлы отсутствовало, статус N<sub>1</sub> наблюдался в 35,4% и 31,1%, а статус N<sub>2a</sub> в 14,6% и 17,8%, соответственно (табл. 2.13).

Таблица 2.13

**Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от исходного статуса по регионарному метастазированию в лимфатические узлы**

Регионарное метастазирование	Основная группа		Группа сравнения		p
	Абс.	%	Абс.	%	
T <sub>1-3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	48	50,0	23	51,1	>0,05
T <sub>2-3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	34	35,4	14	31,1	>0,05
T <sub>2-3</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	14	14,6	8	17,8	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	

Отдаленное метастазирование в клинической группе отмечалось редко – в 7,4% (n=12) (табл. 2.14). В основную группу и группу сравнения пациенты с отдаленным метастазированием не включались.

Таблица 2.14

**Распределение больных клинической группы в зависимости от исходного статуса по отдаленному метастазированию**

Отдаленное метастазирование	Абсолютное число	%
T <sub>1-3</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>	150	92,6
T <sub>4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>1</sub>	12	7,4
Всего	162	100,0

Низкая, умеренная и высокая степени дифференцировки рака в клинической группе наблюдались в 11,7%, 59,3% и 29% (табл. 2.15). В основной группе и группе сравнения умеренная степень дифференцировки встречались в 60,4% и 57,8%, соответственно, и преобладали по частоте (табл. 2.16).

Таблица 2.15

**Распределение больных клинической группы в зависимости от степени дифференцировки рака СОПР**

Степень дифференцировки	Абсолютное число	%
Низкая (G3)	19	11,7
Умеренная (G2)	96	59,3
Высокая (G1)	47	29,0
Всего	162	100,0

Таблица 2.16

**Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от степени дифференцировки рака СОПР**

Степень дифференцировки	Основная группа		Группа сравнения		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Низкая (G3)	7	7,3	3	6,7	>0,05
Умеренная (G2)	58	60,4	26	57,8	>0,05
Высокая (G1)	31	32,3	16	35,6	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	

Структура и частота факторов риска у больных клинических групп представлена в таблице 2.17.

Таблица 2.17

## Структура и частота факторов риска у больных клинических групп

Фактор риска	Основная группа		Группа сравнения		Здоровые доноры		р осн-гр срав
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Профессиональные вредности длительностью до 10 лет	5	5,2	2	4,4	-	-	>0,05
Профессиональные вредности длительностью более 10 лет	6	6,3	4	8,9	-	-	>0,05
Курение	22	22,9*	9	20,0*	4	11,4	>0,05
Злоупотребление алкоголем	19	19,8*	8	17,8*	1	2,9	>0,05
Привычка к употреблению горячей пищи	10	10,4	6	13,3	3	8,6	>0,05
Несоблюдение правил гигиены полости рта	6	6,3	3	6,7	3	8,6	>0,05
Множественная механическая травма слизистой оболочки зубами, протезами	15	15,6	7	15,5	6	17,1	>0,05
Отягощенная наследственность	7	7,3	4	8,9	-	-	>0,05
Сопутствующие заболевания, сопровождающиеся иммунодефицитом	1	1,0	-	-	-	-	>0,05
Сахарный диабет	3	3,1	2	4,4	2	5,7	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	35	100,0	

Примечание: \* - достоверные отличия по сравнению со здоровыми донорами при  $p < 0,05$ .

В основной группе (11,5%) и группе сравнения (13,3%) больные отмечали профессиональные вредности: наличие силикатной и сажевой пыли, контакт с пестицидами, гербицидами, химическими удобрениями. Среди них чуть больше по частоте наблюдалось длительное воздействие профессиональных вредностей (более 10 лет). Злоупотребление алкоголем и курение чаще имело место у больных основной группы и группы сравнения в

отличие от здоровых доноров. Многократная механическая травма слизистой оболочки зубами, протезами одинаково часто встречалось во всех группах. Отягощенная наследственность наблюдалась в основной группе в 7,3% и в группе сравнения в 8,9%.

Все пациенты клинической группы получали комбинированное лечение, включающее неoadьювантную химиолучевую терапию и последующее хирургическое удаление опухоли. При проведении химиотерапии использовали комбинацию препаратов цисплатина (или карбоплатина) и 5-фторурацила по стандартным схемам. Дистанционную гамма-терапию осуществляли по методу расщепленного курса лучевой терапии в режиме традиционного фракционирования дозы (5 фракций в неделю по 2 Гр ежедневно до суммарной очаговой дозы 90 Гр). При хирургическом лечении проводились расширенно-комбинированные операции с одномоментной одно- или двусторонней шейной лимфодиссекцией. Объем фасциально-футлярного иссечения шейной клетчатки соответствовал уровню регионарных метастазов. Пластику послеоперационного дефекта осуществляли кожным лоскутом, кожно-мышечным лоскутом, кожно-мышечно-костным лоскутом на питающей ножке, реваскуляризированным костным трансплантатом. Выбор варианта пластического замещения дефекта тканей после удаления первичного очага и регионарных метастазов зависел от локализации дефекта и его распространенности. После выписки больных по месту жительства проводили адьювантную химиотерапию.

Длительность хирургического вмешательства в основной группе составила  $185 \pm 23$  мин, а в группе сравнения -  $189 \pm 28$  мин. Интраоперационная кровопотеря в основной группе соответствовала  $230 \pm 56$  мл, а в группе сравнения -  $280 \pm 49$  мл.

Итак, основная группа и группа сравнения были сопоставимы по возрасту, полу, стадии и распространенности опухолевого процесса, факторам риска, схеме лечения и послеоперационного ведения.

### 2.3. Методы исследования

Методы исследования больных включали стандартные общеклинические обследования. Дополнительные научные методы исследования, используемые в работе, базировались на исследовании ротовой жидкости, зубного налета, биоптатов ткани.

**Метод ПЦР в режиме реального времени для качественно-количественного определения микробов в зубном налете с помощью панели «Дентоскрин».**

Панель «Дентоскрин» (ООО НПФ «Литех» Россия) позволяет качественно и количественно определить соотношение анаэробных бактерий *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis* методом ПЦР в режиме реального времени.

Зубной налет снимали универсальным зондом. Кончик зонда с забранным материалом помещали в пробирку «ДНК-ЭКСПРЕСС» и делали около 10 вращательных движений зондом. После этого зонд удаляли и закрывали пробирку. В пробирке предварительно находился реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС», не требующий предварительной обработки. Доставка проб в лабораторию осуществлялась в термоконтейнере со льдом в течение 12 часов.

Процесс выделения ДНК после доставки проб в лабораторию проходил в несколько этапов:

1. Перемешивание анализируемого материала с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС» в течение 10 сек.
2. Прогревание пробирок в твердотельном термостате в течение 20 мин при 98°C.
3. Отделение супернатанта, содержащего ДНК, путем центрифугирования в течение 20-30 сек при 8000-14000 об/мин.

Далее путем ПЦР при использовании амплификатора CFX 96 (БиоРад, США) проводили качественно-количественный анализ микробов.

### **Метод масс-спектрометрии MALDI-ToF-MS для качественного определения микробов в зубном налете**

У пациентов зубной налет собирали зондом и помещали во флакон для масс-спектрометрического исследования. Далее стерильным шприцем в асептических условиях отбирали две аликвоты по 1 мл и переносили их в пробирки типа эппендорф. Отобранные образцы центрифугировали в течение 2 минут при 10000 об.мин. Супернатант удаляли аспиратором, осадок ресуспендировали в 500 мкл деионизованной воды, и оба образца каждой пробы концентрировались в одном эппендорфе. Суспензию снова центрифугировали при тех же параметрах. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 0,1% растворе додецилсульфата натрия (SDS) для лучшего разрушения клеточных стенок. Образец центрифугировали, полученный осадок дважды отмывали деионизованной водой. Затем белки экстрагировали из осадка 70% этанолом, суспензию вновь центрифугировали. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 50 мкл 70% муравьиной кислоты и инкубировали 3 мин. Затем в суспензию добавляли 50 мкл ацетонитрила и вновь центрифугировали. 1 мкл супернатанта наносили на мишень масс-спектрометра. После высыхания образца на него наслаивали 1 мкл матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота). Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов в зубном налете производилась на масс-спектрометре MicroFlex (Bruker, Германия). Каждый образец тестировали в 4-х повторах. Снятие спектров проводилось в автоматическом режиме. Режим детекции стандартный – MBT-FC. Диапазон спектра от 2-20 kDa. С каждого образца получали 240 спектров. Идентификация производилась с помощью базы данных Biotyper 3 (Bruker, Германия).

## **Метод масс-спектрометрии MALDI-ToF для оценки белкового спектра ротовой жидкости**

Ротовую жидкость (смешанную слюну) собирали утром с 8 до 9 утра после 15-минутного отдыха. Чистку зубов осуществляли накануне вечером. Утром пациенты не принимали пищу и не пили воду. Слюну в течение 5 мин собирали в бумажный стаканчик путем спонтанного стекания с языка, без сплевывания. Во время сбора слюны пациенты молчали. Из стаканчика забирали 6 мл слюны и помещали в центрифужную трубку. Трубку помещали на лед для достижения температуры биожидкости 4°C. Затем центрифугировали при 9000 об/мин в течение 7 мин. При этом удалялись нерастворимые вещества, клетки. Далее к супернатанту были добавлены 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1 мМ фенилметилсульфонилфлуорида для ингибирования активности протеаз. Концентрацию белка определяли методом Лоури на биохимическом анализаторе. Супернатанты хранили при температуре -80°C до проведения масс-спектрометрии. Перед анализом 5 мкл альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (0,4 г/л) растворяли в 100% ацетоне и 100% этаноле, добавляли 0,8-1,2 мкл элюата слюны и смешивали. Далее, 0,8-1,2 мкл этой смеси наносили на металлическую пластину-мишень и сушили при комнатной температуре, затем исследовали образцы. На подложке масс-спектрометра смешивали биоматериал и специальную матрицу (2',5'-дигидроксибензойная кислота), раствор которой устойчив к свету. Образец помещали в прибор масс-спектрометр MALDI-TOF-TOF-MS (прибор Ultraflex II, Bruker, США) и подвергали воздействию наносекундных лазерных импульсов (400 выстрелов лазерной энергии). При этом молекулы матрицы и белков переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время

пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Полученный спектр представляет собой набор пиков, отражающих наиболее представленные белки в организме и является уникальным для данного организма, как отпечатки пальцев. С каждого образца происходило накопление по 50 спектров.

Автоматизированный анализ MALDI-TOF-TOF-MS с идентификацией специфических белков слюны пациентов проводился с помощью полной интегрированной системы компьютерных программ, включающих flexControl/BioTools 2.1.<sup>TM</sup>/ MASCOT<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics, США).

Молекулярный профиль слюны составляли выявленные белки-маркеры с указанием Mr белков (Да). Условием включения белка-маркера в диагностический профиль являлся показатель «покрытия сиквенса» при анализе масс-спектрограмм, который составил более 15%. Учитывался показатель «ожидаемой интенсивности пептидного фингерпринта» («Expect») для каждого обнаруженного белка в поисковой системе Mascot Search (Великобритания). Чувствительность MALDI-TOF-TOF-MS метода обнаружения белков в слюне составляет 1 нг/мл.

### **Определение VEGF-A и HIF-1 $\alpha$ в ротовой жидкости**

Для исследования биомаркеров производили забор свободной нестимулированной слюны в утренние часы до приема пищи после прополаскивания полости рта кипяченой водой.

Содержание VEGF в ротовой жидкости определяли двухэтапным иммуноферментным методом с помощью тест-систем на основе поликлональных антител к VEGF и конъюгатов этих антител с пероксидазой хрена с последующим измерением на фотометре «Multiscan-P 2» (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия) при длине волны 492 нм с расчетом концентрации ангиогенного фактора по калибровочной кривой (рис.2.1).

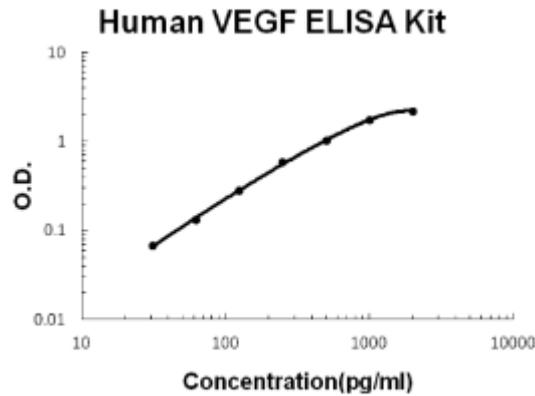


Рис. 2.1. Калибровочная кривая для определения концентрации VEGF в ротовой жидкости

Содержание HIF-1 $\alpha$  в ротовой жидкости определяли методом ИФА аналогично предыдущему способу с помощью тест-систем ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 $\alpha$ ) (Cloud-Clone Corp.) при длине волны на фотометре 450 нм с использованием соответствующей калибровочной кривой (рис.2.2).

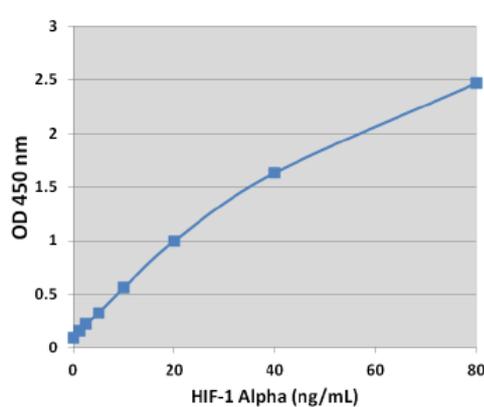


Рис. 2.2. Калибровочная кривая для определения концентрации HIF-1 $\alpha$  в ротовой жидкости

### **Определение содержания интерлейкина-8 и лактоферрина в ротовой жидкости методом ИФА.**

Количественное определение интерлейкина-8, интерлейкина-18 и лактоферрина в ротовой жидкости проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов «Интерлейкин-8» (ООО «Цитокин» Россия), «Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест» Россия), «Лактоферрин-стрип» ЗАО «Вектор-Бест» Россия) с учетом инструкции.

## **Определение факторов HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65, VEGFA методом ИФА в супернатантах опухолевой и гистологически неизменной ткани**

Материалом исследования явились образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани, находящиеся на расстоянии более 2 см от границы опухолей, которые были получены при выполнении радикального оперативного вмешательства. Весь материал подвергался морфологическому исследованию и был гистологически верифицирован. Образцы тканей замораживались и хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Уровень продукции транскрипционных факторов HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65, VEGFA в ядерных экстрактах определяли с использованием наборов для твердофазного ИФА на ИФА-анализаторе «Anthos 2020». Для этого из операционного материала в течение 2-3 часов после операции выделяли образцы опухолевой ткани, очищали от участков некроза, кровоизлияний и помещали в жидкий азот. Образцы тканей до определения активности ферментов хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и размораживали однократно для осуществления количественного анализа.

Перед определением активности исследуемых ферментов замороженную опухолевую ткань гомогенизировали до порошкообразного состояния в жидком азоте. Приготовление ядерных экстрактов для определения HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65 проводили в соответствии с рекомендациями фирмы производителя Caymanchem (США). Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали. Гомогенат центрифугировали при  $4^{\circ}\text{C}$  температуре при оборотах 2400 g для получения осадка, который ресуспендировали в 50 мкл 50 mM Трис-НСl буфера (pH 7,5) и затем центрифугировали при оборотах 14000 g и  $4^{\circ}\text{C}$ . Полученный супернатант использовали для определения количественного содержания транскрипционных факторов методом ИФА с помощью тест-систем ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 $\alpha$ ) (Cloud-Clone

Corp.), Human VEGF ELISA Kit (BioVision, Incorp.), ELISA-based Trans AMTM NF $\kappa$ B/p65 protein assay (Active Motif, Carlsbad, CA, USA), ELISA-based Trans AMTM NF $\kappa$ B/p50 protein assay (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Результаты определения содержания транскрипционных факторов в тканевом супернатанте выражали в условных единицах на мг белка в лунке.

### **Определение тканевой экспрессии HIF-1 $\alpha$ и маркера апоптоза *bax* методом иммуногистохимического исследования**

Экспрессия HIF-1 $\alpha$  в ткани СОПР оценивалась с помощью иммуногистохимического метода. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Для иммуногистохимического исследования готовились срезы ткани из парафиновых блоков толщиной 3-5 мк, которые фиксировали в 4% забуференном формалине, депарафинизировали в ксилоле и регидратировали по стандартной методике. Для иммуногистохимического выявления белка HIF-1 $\alpha$  был применен иммунопероксидазный метод (EnVision/HRP, «Dako Cytomation», Denmark).

Использовали методику демаскирования антигенных детерминант путем нагревания срезов в цитратном буфере (0,1 М; pH 6,0). Препараты охлаждали в течение 20 мин и промывали в 0,1 М растворе PBS. Эндогенную пероксидазу блокировали 0,03% раствором перекиси водорода в течение 20 мин с последующим промыванием в буферном растворе. Затем инкубировали с нормальной кроличьей сывороткой («Dako Cytomation», Denmark). В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела (МкАТ) против HIF-1 $\alpha$  (H1-alpha-67-sup, Abcam, UK) в разведении 1 : 800. Образцы инкубировали в течение ночи при 4 $^{\circ}$ C. Затем на препараты наносили второй слой, содержащий антимышине кроличьи антитела и пероксидазу хрена, связанные с гидрофильной молекулой декстрана (EnVision). После инкубации с первичными и вторичными МкАТ срезы промывали в 0,1 М PBS. В качестве хромогена использовали 3,3'-

диаминобензидин (ДАБ). Позитивным контролем служили МкАТ против цитокератинов (Anti-Human Cytokeratin, Clone MNF116, «Dako Cytomatin», Denmark), в негативном контроле первичные МкАТ не наносили. Ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ . Подсчитывали количество HIF-1-позитивных клеток на 1000 клеток. В исследовании применяли следующие критерии оценки маркеров. Опухоль считали отрицательной по маркеру, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реакция с антителами или количество окрашенных клеток было менее 10%. Реакция окрашивания оценивалась в 1 балл (слабо выраженная экспрессия), если число клеток было 10-25%, 2 балла (умеренно выраженная экспрессия) – при окрашивании 25-50%, 3 балла (сильно выраженная экспрессия) – более 50%.

Реакция выполнялась укомплектованным набором реактивов фирмы «Dako» (Дания) и «Новокастра» (Великобритания).

При оценке экспрессии маркера апоптоза *bax* путем ИГХ исследования использовали кроличьи поликлональные антитела к *bax* (разведение 1:500, «DAKO Corp.»). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 12 часов при 4 °С. Для визуализации реакции антиген-антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit «DAKO Corp.», согласно инструкции. В качестве хромогена использовали ДАБ+ «DAKO Corp.». Реакцию оценивали с применением светового микроскопа ( $\times 40$ ) по следующим критериям. Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. В качестве негативного контроля использовали иммуногистохимическую реакцию без добавления первичных антител. Для оценки экспрессии маркера применяли

следующие критерии: опухоль считали негативной по Вах, если в её ткани отсутствовала цитоплазматическая реактивность с антителами или количество окрашенных клеток было  $<25\%$  и позитивной по Вах, если имелась цитоплазматическая реактивность с антителами  $> 25\%$  клеток опухоли.

#### **2.4. Методы статистической обработки результатов исследования**

На начальном этапе формировали выборки больных раком СОПР. Далее было проверено распределение изучаемых показателей в группах на соответствие нормальному распределению. При этом использовали модуль Частотный анализ в программе STATISTICA 10.0, который позволяет вычислить сразу три статистических критерия проверки распределения: Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса (Lilliefors) и Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's). Если доверительная вероятность критерия значима ( $p \leq 0,05$ ), то гипотеза о том, что соответствующее распределение нормально, отвергалось.

Информация о проверке на нормальность распределения показателей в изучаемых группах использовалась в дальнейшем при основании выбора статистического критерия.

В работе исследованные величины были представлены в виде выборочного среднего значения, стандартной ошибки средней величины, стандартного отклонения, медианы, межквартильного диапазона.

При сравнении дискретных переменных (качественных показателей) использовался критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Мантеля-Хэнзеля на правдоподобие (M-L Chi-square), коэффициент контингенции. Коэффициент контингенции равен коэффициенту корреляции между X и Y и служит для измерения силы связи показателей, измеренных в номинальной шкале.

Достоверность различий средних величин независимых выборок (то есть между группами) оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента в случае нормального закона распределения и

непараметрического критерия Манна-Уитни при отличии распределения показателей от нормального. Критерии Стьюдента и Манна-Уитни предназначены для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо признака, количественно измеренного. Данные методы оценки достоверности различия средних чаще всего используются в научных исследованиях и при соблюдении условий не имеют противопоказаний к применению (Кобзарь А. И., 2006).

При проверке статистических гипотез относительно различия средних в одной и той же группе до и после лечения использовали t-критерий Стьюдента для зависимых выборок при нормальном распределении или критерий Вилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test) при отличии от нормального распределения.

При оценке различий средних величин в трех группах и более использовали дисперсионный анализ с вычислением критерия Фишера F при нормальном распределении и критерия Крускала-Уоллиса при отличии от нормального распределения с оценкой доверительной вероятности критериев.

Оценку взаимосвязей между различными показателями осуществляли с помощью корреляционного анализа, который позволяет обнаружить зависимость между несколькими случайными величинами. Корреляционный анализ служил для анализа связи между явлениями, если одно из них входит в число причин, определяющих другое или, если имелись общие причины, воздействующие на эти явления. Коэффициент корреляции Пирсона для оценки направления и тесноты связи между величинами рассчитывали при выполнении следующих условий:

1. Единицы величин имели одинаковую размерность и методологию расчета.
2. Факторный и результирующий признаки были выражены количественно.

3. Числовые характеристики были случайным образом выбраны из генеральной совокупности
4. Изучаемые явления были независимыми друг от друга
5. Совокупность исходных данных подчинялась нормальному закону распределения.

Коэффициент корреляции Пирсона характеризовал тесноту и направление связи между двумя коррелируемыми признаками. Статистическую значимость коэффициента корреляции Пирсона проверяли по t-критерию Стьюдента и его достигаемому уровню значимости  $p$ . Если достигаемый уровень значимости был больше критического  $p > 0,05$ , то принимали нулевую гипотезу об отсутствии статистической значимости коэффициента корреляции. Если достигаемый уровень значимости был равен или меньше критического  $p \leq 0,05$ , то нулевая гипотеза отвергалась в пользу конкурирующей гипотезы и делалось заключение о статистической значимости коэффициента корреляции. Данная методика заменяет метод сравнения эмпирического и теоретического значений коэффициентов корреляции при принятии той или иной из статистических гипотез.

Если вышеперечисленные условия для расчета коэффициента корреляции не выполнялись, то использовали метод расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Основными условиями применения коэффициента ранговой корреляции были: переменные, измеренные в количественной (ранговой, метрической) шкале на одной и той же выборке объектов; связь между переменными являлась монотонной. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена позволял оценить тесноту связи между количественным и порядковым качественным признаком. Ранжирование или процедуру упорядочения объектов изучения проводили по методу возрастания (убывания), а также путем использования связанных рангов.

Наиболее распространенным показателем оценки риска является относительный риск, или соотношение рисков (Risk Ratio). Относительный риск определяется как отношение абсолютного риска наступления события в

основной группе к риску наступления события в контрольной группе. Для удобства расчета перед определением показателей относительного риска составляют таблицу сопряженности (табл.2.18), в которой отражаются все возможные исходы исследования. Например, является ли курение фактором риска рака СОПР.

**Таблица 2.18**

**Таблица сопряженности для расчета относительного риска**

Состояние	Группа	
	Группа 1: больные раком СОПР	Группа 2: Здоровые люди
Курит	A	B
Не курит	C	D
Итого	G (A+C)	H (B+D)

Примечание: A,C,B,D – абсолютное число больных в подкатегории

После построения таблицы сопряженности рассчитывали показатели риска.

Формула расчета абсолютного риска события (курение) в группе 1:  $AP1=A/G$ .

Формула расчета абсолютного риска события (курение) в группе 2:  
 $AP2=B/H$ .

Формула расчета относительного риска  $OR=AP1/AP2$  или  $OR= A \cdot H / G \cdot B$ .

Формула расчета положительной прогностической значимости фактора в отношении развития события (PPV) -  $PPV=A/(A+B)$ .

Формула расчета  $NNT=1/( AP1+ AP2)$ .

После расчета показателя относительного риска, становилось возможным определить влияние фактора риска на событие. Если  $OR=1$ , то фактор риска не влияет на наступление исхода. Если  $OR<1$ , то риск наступления исхода низкий. Если  $OR<0,5$ , то фактор можно отнести к протективным. Если  $OR>1$ , то риск события в основной группе выше по сравнению с контрольной. Факторы с относительным риском более «1,5», можно назвать именно факторами риска, утяжеляющими течение патологии. Расчет относительного риска в работе проводился с помощью программы

MedCalc 9.3.5.0. При этом рассчитывался доверительный интервал ОР – это интервал, в пределах которого варьирует величина ОР фактора в генеральной совокупности с заданной доверительной вероятностью (0,95). Рассчитываемый достигнутый уровень значимости  $p$  для каждого фактора свидетельствует о том, статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) или незначимо ( $p > 0,05$ ) ОР фактора отличается от 1.

Оценку диагностической эффективности скрининговых тестов проводили с помощью ROC – анализа. Величину чувствительности, специфичности диагностических тестов определяли на основании составленной матрицы решения (табл.2.19) и соответствующих формул.

**Таблица 2.19**

**Макет матрицы решения для определения диагностической чувствительности и специфичности**

Болезнь	Исход теста	
	Положительный	Отрицательный
Есть	a	b
Нет	c	d

Диагностическую чувствительность теста (sensitivity) – вероятность выявления болезни при положительном результате теста, определяли как  $Se = a / (a + b) * 100\%$ . Специфичность (specificity) – вероятность отрицательного теста у здоровых лиц, рассчитывали по формуле  $Sp = d / (d + c) * 100\%$ .

Исходя из значений чувствительности и специфичности, нами было использовано построение характеристической кривой (ROC-кривая или Receiver Operator Characteristic curve) с помощью ROC анализа (использован модуль программы MedCalc 9.3.5.0). ROC-кривая показывает зависимость количества верно диагностированных положительных случаев от количества неверно диагностированных положительных случаев. В терминологии ROC-анализа первые называются истинно положительным, вторые – ложно

отрицательным множеством (Страус Ш.Е. с соавт., 2010).

ROC-кривая получается следующим образом. Для каждого значения порога отсечения, которое меняется от 0 до 1 с шагом 0,01 рассчитываются значения чувствительности  $Se$  и специфичности  $Sp$ . Строится график зависимости: по оси  $Y$  откладывается чувствительность  $Se$ , по оси  $X$  –  $100\% - Sp$  (доля ложно положительных случаев). Для идеального классификатора график ROC-кривой проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных случаев составляет 100% или 1.0 (идеальная чувствительность), а доля ложно положительных примеров равна нулю. Поэтому чем ближе кривая к верхнему левому углу, тем выше предсказательная способность фактора или теста. Наоборот, чем меньше изгиб кривой и чем ближе она расположена к диагональной прямой, тем менее эффективен тест или исследование. Диагональная линия соответствует "бесполезному" классификатору, т.е. полной неразличимости двух классов (Власов В.В., 2003).

Ключевым моментом ROC анализа являлось нахождение дифференциальной точки разделения или порога отсечения, или точки cut-off. Порог отсечения нужен для того, чтобы применять тест на практике: относить новые примеры к одному из двух классов в зависимости от соотношения величины показателя с точкой cut-off. Порог отсечения соответствует максимальной диагностической чувствительности и специфичности метода (Котельников Г.П. с соавт., 2000).

Кроме того, с помощью анализа ROC – кривых проводили оценку диагностической эффективности тестов путем определения площади под ROC – кривой (AUC или Area Under Curve). Площадь под ROC-кривой – полезный обобщенный показатель качества диагностического теста, рассчитывается автоматически методом трапеций. Чем больше значение AUC, тем «лучше» способность диагностического теста распознавать наличие и отсутствие болезни. Кроме того, данный показатель удобно

использовать для сравнительного анализа нескольких методов диагностики (Гринхальх Т., 2009).

В зависимости от величины AUC оценивали способность теста распознавать наличие или отсутствие определенного состояния (табл. 2.20).

**Таблица 2.20**

**Интерпретация величины AUC (Гринхальх Т., 2009)**

Интервал <i>AUC</i>	Способность диагностического теста распознавать наличие или состояния
1,0 – 0,9	Отличная
0,8 – 0,9	Хорошая
0,7 – 0,8	Удовлетворительная
0,6 – 0,7	Посредственная
0,5 – 0,6	Неудовлетворительная
< 0,5	Абсурдная («вредная»)

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

**ГЛАВА 3**

**ЧАСТОТА И СТРУКТУРА ГНОЙНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ,  
ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ОСНОВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ  
РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА**

У больных раком СОПР частоту прогрессирования основного заболевания (продолженный рост опухоли, рецидивы опухоли, регионарные и отдаленные метастазы) рассматривали в общем по группе и в зависимости от стадии по TNM. В таблице 3.1 представлена частота и структура прогрессирования основного заболевания для 141 больных со стадией  $T_{1-3}N_0M_0$ .

**Таблица 3.1**

**Частота прогрессирования основного заболевания в течение двух лет у  
больных раком СОПР со стадией  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$**

Первичная стадия по TNM	n	Прогрессирование заболевания в течение двух лет										Всего с прогрессией Абс (%)
		Продолженный рост опухоли		Рецидив опухоли		Метастазы в регион. лимфоузлы		Отдаленные метастазы		Рецидив опухоли+ метастазы		
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
T1N0M0	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2N0M0	35	2	5,7	2	5,7	4	11,4	-	-	2	5,7	4 (11,4)
T2N1M0	14	4	28,6	3	21,4	5	35,7	-	-	3	21,4	5 (35,7)
T2N2aM0	6	3	50,0	1	16,7	2	33,3	-	-	1	16,7	3 (50)
T3N0M0	19	4	21,1	4	21,1	5	26,3	-	-	4	21,1	6 (31,6)
T3N1M0	34	7	20,6	7	20,6	15	44,1	-	-	6	17,6	16 (47,1)
T3N2aM0	16	9	56,3	6	37,5	8	50,0	2	33,3	6	37,5	9 (56,3)
Всего	141	29	20,6	23	16,3	39	27,7	2	1,4	22	15,6	43 (30,5)

У пациентов раком СОПР стадии  $T_1N_0M_0$  (n=17) случаев прогрессирования основного заболевания в течение двух лет не наблюдалось. У больных со стадией  $T_2N_{0-2}M_0$  (n=55) продолженный рост опухоли наблюдали у 9 (16,4%) пациентов, рецидив опухоли у 6 (10,9%), регионарные метастазы у 11 (20%), одновременно рецидив опухоли и метастазы в регионарные лимфоузлы у 6 (10,9%), (рис.3.1). Общее число

больных с прогрессированием основного заболевания при стадии  $T_2N_{0-2}M_0$  составило 12 (21,8%) (рис.3.1).

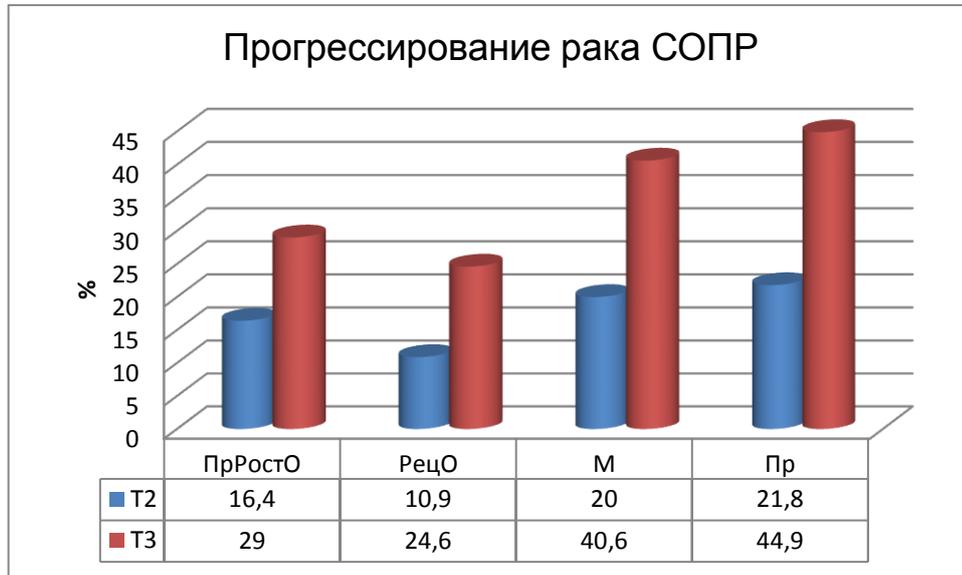


Рис. 3.1. Частота (%) продолженного роста опухоли (ПрРостО), рецидивирования (РецО), метастазов в региональные лимфоузлы (М), общего числа больных с прогрессированием заболевания (Пр) у больных раком СОПР в течение двух лет наблюдения

Течение основного заболевания зависело от опухолевого поражения лимфатических узлов: число рецидивов опухоли, регионарного метастазирования, продолженного роста опухоли, общего числа случаев прогрессирования в течение двух лет наблюдения при исходном отсутствии регионарного поражения лимфатических узлов ( $N_0$ ) было 5,7%, 11,4%, 5,7%, 11,4% и возрастало при исходном статусе  $N_1$  до 21,4%, 35,7%, 28,6%, 35,7% и статусе  $N_{2a}$  до 16,7%, 33,3%, 50%, 50%, соответственно (табл. 3.1).

У больных со стадией  $T_3N_{0-2}M_0$  ( $n=69$ ) продолженный рост опухоли наблюдали у 20 (29%) пациентов, рецидив опухоли у 17 (24,6%), регионарные метастазы у 28 (40,6%), одновременно рецидив опухоли и метастазы в регионарные лимфоузлы у 16 (23,2%), (рис. 3.1). Общее число больных с прогрессированием основного заболевания при стадии  $T_3N_{0-2}M_0$  составило 31 (44,9%) (рис.3.1) и закономерно зависело от наличия и выраженности опухолевого поражения лимфатических узлов: число рецидивов опухоли, регионарного метастазирования, продолженного роста опухоли, общего числа случаев прогрессирования в течение двух лет

наблюдения при исходном отсутствии регионарного поражения лимфатических узлов ( $N_0$ ) было 21,1%, 26,3%, 21,1%, 31,6% и возрастало при исходном статусе  $N_1$  до 20,6%, 44,1%, 20,6%, 47,1% и статусе  $N_2a$  до 37,5%, 50,0%, 56,3%, 56,3%, соответственно (табл. 3.1). Только у больных раком СОПР с исходной стадией  $T_3N_2aM_0$  в течение двух лет наблюдения имели место случаи появления отдаленного метастазирования (33,3%).

Кардинальные отличия частоты прогрессирования основного заболевания были выявлены у больных при стадии  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$ . Прогрессирование заболевания в течение двух лет наблюдали у всех пациентов со стадией рака СОПР  $T_4N_1M_0$ ,  $T_4N_2bM_1$  и  $T_4N_2cM_1$  (табл. 3.2). В связи с этим обстоятельством больные раком СОПР с  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$  не учитывались при изучении механизмов прогрессирования основного заболевания и влияния развития гнойных осложнений комбинированного лечения на прогресс онкологической патологии. Наличие стадии  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$  нами рассматривалось как детерминированный фактор, предиктор с высокой прогностической значимостью последующего прогрессирования болезни.

**Таблица 3.2**

**Частота прогрессирования основного заболевания в течение двух лет у больных раком СОПР со стадией  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$**

Первичная стадия по TNM	n	Прогрессирование заболевания в течение двух лет										Всего
		Продолженный рост опухоли		Рецидив опухоли		Метастазы в регион. лимфоузлы		Отдаленные метастазы		Рецидив опухоли+ метастазы		
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
$T_4N_1M_0$	9	4	44,4	8	88,9	9	100,0	3	33,3	9	100,0	9(100,0)
$T_4N_2bM_1$	7	7	100,0	6	85,7	7	100,0	4	57,1	7	100,0	7(100,0)
$T_4N_2cM_1$	5	5	100,0	5	100,0	5	100,0	4	80,0	5	100,0	5(100,0)
Всего	21	16	76,2	19	90,5	21	100,0	11	52,4	21	100,0	21(100)

В первые 12 мес. после окончания комбинированного первичного лечения, включая хирургический этап, у 96 (68%) больных раком СОПР со стадией  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$  наблюдали гнойные осложнения (рис. 3.2), куда были объединены местные раневые осложнения, в том числе некроз кожно-мышечного лоскута, некроз кожно-жирового лоскута, а также абсцессы и флегмона ЧЛО, остеомиелит нижней челюсти. Гиперпластический гингивит,

эрозивно-язвенный гингивит, ангулярный стоматит, оральный мукозит рассматривались как воспалительные последствия комбинированного лечения рака СОПР.

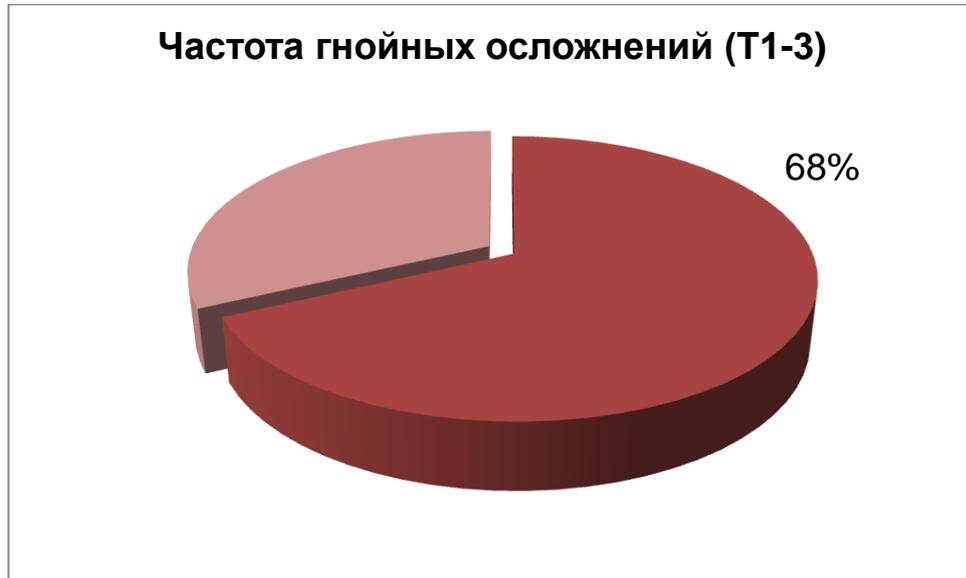


Рис.3.2. Частота гнойных осложнений у больных раком СОПР со стадией  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$  (n=141) после первичного комбинированного лечения

Структура воспалительных и гнойных осложнений у больных раком СОПР со стадией  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$  в течение 12 мес. после первичного комбинированного лечения отражена в таблице 3.3.

У всех больных клинической группы после комбинированного первичного лечения развивался гиперпластический гингивит, основными проявлениями которого были гиперемия, отечность. На фоне атрофии слизистой оболочки с явлениями геморрагий у 120 (85,1%) пациентов развивался эрозивно-язвенный гингивит. У 127 (90,1%) больных эрозивно-язвенные изменения, гиперемия не ограничивались десной и распространялись на слизистую оболочку всей ротовой полости, что укладывалось в картину орального мукозита. У больных отмечали прогрессирующую асимптомную эритему, на фоне которой выделялись приподнятые белесоватого оттенка бляшки, болезненные с псевдомембранозным налетом поражения слизистой.

Таблица 3.3

**Структура воспалительных и гнойных осложнений у больных раком СОПР со стадией T<sub>1-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> (n=141) после первичного комбинированного лечения**

Последствия	Абс.	%
Гиперпластический гингивит	141	100,0
Эрозивно-язвенный гингивит	120	85,1
Ангулярный стоматит	21	14,9
Оральный мукозит	127	90,1
Местные раневые осложнения	68	48,2
Некроз кожно-мышечного лоскута	31	22,0
Некроз кожно-жирового лоскута	29	20,6
Абсцессы и флегмона ЧЛЮ	8	5,7
Остеомиелит нижней челюсти	28	19,9

При пальпации бляшки пациенты отмечали легкую болезненность. Оральный мукозит препятствовал нормальному приему пищи и глотанию ввиду болезненности. Ангулярный стоматит, ограничивающий открывание рта, вызывающий болезненность при жевании, развивался у 21 (14,9%) больных. Иногда больных беспокоило чувство онемения слизистой оболочки, извращение вкусовых ощущений.

Гистологическим субстратом орального мукозита были отек слизистой оболочки с деструкцией базальной мембраны, сосудистые изменения, проявляющиеся сужением просвета, утолщением и набуханием интимы, деструкцией эластических и мышечных элементов сосудистой стенки. Деструктивные процессы сопровождались нарушением иннервации соединительнотканной стромы и являлись причиной боли.

Местные раневые осложнения развивались у 68 (48,2%) больных и в основном проявлялись некрозом кожно-мышечного лоскута (22%), некрозом кожно-жирового лоскута (20,6%). Абсцессы и флегмона челюстно-лицевой области (ЧЛО) осложняли заживление операционной раны в 8 (5,7%) наблюдениях. Опухолевое поражение надкостницы нижней челюсти на фоне полного или частичного длительного отсутствия зубов и как следствие атрофии альвеолярного отростка способствовало развитию остеомиелита нижней челюсти, наблюдающегося в клинической группе у 28 (19,9%) пациентов.

У больных раком СОПР со стадией  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$  гнойные осложнения в первые 12 мес. после окончания комбинированного первичного лечения имели место у 19 (90,5%) пациентов (рис. 3.3).

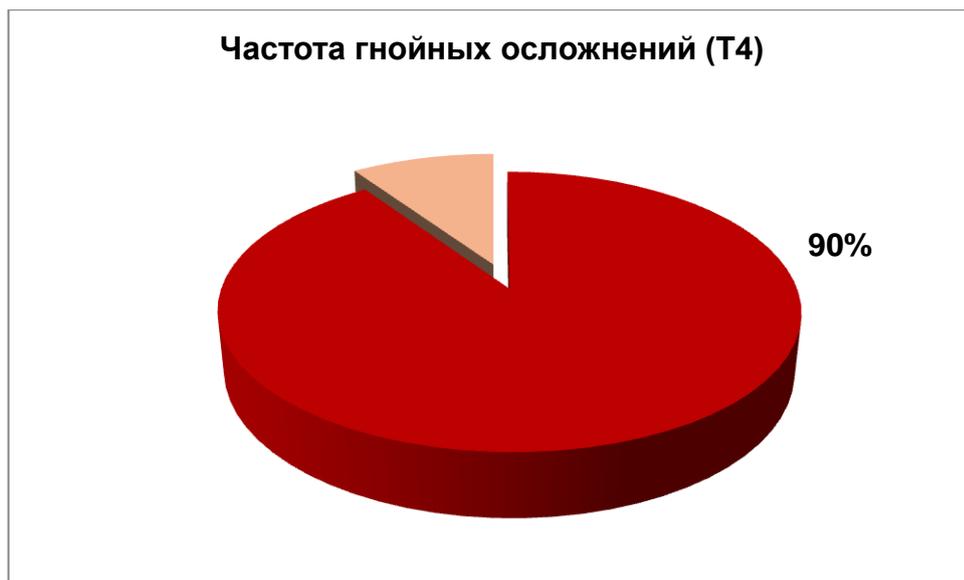


Рис.3.3. Частота гнойных осложнений у больных раком СОПР со стадией  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$  (n=21) после первичного комбинированного лечения

Структура воспалительных и гнойных осложнений у больных раком СОПР со стадией  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$  в течение 12 мес. после первичного комбинированного лечения отражена в таблице 3.4.

Таблица 3.4

**Структура воспалительных и гнойных осложнений у больных раком СОПР со стадией T<sub>4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0-1</sub> (n=21) после первичного комбинированного лечения**

Последствия	Абс.	%
Ангулярный стоматит	14	66,7
Оральный мукозит	21	100,0
Местные раневые осложнения	15	71,4
Некроз кожно-мышечного лоскута	5	23,8
Некроз кожно-жирового лоскута	3	14,3
Абсцессы и флегмоны ЧЛЮ	4	19,0
Остеомиелит нижней челюсти	3	14,3

У больных раком СОПР со стадией T<sub>4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0-1</sub> оральный мукозит встречался у всех пациентов, ангулярный стоматит – в 66,7% наблюдений. Местные раневые осложнения имели место в 71,4%, остеомиелит нижней челюсти был диагностирован в 14,3%.

У больных раком СОПР со стадией T<sub>4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0-1</sub> в отличие от пациентов с T<sub>1-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> частота местных раневых осложнений была статистически значимо выше (p<0,05) (рис. 3.4).

В зависимости от наличия гнойных осложнений комбинированного первичного лечения 141 больной раком СОПР со стадией T<sub>1-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> были разделены на две группы. Основная группа (n=96) - больные, у которых развивались гнойные осложнения первичного комбинированного лечения: некроз мышечного или кожно-жирового лоскута, используемого для пластики, остеомиелит нижней челюсти, флегмона нижней челюсти. У больных группы сравнения (n=45) после химиолучевого и хирургического лечения гнойных осложнений не было.



Рис. 3.4. Частота развития местных раневых осложнений (МРО), остеомиелита нижней челюсти (ОстНЧ) у больных раком СОПР в зависимости от стадии. \* - достоверные отличия при  $p < 0,05$ .

У больных основной группы и группы сравнения проводили сравнительный анализ частоты прогрессирования рака СОПР (табл. 3.5).

**Таблица 3.5**

**Частота прогрессирования основного заболевания в течение двух лет у больных основной группы и группы сравнения**

Тип прогрессирования	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Продолженный рост опухоли	25	26,0	4	8,9	0,03
Рецидив опухоли	21	21,9	2	4,4	0,009
Метастазы в региональные лимфоузлы	32	33,3	7	15,6	0,028
Отдаленные метастазы	1	1,0	1	2,2	0,58
Всего с прогрессией	39	40,6	4	8,9	0,0001

Продолженный рост опухоли (26% против 8,9%,  $p=0,03$ ), рецидив опухоли (21,9% против 4,4%,  $p=0,009$ ), метастазы в региональные лимфоузлы (33,3% против 15,6%,  $p=0,028$ ), общее число случаев прогрессии заболевания (40,6% против 8,9%,  $p=0,0001$ ) достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) наблюдались в основной группе по сравнению с группой сравнения. Таким образом, от

наличия или отсутствия гнойных осложнений при комбинированном лечении больных раком СОПР зависела частота прогрессирования основного заболевания, что требовало дальнейшего изучения сопряжения этих двух фактов.

У больных основной группы рецидив опухоли в течение двух лет после окончания комбинированного первичного лечения развился в 21,9%, а в группе сравнения – в 4%, что явилось основанием для построения таблицы сопряженности (табл.3.6) и легло в основу расчета критерия сопряжения  $\chi^2$  Пирсона и его доверительной вероятности  $p$ , а также коэффициента контингенции, который отражает тесноту связи между двумя независимыми признаками.

**Таблица 3.6**

**Сопряжение развития рецидива опухоли и гнойных осложнений у больных раком СОПР**

Рецидив опухоли	Гнойные осложнения		Всего
	есть (основная группа)	нет (группа сравнения)	
есть	21 (21,9%)	2 (4%)	23
нет	75 (78,1%)	43 (96%)	118
итого	96 (100%)	45 (100%)	
$p (\chi^2)$	$p=0,018 (\chi^2=5,6)$		
Коэффициент контингенции (сопряжения)	0,195		

Величина критерия Пирсона ( $\chi^2=5,6$ ), превышающая критический уровень, доверительная вероятность  $p=0,018$  ( $p \leq 0,05$ ) свидетельствовали о статистически значимом сопряжении между развитием гнойных осложнений комбинированного лечения и рецидивированием опухоли в течение двух лет после операции.

Для определения связи двух качественных признаков, каждый из которых состоит только из двух групп, применяется коэффициент контингенции. Для его вычисления строится таблица, которая показывает

связь между двумя явлениями, каждое из которых должно быть альтернативным, то есть состоящим из двух качественно отличных друг от друга значений признака. Коэффициент контингенции связи между развитием гнойных осложнений комбинированного лечения и рецидивированием опухоли в течение двух лет после операции составил 0,195 ( $p=0,018$ ).

Параметры риска рецидива опухоли у больных при наличии гнойных осложнений отражены в таблице 3.7.

**Таблица 3.7**

**Параметры риска рецидива опухоли у больных раком СОПР при наличии гнойных осложнений (ГО)**

Показатель	Основная группа по сравнению с группой сравнения
Относительный риск	1,44
Доверительный интервал относительного риска	1,19-1,73
Z, p	Z=3,82; p=0,001
Число больных с ГО на одного больного с рецидивом опухоли (NNT)	3,6
Доверительный интервал NNT	2,08-13,46
Положительная прогностическая значимость ГО в отношении развития рецидива опухоли (PPV)	91,3%
Доверительный интервал PPV	71,96-98,93%

Относительный риск развития рецидива опухоли в ближайшие два года после окончания первичного комбинированного лечения при наличии гнойных осложнений комбинированного лечения по сравнению с группой сравнения составил 1,44 ( $p=0,001$ ). Доверительный интервал относительного риска развития рецидива опухоли для генеральной совокупности составил 1,19-1,73. Среди больных раком СОПР с гнойными осложнениями комбинированного лечения каждый третий (NNT=3,6) имел рецидив

опухоли. Положительная прогностическая значимость гнойных осложнений комбинированного лечения в отношении последующего развития рецидива опухоли была высокой и составила 91,3% при границах доверительного интервала 71,96-98,93%. Это свидетельствовало о том, что в генеральной совокупности больных раком СОПР в этих пределах встречаемости при наличии гнойных осложнений комбинированного лечения развивался рецидив опухоли. Таким образом, развитие гнойных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР способствовало развитию рецидива опухоли в ближайшие два года.

На следующем этапе изучали сопряжение регионарного метастазирования опухоли и гнойных осложнений у больных раком СОПР (табл. 3.8).

**Таблица 3.8**

**Сопряжение регионарного метастазирования опухоли и гнойных осложнений у больных раком СОПР**

Регионарное метастазирование	Гнойные осложнения		Всего
	есть	нет	
есть	32 (33,3%)	7 (15,6%)	39
нет	64 (66,7%)	38 (84,4%)	102
итого	96 (100%)	45 (100%)	
$p (\chi^2)$	$p=0,046 (\chi^2=3,99)$		
Коэффициент контингенции (сопряжения)	0,166		

У больных основной группы метастазирование в региональные узлы в течение двух лет после окончания комбинированного первичного лечения наблюдалось в 33,3%, а в группе сравнения – в 15,6% (табл.3.8). Сопряжение между двумя признаками было статистически значимым ( $p=0,046$ ,  $\chi^2=3,99$ ). Относительный риск метастазирования в региональные узлы у больных раком СОПР в ближайшие два года после окончания первичного комбинированного лечения при наличии гнойных осложнений

комбинированного лечения по сравнению с группой сравнения составил 1,31 ( $p=0,012$ ) (табл. 3.9).

**Таблица 3.9**

**Параметры риска регионарного метастазирования опухоли у больных раком СОПР при наличии гнойных осложнений (ГО)**

Показатель	Основная группа по сравнению с группой сравнения
Относительный риск	1,31
Доверительный интервал относительного риска	1,1-1,61
Z, p	Z=2,51; p=0,012
Число больных с ГО на одного больного с метастазом в лимфоузлы (NNT)	5,18
Доверительный интервал NNT	2,76-41,62
Положительная прогностическая значимость ГО в отношении развития метастаза в региональные лимфоузлы (PPV)	82,05%
Доверительный интервал PPV	66,47-92,46%

Среди больных раком СОПР с гнойными осложнениями комбинированного лечения каждый пятый (NNT=5,18) имел метастазы в региональные лимфоузлы. Положительная прогностическая значимость гнойных осложнений в отношении метастазирования в региональные лимфоузлы составила 82,05% (доверительный интервал 66,47-92,46%). Итак, развитие гнойных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР является доказанным фактором, повышающим риск метастазирования опухоли в региональные лимфоузлы.

При наличии гнойных осложнений продолженный рост опухоли в течение двух лет после окончания комбинированного первичного лечения наблюдался в 26%, а при отсутствии инфекционно-деструктивных

осложнений – в 8,9% (табл. 3.10). Сопряжение изучаемых явлений было статистически значимым ( $p=0,033$ ,  $\chi^2=4,52$ ).

Таблица 3.10

**Сопряжение продолженного роста опухоли и гнойных осложнений у больных раком СОПР**

Продолженный рост опухоли	Гнойные осложнения		Всего
	есть	нет	
есть	25 (26%)	4 (8,9%)	29
нет	71 (74%)	41 (91,1%)	112
итого	96 (100%)	45 (100%)	
$p$ ( $\chi^2$ )	$p=0,033$ ( $\chi^2=4,52$ )		
Коэффициент контингенции (сопряжения)	0,176		

Параметры риска продолженного роста опухоли у больных раком СОПР при наличии гнойных осложнений отражены в таблице 3.11.

Таблица 3.11

**Параметры риска продолженного роста опухоли у больных раком СОПР при наличии гнойных осложнений (ГО)**

Показатель	Основная группа по сравнению с группой сравнения
Относительный риск	1,36
Доверительный интервал относительного риска	1,11-1,66
Z, p	Z=2,96; p=0,003
Число больных с ГО на одного умершего больного (NNT)	4,38
Доверительный интервал NNT	2,41-24,07
Положительная прогностическая значимость ГО в отношении летального исхода (PPV)	82,21%
Доверительный интервал PPV	68,34-96,11%

Относительный риск развития продолженного роста опухоли в ближайшие два года после окончания первичного комбинированного лечения при наличии гнойных осложнений комбинированного лечения по сравнению с группой сравнения составил 1,36 ( $p=0,003$ ). Доверительный интервал относительного риска продолженного роста опухоли для генеральной совокупности составил 1,11-1,66. Среди больных раком СОПР с гнойными осложнениями комбинированного лечения каждый четвертый пациент ( $NNT=4,38$ ) имел продолженный рост опухоли.

Положительная прогностическая значимость гнойных осложнений комбинированного лечения в отношении продолженного роста опухоли была высокой и составила 82,21% при границах доверительного интервала 68,34-96,11%. Это свидетельствовало о том, что в генеральной совокупности больных раком СОПР с указанной частотой при наличии гнойных осложнений комбинированного лечения наступал продолженный рост опухоли. Таким образом, развитие гнойных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР являлось фактором, способствующим продолженному росту опухоли.

Общее число случаев прогрессирования заболевания в основной группе больных раком СОПР было 40,6%, в группе сравнения 8,9% (таблица 3.12).

**Таблица 3.12**

**Сопряжение прогрессирования заболевания и гнойных осложнений у больных раком СОПР**

Прогрессирование заболевания	Гнойные осложнения		Всего
	есть	нет	
есть	39 (40,6%)	4 (8,9%)	43
нет	57 (59,4%)	41 (91,1%)	98
итого	96 (100%)	45 (100%)	
$p (\chi^2)$	$p=0,0003 (\chi^2=13,1)$		
Коэффициент контингенции (сопряжения)	0,292		

Сопряжение прогрессирования заболевания и гнойных осложнений у больных раком СОПР было статистически значимым, о чем свидетельствовали высокие значения эмпирического критерия Пирсона ( $\chi^2=13,1$ ) и соответствующая доверительная вероятность  $p=0,0003$  (табл. 3.12). Коэффициент контингенции имел высокое значение  $0,29$  ( $p=0,0003$ ).

Относительный риск прогрессирования заболевания в ближайшие два года после окончания первичного комбинированного лечения при наличии гнойных осложнений комбинированного лечения по сравнению с группой сравнения составил  $1,56$  ( $p<0,0001$ ) (табл. 3.13).

**Таблица 3.13**

**Параметры риска прогрессирования заболевания у больных раком СОПР при наличии гнойных осложнений (ГО)**

Показатель	Основная группа по сравнению с группой сравнения
Относительный риск	1,56
Доверительный интервал относительного риска	1,28-1,89
Z, p	Z=4,51; p<0,0001
Число больных с ГО на одного больного с прогрессией рака СОПР (NNT)	3,07
Доверительный интервал NNT	2,07-5,99
Положительная прогностическая значимость ГО в отношении прогрессии рака СОПР (PPV)	90,7%
Доверительный интервал PPV	77,86-97,41%

Следовательно, в основной группе больных общее число случаев прогрессирования рака СОПР в течение двух лет после окончания первичного лечения было в 1,6 раза чаще ( $p<0,0001$ ) по сравнению с группой сравнения с доверительным интервалом для генеральной совокупности 1,28-1,89. Среди больных раком СОПР с гнойными осложнениями

комбинированного лечения у каждого третьего пациента ( $NNT=3,07$ ) имело место прогрессирование основного заболевания. Положительная прогностическая значимость ГО в отношении прогрессии рака СОПР была высокой – 90,7%.

Таким образом, у больных раком СОПР наличие гнойных осложнений комбинированного лечения было ассоциировано с последующим развитием прогрессирования заболевания.

Суммарно параметры силы сопряжения между признаками прогрессирования рака СОПР и гнойными осложнениями комбинированного лечения представлены в таблице 3.14.

**Таблица 3.14**

**Параметры силы сопряжения между признаками прогрессирования рака СОПР и гнойными осложнениями комбинированного лечения**

Признак	Коэффициент контингенции	Относительный риск	Положительная прогностическая значимость
Продолженный рост опухоли	0,176 (p=0,033)	1,36 (p=0,003)	82,21%
Рецидив опухоли	0,195 (p=0,018)	1,44 (p=0,001)	91,3%
Метастазы в региональные лимфоузлы	0,166 (p=0,046)	1,31 (p=0,012)	82,05%
Прогрессирование основного заболевания	0,292 (p=0,0003)	1,56 (p<0,0001)	90,7%

Наиболее выраженная сила сопряжения или ассоциации с развитием гнойных осложнений была установлена для общего числа наблюдений прогрессирования рака СОПР. Из составляющих случаев прогрессирования выше прогностическая значимость была выявлена для рецидивов опухоли.

Исходно до начала первичного лечения пациенты основной группы и группы сравнения были обследованы на предмет выявления в зубном налете микробов с помощью метода ПЦР в режиме реального времени и метода

масс-спектрометрии MALDI-ToF-MS. Кроме того, методом масс-спектрометрии MALDI-ToF была произведена оценка белкового спектра слюны.

Качественное и количественное соотношение в зубном налете бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, на первом этапе определяли с помощью панели «Дентоскрин» методом ПЦР в режиме реального времени (табл. 3.15).

**Таблица 3.15**

**Частота качественного выявления микробов зубного налета методом ПЦР в режиме реального времени с помощью тест-системы «Дентоскрин» в основной группе и группе сравнения до операции**

Вид микроба	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45		p
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	76	79,2	32	71,1	0,40
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	94	97,9	28	62,2	<0,001
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	96	100,0	25	55,6	<0,001
<i>Treponema denticola</i>	92	95,8	25	55,6	<0,001
<i>Prevotella intermedia</i>	90	93,8	37	82,2	0,07
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	82	85,4	34	75,6	0,23
<i>Tannerella forsythensis</i>	81	84,4	35	77,8	0,47

Все семь клинически значимых микроорганизмов, определение которых включено в панель «Дентоскрин», с высокой частотой выявлялись как в основной, так и в группе сравнения. Однако, по трем бактериям - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* по частоте выявления в изучаемых группах сформировалось достоверное различие. В основной группе по сравнению с группой сравнения

частота качественного выявления *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (100% против 55,6%,  $p < 0,001$ ), *Porphyromonas gingivalis* (97,9% против 62,2%,  $p < 0,001$ ), *Treponema denticola* (95,8% против 55,6%,  $p < 0,001$ ) была выше. Тенденция повышения частоты выявления в зубном налете у пациентов в основной группе по сравнению с группой сравнения, не достигая статистической значимости, сложилась для *Prevotella intermedia* (93,8% против 82,2% при  $p < 0,07$ ).

В таблице 3.16 отражена клинически значимая концентрация микробов зубного налета, превышение которой сопровождается развитием воспалительно-деструктивных мягких и твердых тканей пародонта.

**Таблица 3.16**

**Клинически значимая концентрация микробов для развития воспалительно-деструктивных процессов в ротовой полости**

Вид микроба	Клинически значимая концентрация
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	$10^5$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	$10^5$
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	$10^4$
<i>Treponema denticola</i>	$10^6$
<i>Prevotella intermedia</i>	$10^6$
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$10^6$
<i>Tannerella forsythensis</i>	$10^5$

У больных основной группы частота превышений клинически значимой концентрации и достижения пороговых концентраций микробов зубного налета отражена в таблице 3.17, а в группе сравнения – в таблице 3.18.

У больных основной группы для всех изучаемых бактерий в панели частота превышений клинически значимой концентрации была выше 80% и составила для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 97,9%, *Treponema denticola* 94,6%, *Porphyromonas gingivalis* 93,6%, *Prevotella intermedia* 90%, *Fusobacterium nucleatum* 85,4%, *Porphyromonas endodontalis* 81,6% и *Tannerella forsythensis* 81,5% (табл. 3.17).

**Таблица 3.17**

**Частота превышений клинически значимой концентрации (КЗК) и достижения пороговых концентраций микробов зубного налета в основной группе до операции**

Вид микроба	Число превышений КЗК		Число пороговых концентраций		Общее число выявления бактерии
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	62	81,6	7	9,2	76 (100%)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	88	93,6	3	3,2	94 (100%)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	94	97,9	2	2,1	96 (100%)
<i>Treponema denticola</i>	87	94,6	4	4,3	92 (100%)
<i>Prevotella intermedia</i>	81	90,0	5	5,6	90 (100%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	70	85,4	7	8,5	82 (100%)
<i>Tannerella forsythensis</i>	66	81,5	6	7,4	81 (100%)

**Таблица 3.18**

**Частота превышений клинически значимой концентрации и достижения пороговых концентраций микробов зубного налета в группе сравнения до операции**

Вид микроба	Число превышений КЗК		Число пороговых концентраций		Общее число выявления бактерии
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	13	40,6	6	18,8	32 (100%)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	18	64,3	5	17,9	28 (100%)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17	68,0	4	16,0	25 (100%)
<i>Treponema denticola</i>	17	68,0	6	24,0	25 (100%)
<i>Prevotella intermedia</i>	15	40,5	8	21,6	37 (100%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	21	61,8	7	20,6	34 (100%)
<i>Tannerella forsythensis</i>	18	51,4	9	25,7	35 (100%)

У пациентов группы сравнения частота превышений клинически значимой концентрации была ниже по сравнению с основной группой и составила для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis* и *Tannerella forsythensis* 68%, 68%, 64,3%, 40,5%, 61,8%, 40,6% и 51,4%, соответственно (табл. 3.18).

Частота соотношения выявления микробов относительно клинически значимой концентрации в зубном налете в основной группе и группе сравнения иллюстрирована на рис.3.5.

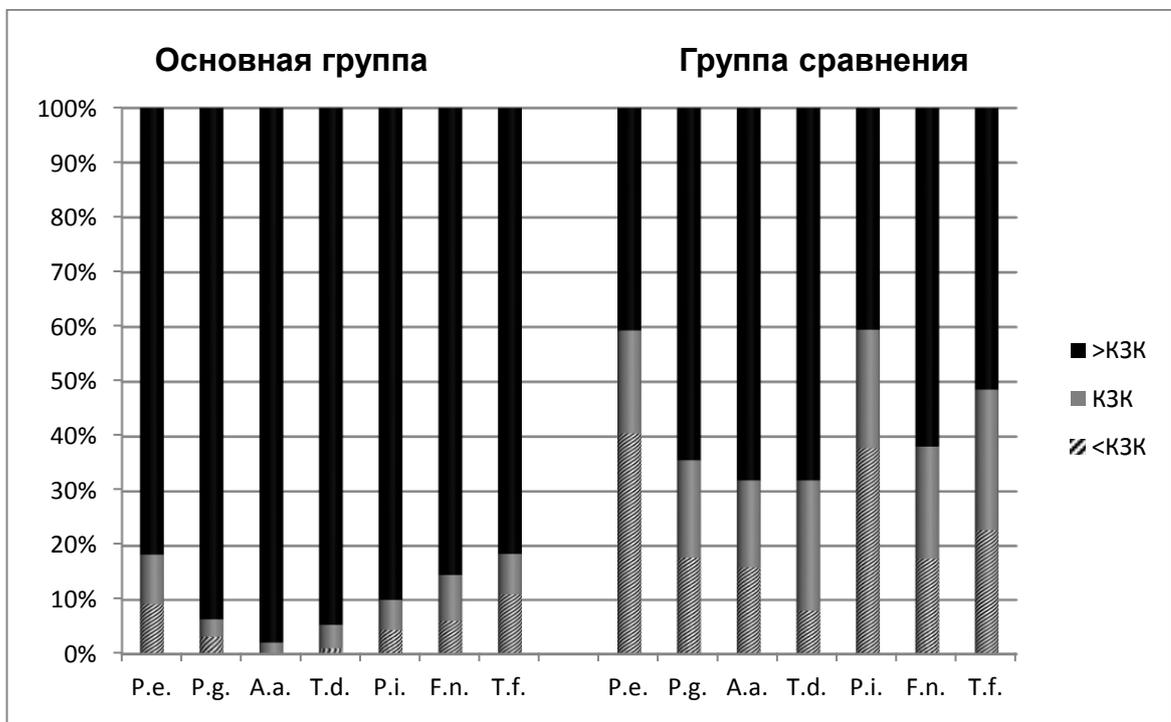


Рис. 3.5. Частота соотношения выявления микробов относительно клинически значимой концентрации (КЗК) (менее, равно, более) в зубном налете в основной группе и группе сравнения

На рис.3.5 отражена высокая частота встречаемости патогенных бактерий в концентрациях, превышающих пороговые, в зубном налете у пациентов основной группы. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* обладает самой высокой патогенностью при низких концентрациях и ассоциирован с деструктивным поражением тканей кости. *Treponema denticola* обеспечивает умеренный риск развития инфекционных заболеваний ротовой полости, но принимая участие в образовании «каркаса» биопленки, способствует адгезии

более патогенных бактерий. *Porphyromonas gingivalis* отвечает за продукцию протеаз, адгезинов, эндотоксинов и цитотоксинов, повреждающих ткань десны и костные структуры. *Tannerella forsythensis* продуцирует протеазы и липополисахариды и ингибирует местную иммунную защиту. Активные ферменты и метаболиты *Porphyromonas endodontalis* также способны ингибировать фагоцитоз, ограничивая активность местного иммунитета. *Prevotella intermedia* и *Fusobacterium nucleatum* способствуют острому и быстро прогрессирующему течению инфекционного процесса.

Для всех бактерий панели «Дентоскрин» в основной группе по сравнению с группой сравнения было выявлено статистически значимое повышение частоты случаев превышений клинически значимой концентрации в зубном налете: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – 97,9% против 68% ( $p < 0,0001$ ), *Treponema denticola* – 94,6% против 68% ( $p < 0,0001$ ), *Porphyromonas gingivalis* – 93,6% против 64,3% ( $p < 0,0001$ ), *Prevotella intermedia* - 90,0% против 40,5% ( $p < 0,0001$ ), *Fusobacterium nucleatum* 85,4% против 61,8% ( $p < 0,0001$ ), *Porphyromonas endodontalis* - 81,6% против 40,6% ( $p < 0,0001$ ), *Tannerella forsythensis* - 81,5% против 51,4% ( $p = 0,0005$ ) (табл. 3.19).

**Таблица 3.19**

**Число превышений клинически значимой концентрации в зубном налете в основной группе и группе сравнения**

Вид микроба	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45		p
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	62	81,6	13	40,6	<0,0001
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	88	93,6	18	64,3	<0,0001
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	94	97,9	17	68,0	<0,0001
<i>Treponema denticola</i>	87	94,6	17	68,0	<0,0001
<i>Prevotella intermedia</i>	81	90,0	15	40,5	<0,0001
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	70	85,4	21	61,8	0,003
<i>Tannerella forsythensis</i>	66	81,5	18	51,4	0,0005

На следующем этапе спектр микроорганизмов зубного налета идентифицировали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Итоги сравнительного анализа показали, что в основной группе и группе сравнения *Prevotella melaninogenica* (96,9% и 93,3%), *Streptococcus mitis* (90,65 и 84,4%), *Carnocytophaga gingivalis* (94,8% и 95,6%), *Prevotella intermedia* (85,4% и 75,6%) встречались с высокой частотой без статистически значимого различия ( $p>0,05$ ) (табл. 3.20). Вероятно, присутствие данного спектра бактерий было связано с развитием и течением основного заболевания.

Таблица 3.20

**Частота качественного выявления микробов зубного налета методом MALDI-ToF-MS в основной группе и группе сравнения до операции**

Вид микроба	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45		p
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	93	96,9	16	35,6	<0,0001
<i>Streptococcus mitis</i>	87	90,6	38	84,4	0,43
<i>Prevotella melaninogenica</i>	93	96,9	42	93,3	0,59
<i>Carnocytophaga gingivalis</i>	91	94,8	43	95,6	0,83
<i>Campylobacter rectus</i>	24	25,0	9	20,0	0,66
<i>Mycoplasmas</i>	10	10,4	5	11,1	0,87
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	90	93,8	25	55,6	<0,0001
<i>Treponema denticola</i>	84	87,5	23	51,1	<0,0001
<i>Prevotella intermedia</i>	82	85,4	34	75,6	0,24
<i>Peptostreptococcus micros</i>	11	11,5	6	13,3	0,98
<i>Treponema socranskii</i>	8	8,3	4	8,9	0,84
<i>Tannerella forsythensis</i>	79	82,3	33	73,3	0,31
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	77	80,2	30	66,7	0,12
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	71	74,0	30	66,7	0,49

Достоверное различие было выявлено для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*. В основной группе по сравнению с группой сравнения *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (96,9% против 35,6%,  $p<0,0001$ ), *Porphyromonas gingivalis* (93,8% против 55,6%,  $p<0,0001$ ), *Treponema denticola* (87,5%

против 51,1%,  $p < 0,0001$ ) в зубном налете встречались чаще (табл. 3.20). При этом, частота выявляемости бактерий в зубном налете у больных раком СОПР с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF и метода ПЦР в реальном времени практически совпадали. Однако, более широкий спектр бактерий, выявляемых при идентификации масс-спектрометрией MALDI-TOF, показал преимущество данного метода при скрининговых исследованиях.

На следующем этапе у больных раком СОПР были идентифицированы белки слюны методом MALDI-ToF-MS. Молекулярная масса большинства пептидов слюны находилась в диапазоне от 1000 до 7000 Да. При комплексном анализе всех полученных масс-спектров было найдено в среднем 112 пиков белков. Основные идентифицированные белки слюны у больных раком СОПР с указанием их молекулярной массы в Да представлены в таблице 3.21.

Сравнительный анализ масс-спектров белков в основной группе и группе сравнения проводили по частоте встречаемости белков в слюне и по средней амплитуде интенсивности пиков масс-спектров после их накопления.

Статистически значимое отличие частоты выявления белков в протеомном спектре слюны больных основной группы и группы сравнения представлено в таблице 3.22.

У больных основной группы по сравнению с группой сравнения в слюне чаще идентифицировали изоформу 2 предшественника интер-альфа трипсинового ингибитора тяжелой цепи H4 (81,3% против 46,7%,  $p < 0,001$ ), белок SERPINA1(PRO2275) (85,4% против 35,6%,  $p < 0,001$ ), интерлейкин 6 (88,5% против 53,3%,  $p < 0,001$ ), интерлейкин 8 (90,6% против 60,0%,  $p < 0,001$ ), интерлейкин 18 (93,8% против 55,6%,  $p < 0,001$ ), гипоксия индуцибельный фактор 1 (96,9% против 42,2%,  $p < 0,001$ ), трансферрин (82,3% против 33,3%,  $p < 0,001$ ), лактоферрин (97,9% против 48,9%,  $p < 0,001$ ) (табл. 3.22).

Таблица 3.21

**Спектр белков, идентифицированных в слюне у больных раком СОПР  
методом MALDI-ToF-MS**

Белок	Mr, Da
Изоформа 2 предшественника интер-альфа трипсинового ингибитора тяжелой цепи H4 (ITIH4 Isoform 2 of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor)	1062
Белок SERPINA1(PRO2275)	1454
1 бета актин цитоплазмы (ACTB Actin, cytoplasmic 1)	2214
Гипоксия индуцибельный фактор 1 (Hypoxia Inductor Factors 1)	2351
280-kDa protein	3016
Изоформа 1 предшественника альфа цепи фибриногена (FGA Isoform 1 of fibrinogen alpha chain precursor)	3154
F2 предшественник протромбина (F2 Prothrombin precursor)	3163
Дефензин 1 (Defensin 1)	4294
Изоформа 1 фактора Виллебранда C (VWCE Isoform 1 of von Willebrand factor C)	5379
Предшественник домен-содержащего белка эпидермального фактора роста (EGF domain-containing protein precursor)	5381
Статерин (Statherin)	5380
Неидентифицированный пептид (Unknown peptide-identification failure)	5435
Инсулиноподобный фактор роста (Insulin growth factor 1 (IGF-1))	7649
Интерлейкин 8	8800
Профилин (Profilin)	14000
Основной фактор роста фибробластов (Basic fibroblast growth factor)	16800
Интерлейкин 18	18000
CD59	19000
Интерлейкин-6	22294
Фактор некроза опухоли $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	26000
Syfra 21.1	30000
p53	43700
Циклин D1 (Cyclin D1)	53000
Трансферрин (Transferrin)	77000
Лактоферрин (Lactoferrin)	80579
$\alpha$ -амилаза ( $\alpha$ -amylase)	83000
CD44	85000
MMP9	92000
Эндотелин 1 (Endothelin-1)	102000
Лактатдегидрогеназа (Lactate dehydrogenase)	144000
Раковый антиген 125 (Cancer antigen 125 (CA125))	220000

Таблица 3.22

**Отличие частоты выявления белков из протеомного спектра слюны больных основной группы и группы сравнения**

Пептиды и белки	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45		Δ%	p
	Абс.	%	Абс.	%		
Изоформа 2 предшественника интер-альфа трипсинового ингибитора тяжелой цепи Н4	78	81,3	21	46,7	34,6	<0,001
Белок SERPINA1(PRO2275)	82	85,4	16	35,6	49,8	<0,001
Интерлейкин 6	85	88,5	24	53,3	35,2	<0,001
Интерлейкин 8	87	90,6	27	60,0	30,6	<0,001
Интерлейкин 18	90	93,8	25	55,6	38,2	<0,001
Гипоксия-индуцибельный фактор 1	93	96,9	19	42,2	54,7	<0,001
Трансферрин	79	82,3	15	33,3	49	<0,001
Лактоферрин	94	97,9	22	48,9	48,9	<0,001

Усредненная интенсивность масс-спектров у больных основной группы и группы сравнения с результатами проведения сравнительного анализа представлена в таблице 3.23.

У больных основной группы по сравнению с группой сравнения интенсивность масс-спектров была достоверно выше ( $p < 0,05$ ) для белков изоформа 2 предшественника интер-альфа трипсинового ингибитора тяжелой цепи Н4 ( $p = 0,003$ ), белок SERPINA1(PRO2275) ( $p = 0,002$ ), интерлейкин 6 ( $p = 0,003$ ), интерлейкин 8 ( $p = 0,02$ ), интерлейкин 18 ( $p = 0,03$ ), гипоксия индуцибельный фактор 1 ( $p = 0,007$ ), лактоферрин ( $p = 0,046$ ) и статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ) для 1 бета актин цитоплазмы ( $p = 0,026$ ), изоформа 1 предшественника альфа цепи фибриногена ( $p = 0,037$ ), 280-kDa protein ( $p = 0,024$ ), F2 предшественник протромбина ( $p = 0,017$ ), изоформа 1 фактора Виллебранда С ( $p = 0,034$ ).

Таблица 3.23

**Усредненная интенсивность масс-спектров у больных основной группы и группы сравнения**

Пептиды и белки	Основная группа, n=96	Группа сравнения, n=45	Тренд изменения интенсивности спектра в основной группе	p
Изоформа 2 предшественника интер-альфа трипсинового ингибитора тяжелой цепи H4	423,3±24,5	221,5±18,5	Повышение	0,003
Белок SERPINA1(PRO2275)	502,2±14,8	215,7±23,8	Повышение	0,002
1 бета актин цитоплазмы	102,5±6,9	176,4±11,4	Снижение	0,026
Интерлейкин-6	212,9±28,9	148,5±15,3	Повышение	0,003
Интерлейкин-8	279,3±29,8	156,7±22,7	Повышение	0,02
Интерлейкин-18	482,1±38,6	304,3±29,4	Повышение	0,03
Гипоксия индуцибельный фактор 1	428,8±29,6	189,6±19,4	Повышение	0,007
Изоформа 1 предшественника альфа цепи фибриногена	128,2±11,4	268,5±17,8	Снижение	0,037
280-kDa protein	271,4±21,7	563,9±25,3	Снижение	0,024
F2 предшественник протромбина	312,2±25,8	852,5±45,1	Снижение	0,024
Изоформа 1 фактора Виллебранда C	331,3±23,6	604,9±32,5	Снижение	0,017
Неидентифицированный пептид (Unknown peptide-identification failure)	54,4±7,5	128,2±10,7	Снижение	0,034
Лактоферрин	253,8±32,9	156,5±9,6	Повышение	0,046

Относительное отклонение (в %) усредненной интенсивности масс-спектров у больных основной группы по сравнению с группой сравнения иллюстрировано на рис. 3.6.

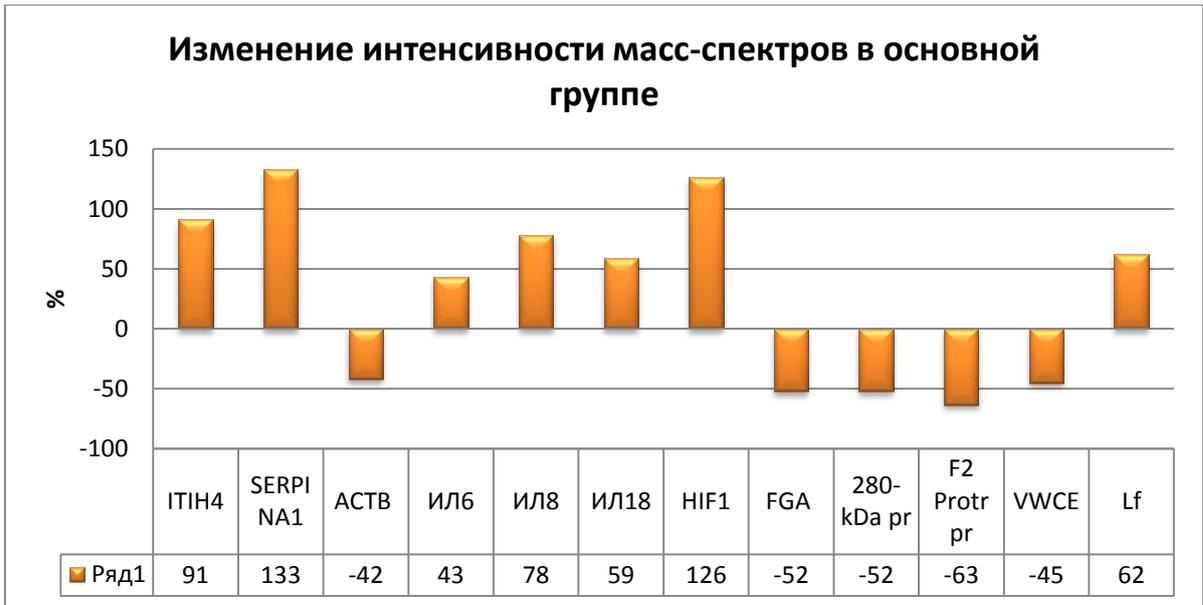
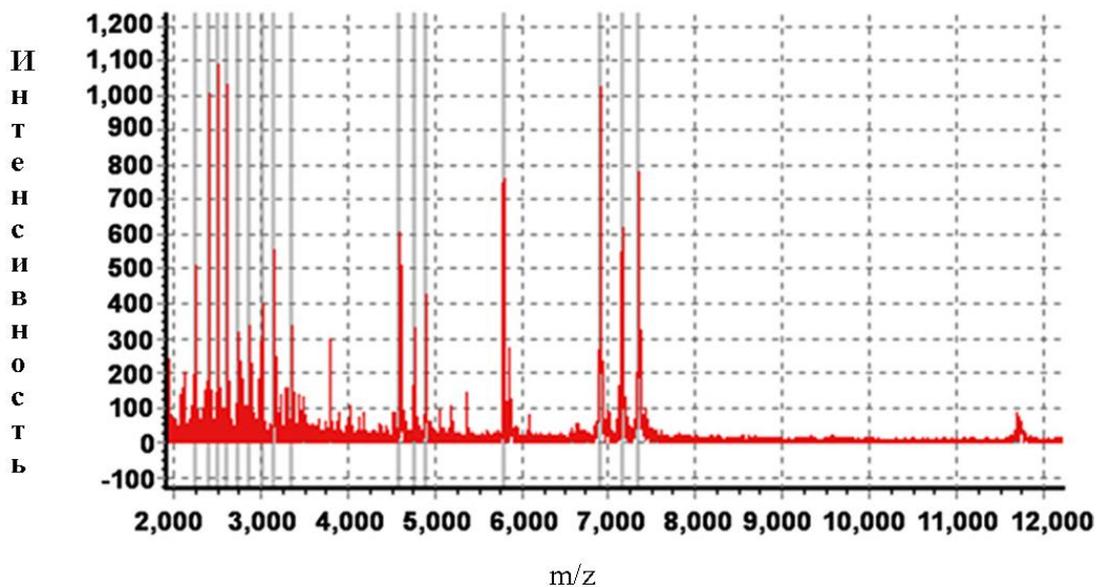


Рис.3.6. Относительное отклонение (в %) усредненной интенсивности масс-спектров у больных основной группы по сравнению с группой сравнения

Амплитуда повышения усредненной интенсивности масс-спектров у больных основной группы по сравнению с группой сравнения была наибольшей для белка SERPINA1(PRO2275) (повышение на 133%,  $p=0,002$ ), гипоксия индуцибельного фактора 1 (повышение на 126%,  $p=0,007$ ), а выраженность снижения – для F2 предшественника протромбина (снижение на 63%,  $p=0,017$ ).

Вид масс-спектра белков слюны больного из основной группы и группы сравнения представлены на рис. 3.7.



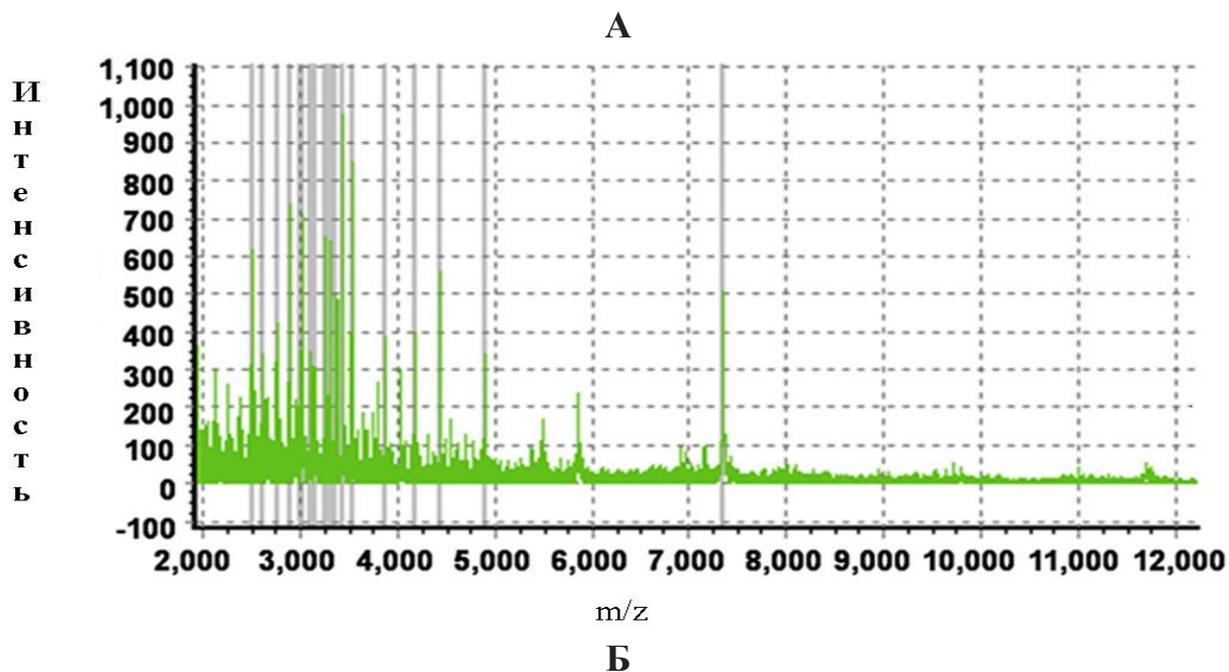


Рис.3.7 . Масс-спектры белков слюны больных раком СОПР из основной группы (А) и группы сравнения (Б).

Белок SERPINA1(PRO2275) относится к компонентам тромболитической плазминоген-плазминовой системы. Его функция заключается в ингибции тканевого и урокиназного активатора плазминогена. Если его активность повышена, как было установлено в основной группе, то это свидетельствует о снижении активности тромболитической системы и повышении риска тромбообразования (Gu Y. Z. et al., 2000).

Тромбин относится к протеазам серина с трипсиноподобной активностью, его синтез кодируется геном F2. Тромбин имеет потенциальные возможности влияния на воспаление (Brien M., 2012), поскольку координирует процессы репарации тканей путем стимуляции клеток, участвующих в заживлении раны. Тромбин активирует адгезию и агрегацию тромбоцитов, вызывает активацию эндотелиальных клеток, освобождение клетками факторов роста, адгезию лейкоцитов и их рекрутмент (преимущественно моноцитов и Т-лимфоцитов) и пролиферацию клеток эндотелия, эпителия, фибробластов, нервных клеток и гладкомышечных, взаимодействует с тучными клетками. Тромбин

рассматривают как медиатор воспаления, поскольку при действии достаточно высоких (более 10 нМ) его концентраций происходит быстрое, но кратковременное повышение проницаемости эндотелия (Brien M., 2012). Снижение F2 предшественника протромбина у больных основной группы ограничивало потенциальные возможности тромбина по его влиянию на воспаление.

Гипоксия индуцибельный фактор-1 является ключевым медиатором ответа ткани на гипоксию (Lin P.Y. et al., 2008). HIF1 $\alpha$  функционирует как активатор транскрипции при гипоксии. Связываясь с промоторами более 100 генов, регулирующих рост опухоли, фактор HIF1 $\alpha$  участвует в канцерогенезе (Eckert A.W. et al., 2012). HIF1 $\alpha$  при развитии гипоксии в опухолевой ткани стимулирует ген синтеза фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Данное обстоятельство усиливает ангиогенез и адаптацию ткани к гипоксии. Рак СОПР зачастую сопровождается быстрым и неограниченным ростом, что ведет к формированию тканевой гипоксии (Brennan P.A. et al., 2004). Кроме того, HIF-1 $\alpha$  влияет на течение воспалительного процесса (Kim S.Y. et al., 2011), регулируя синтез важных молекулярных эффекторов иммунной защиты, включая гранулированные протеазы, антимикробные пептиды, оксид азота и фактор некроза опухоли- $\alpha$ . Повышенная активность HIF-1 $\alpha$  содействует синтезу защитных факторов и увеличивает бактерицидную активность, обеспечивает способы усиления врожденных иммунных реакций на микробную, в том числе бактериальную, инфекцию. Одновременно усиление секреции HIF-1 $\alpha$  может запустить механизмы прогрессирования рака СОПР, что требует тщательного доказательства.

Таким образом, по результатам исследования зубного налета и слюны методом ПЦР в реальном времени и масс-спектрометрии развитием гнойных осложнений после хирургических вмешательств в составе комбинированного первичного лечения у больных раком СОПР

ассоциировано с наличием в зубном налете бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* в концентрациях, превышающих клинически значимую, различием интенсивности масс-спектров для белков слюны SERPINA1, F2 предшественник протромбина, гипоксия индуцибельный фактор 1.

Проведение исследования позволило сделать заключение, что развитие гнойных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР сопряжено с дальнейшим прогрессированием основного заболевания. Вероятным патогенетическим механизмом, объединяющим воспалительно-деструктивные процессы в ротовой полости и прогрессирование рака СОПР, является активация синтеза гипоксия-индуцибельного фактора 1- $\alpha$  и повышение его транскрипционной активности, что требует дальнейшего доказательства гипотезы в работе. Для профилактики прогрессирования рака СОПР на первом этапе необходимо предупредить развитие гнойных осложнений комбинированного лечения, что также требует последующей разработки специальных клинических рекомендаций в этом направлении.

## ГЛАВА 4

### ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ФАКТОРА-1 $\alpha$ НА ТЕЧЕНИЕ ОСНОВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ТРАНСКРИПЦИОННУЮ И АПОПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, НЕОАНГИОГЕНЕЗ У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

#### 4.1. Содержание гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ в гомогенате опухолевой и гистологически неизменной ткани у больных раком слизистой оболочки полости рта в зависимости от стадии и распространенности опухолевого процесса

В гомогенате гистологически неизменной ткани у больных раком СОПР содержание HIF-1 $\alpha$  в среднем составило  $5,2 \pm 2,5$  УЕ/мг белка в лунке. Медиана ряда соответствовала значению 5,1 УЕ/мг белка в лунке, 50% величин концентрации HIF-1 $\alpha$  около медианы (от 25% до 50% центиля или межквартильный диапазон) соответствовал 3,7-6,6 УЕ/мг белка в лунке (рис.4.1).

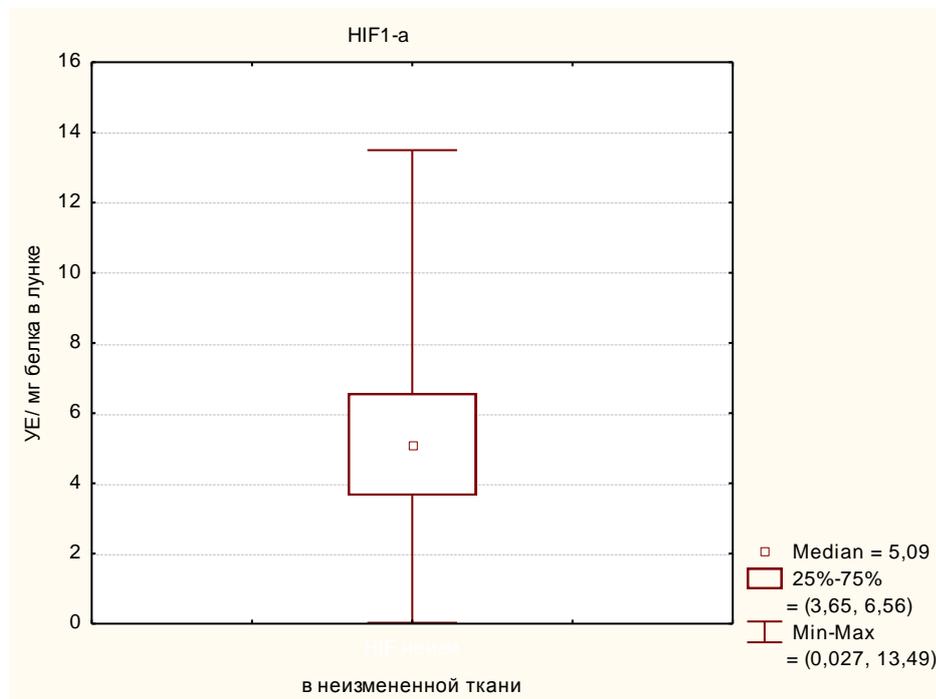


Рис.4.1. Медиана (Median), межквартильный диапазон (25%-75%) и размах (Min-Max) содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате гистологически неизменной ткани у больных раком СОПР.

Размах варьирования показателя находился в диапазоне от 0,03 до 13,5 УЕ/мг белка в лунке. Чаще всего величины содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате гистологически неизменной ткани у больных раком СОПР находились в диапазоне от 4 до 6 УЕ/мг белка в лунке (58 (35,8%) из 162 пациентов) (рис. 4.2).

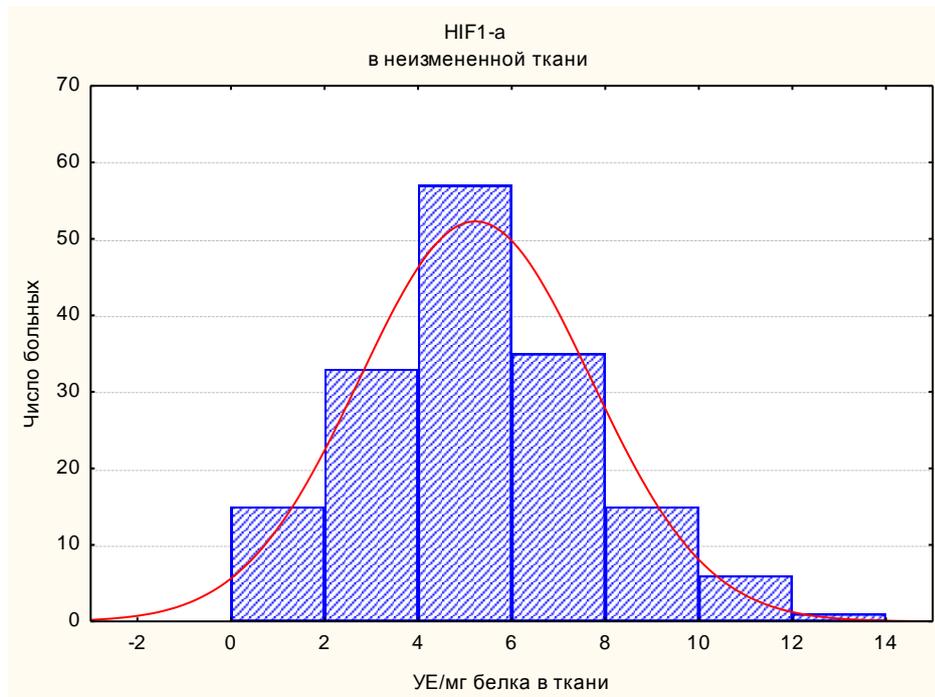


Рис.4.2. Гистограмма распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате гистологически неизменной ткани у больных раком СОПР.

В общем по группе у больных раком СОПР в опухолевом гомогенате содержание HIF-1 $\alpha$  составило в среднем  $11,5 \pm 4,2$  УЕ/мг белка в лунке, медиана соответствовала 10,9 УЕ/мг белка в лунке, а диапазон от 25% до 75% центиля ряда – 8,5-13,3 УЕ/мг белка в лунке. Различие содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате гистологически неизменной и опухолевой ткани у больных раком СОПР было статистически значимым ( $p < 0,001$ ). В опухолевой ткани содержание HIF-1 $\alpha$  было практически в 2 раза выше по сравнению с гистологически неизменной тканью, что свидетельствовало о повышенной секреции HIF-1 $\alpha$  в опухоли вследствие развивающейся гипоксии

Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли в зависимости от стадии заболевания по классификации TNM представлено в таблице 4.1.

Таблица 4.1

**Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) в зависимости от стадии заболевания по классификации TNM у больных раком СОПР**

TNM	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
T1N0M0	17	9,1	3,9	6,6	8,3	10,1
T2N0M0	35	9,6	3,9	6,9	8,4	11,8
T2N1M0	14	12,0	3,6	9,1	10,6	13,9
T2N2aM0	6	13,5	4,2	10,0	12,8	15,7
T3N0M0	19	9,4	2,7	7,1	8,4	12,3
T3N1M0	34	12,0	3,7	9,6	11,2	12,9
T3N2aM0	16	13,7	3,8	11,5	12,9	13,9
T4N1M0	9	14,2	5,4	12,3	14,5	17,8
T4N2bM1	7	15,2	1,9	13,8	15,0	15,7
T4N2cM1	5	15,6	3,1	13,0	14,9	16,8

У пациентов со стадией заболевания T1N0M0, T2N0M0 и T3N0M0 достоверных различий содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли не наблюдалось (медиана 8,3; 8,4 и 8,4 УЕ/ мг белка в лунке, соответственно). С наличием метастазирования в регионарные лимфатические узлы шеи и отдаленные регионы содержание HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли повышалось. Для статистической оценки влияния размера опухоли и распространенности опухолевого процесса, стадии заболевания и степени дифференцировки опухоли был проведен однофакторный дисперсионный анализ с расчетом непараметрического критерия Крускала-Уоллиса и его доверительной вероятности (p) ввиду неравномерного распределения числа пациентов в подгруппах и малого количества больных со стадией T4 и отдаленными метастазами. Парные сравнения между подгруппами также проводили в рамках непараметрической статистики и применения специального модуля множественного попарного сравнения.

На первом этапе оценивали влияние размера опухоли на содержание HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (табл. 4.2).

Таблица 4.2

**Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) в зависимости от размеров опухоли у больных раком СОПР**

Размер опухоли	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
T1N0M0	17	9,1	3,9	6,6	8,3	10,1
T2N0-2M0	55	10,7	4,0	7,6	10,1	12,9
T3N0-2M0	69	11,7	3,8	9,1	11,3	13,0
T4N1-2M0-1	21	14,9	3,9	12,9	14,9	16,8

У пациентов при повышении размеров опухоли от T1 до T3 медиана содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли изменялась незначительно (T1 – 8,3 УЕ/мг белка в лунке, T2 – 10,1 УЕ/мг белка в лунке и T3 – 11,3 УЕ/мг белка в лунке) (рис. 4.3) и лишь при размере T4 с прорастанием подлежащие структуры изучаемый показатель повышался до 14,9 УЕ/мг белка в лунке.

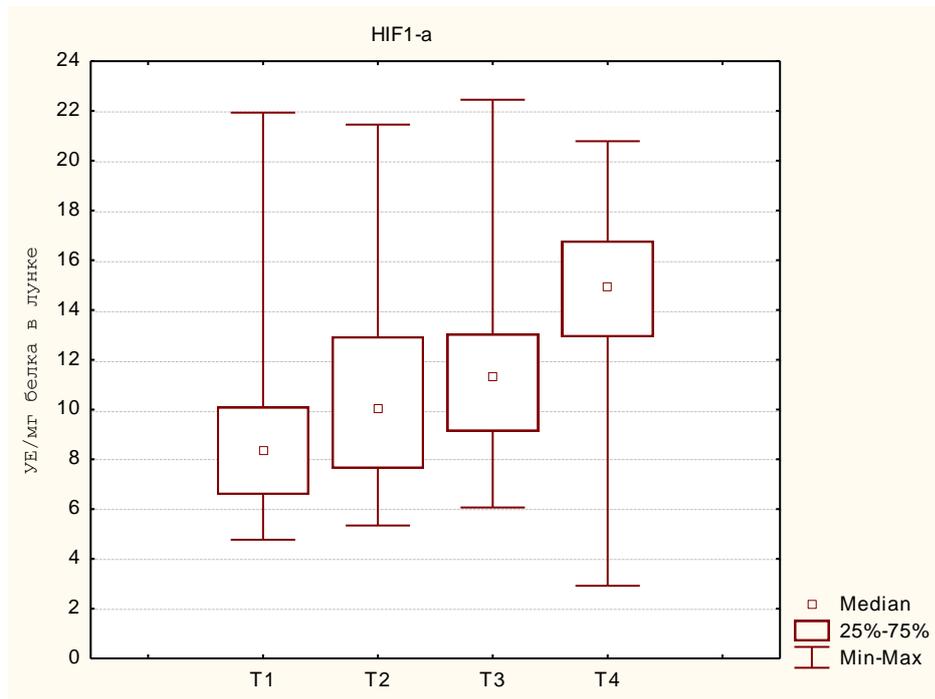


Рис.4.3. Медиана (Median), межквартильный диапазон (25%-75%) и размах (Min-Max) содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли у больных раком СОПР в зависимости от размера опухоли.

Число больных в подгруппах в зависимости от размера опухоли было неодинаковым, практически во всех подгруппах ряда распределения

показателей были асимметрично скошенными (рис.4.4), что требовало при проведении однофакторного дисперсионного анализа непараметрического подхода с применением медианного теста Крускала-Уоллиса.

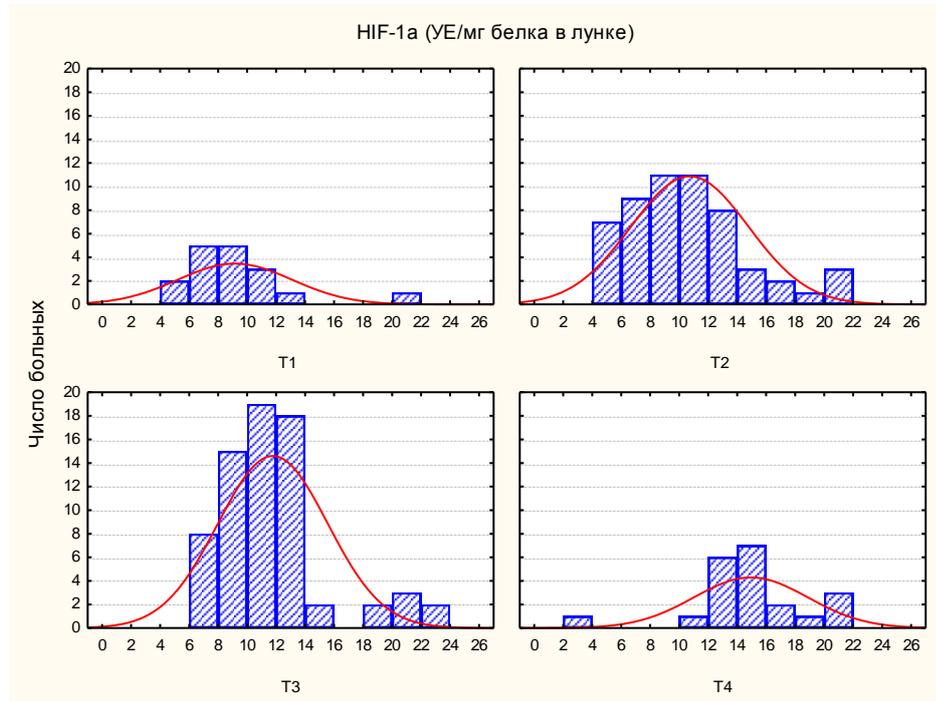


Рис.4.4. Гистограмма распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных раком СОПР с различным размером опухоли.

В результате было установлено, что содержание HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных с различным размером опухоли статистически значимо различалось (критерий Крускала-Уоллиса 19,2 при  $p < 0,001$ ), если присутствовали все четыре подгруппы – от T1 до T4. Среди трех подгрупп от T1 до T3 размер опухоли не влиял на концентрацию HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате (критерий Крускала-Уоллиса 2,3 при  $p > 0,05$ ). Результаты попарного сравнения изучаемого показателя между всеми подгруппами с отражением величины доверительной вероятности  $p$  представлены в таблице 4.3.

Статистически значимое различие HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате было установлено у пациентов подгрупп T1, T2, T3 по сравнению с больными, у которых размер опухоли был T4. Следовательно, только размер

опухоли, соответствующий T4, сопровождался резким повышением концентрации HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате.

Таблица 4.3

**Доверительная вероятность р при попарном сравнении величин HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани с учетом размеров опухоли**

Размер опухоли	T1	T2	T3
T2	0,513		
T3	0,053	0,543	
T4	<0,001	<0,001	<0,001

На следующем этапе изучали особенности распределения величин содержания HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате в зависимости от метастазирования опухоли в регионарные лимфатические узлы (табл. 4.4).

Таблица 4.4

**Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) в зависимости от поражения лимфоузлов у больных раком СОПР**

Статус лимфоузлов	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
T1-3N0M0	71	9,5	3,6	6,9	8,4	11,2
T2-4N1M0	57	12,4	4,0	9,6	11,5	13,3
T2-3N2aM0	22	13,7	3,8	11,3	12,9	14,1
T4N2bM1	7	15,2	1,9	13,8	15,0	15,7
T4N2cM1	5	15,6	3,1	13,0	14,9	16,8

При появлении метастазов в регионарных лимфоузлах, увеличении их в размерах, с повышением числа пораженных лимфоузлов отмечено одновременное возрастание содержания HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате. Медиана содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли при отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах (N0) составляла 8,4 УЕ/ мг белка в лунке, ипсилатеральном поражении единичных лимфоузлов с увеличением их размеров до 3 см (N1) – 11,5 УЕ/ мг белка в лунке, ипсилатеральном поражении единичных лимфоузлов с повышением их размеров до 3-6 см (N2a) - 12,9

УЕ/ мг белка в лунке, множественном поражении лимфоузлов с ипсилатеральной стороны и превышением размеров свыше 6 см (N2b) – 15 УЕ/ мг белка в лунке, множественном билатеральном поражении лимфоузлов и превышением размеров свыше 6 см (N2c) - 14,9 УЕ/ мг белка в лунке (рис.4.5).

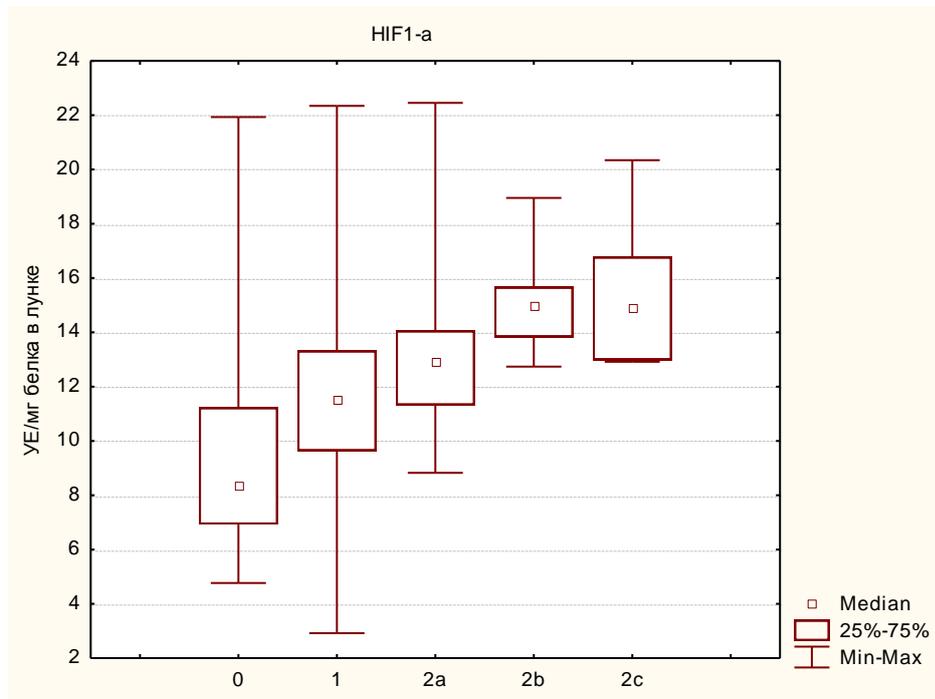


Рис.4.5. Медиана (Median), межквартильный диапазон (25%-75%) и размах (Min-Max) содержания HIF-1α в тканевом гомогенате опухоли у больных раком СОПР в зависимости от поражения лимфоузлов.

Высокий размах колебаний содержания HIF-1α в тканевом гомогенате опухоли имел место при статусе лимфоузлов N0 и N1 (рис.4.5). На гистограммах распределения значений содержания HIF-1α в гомогенате опухолевой ткани при статусе лимфоузлов N0 и N1 отмечалась асимметричная скошенность ряда, при статусе 2b (n=7) и 2c (n=5) число пациентов было единичным (рис. 4.6).

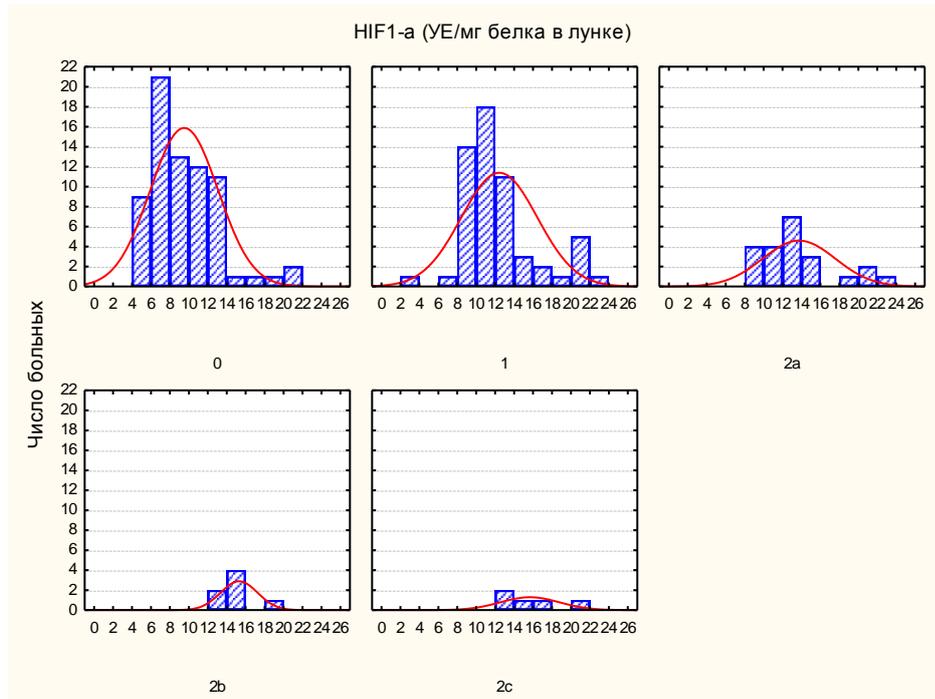


Рис.4.6. Гистограмма распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных раком СОПР в зависимости от поражения лимфоузлов.

Содержание HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных с различным статусом поражения лимфоузлов статистически значимо различалось (критерий Крускала-Уоллиса 32,1 при  $p < 0,001$ ). Результаты попарного сравнения изучаемого показателя между всеми подгруппами с отражением величины доверительной вероятности  $p$  представлены в таблице 4.5.

**Таблица 4.5**

**Доверительная вероятность  $p$  при попарном сравнении величин HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани с учетом статуса лимфоузлов**

Статус лимфоузлов	N0	N1	N2a	N2b
N1	0,00007			
N2a	0,00003	1,0		
N2b	0,0002	0,24	1,0	
N2c	0,004	0,69	1,0	1,0

Установлено достоверное отличие изучаемого показателя у больных без поражения лимфоузлов (N0) со всеми другими подгруппами (N1, N2a,

N2b, N2c). Следовательно, поражение лимфоузлов явилось фактором, достоверно ассоциированным с повышением HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани.

Из 162 больных раком СОПР отдаленные метастазы в легкие, кости скелета отмечались у 12 (7,4%) пациентов. У больных раком СОПР при наличии метастазов содержание HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли ( $14,9 \pm 3,9$  УЕ/ мг белка в лунке) было выше на 35,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с пациентами без отдаленных метастазов ( $11,0 \pm 4,0$  УЕ/ мг белка в лунке) (табл. 4.6).

**Таблица 4.6**

**Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных раком СОПР**

Отдаленные метастазы	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
0	150	11,2	4,1	8,3	10,6	12,9
1	12	15,4	2,4	13,4	15,0	16,2

Несмотря на высокий размах колебаний содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли как при наличии, так и отсутствии отдаленных метастазов, медиана и межквартильный диапазон на фоне отдаленных метастазов находились в области более высоких значений (рис.4.7).

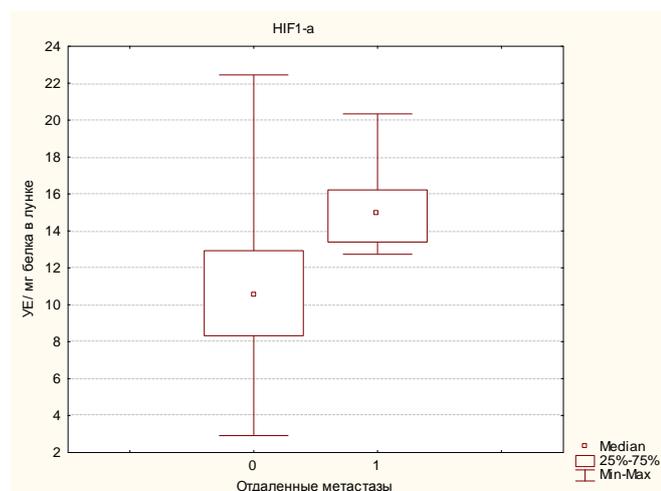


Рис.4.7. Медиана (Median), межквартильный диапазон (25%-75%) и размах (Min-Max) содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли у больных раком СОПР в зависимости от наличия отдаленных метастазов.

На гистограмме распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани при отсутствии отдаленных метастазов модальный класс приходился на диапазон 10-12 УЕ/ мг белка в лунке, а при наличии отдаленных метастазов – 14-16 УЕ/ мг белка в лунке (рис.4.8).

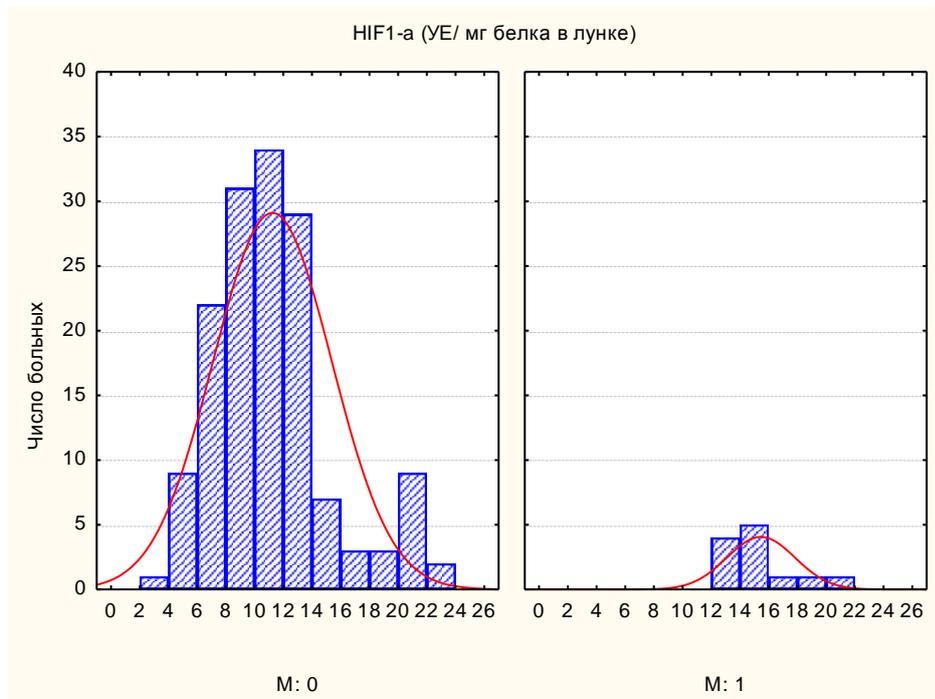


Рис.4.8. Гистограмма распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных раком СОПР в зависимости от наличия отдаленных метастазов.

Итак, у больных раком СОПР с отдаленными метастазами содержание HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани достоверно возросло по сравнению с пациентами при отсутствии отдаленного метастазирования. Содержание HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли в зависимости от стадии заболевания отражено в таблице 4.7.

**Таблица 4.7**

**Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) в зависимости от стадии заболевания у больных раком СОПР**

Стадия заболевания	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
I	17	9,1	3,9	6,6	8,3	10,1
II	35	9,6	3,9	6,9	8,4	11,8
III	67	11,3	3,6	8,9	10,6	12,8
IV	43	14,2	3,9	12,2	13,7	15,7

В I и II стадии заболевания медианы изучаемого показателя имели близкие значения (8,3 УЕ/ мг белка в лунке и 8,4 УЕ/ мг белка в лунке, соответственно) (рис.4.9). У пациентов с III стадией концентрация HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате возрастала до 10,6 УЕ/ мг белка в лунке, а при IV стадии – до 13,7 УЕ/ мг белка в лунке (рис.4.9).

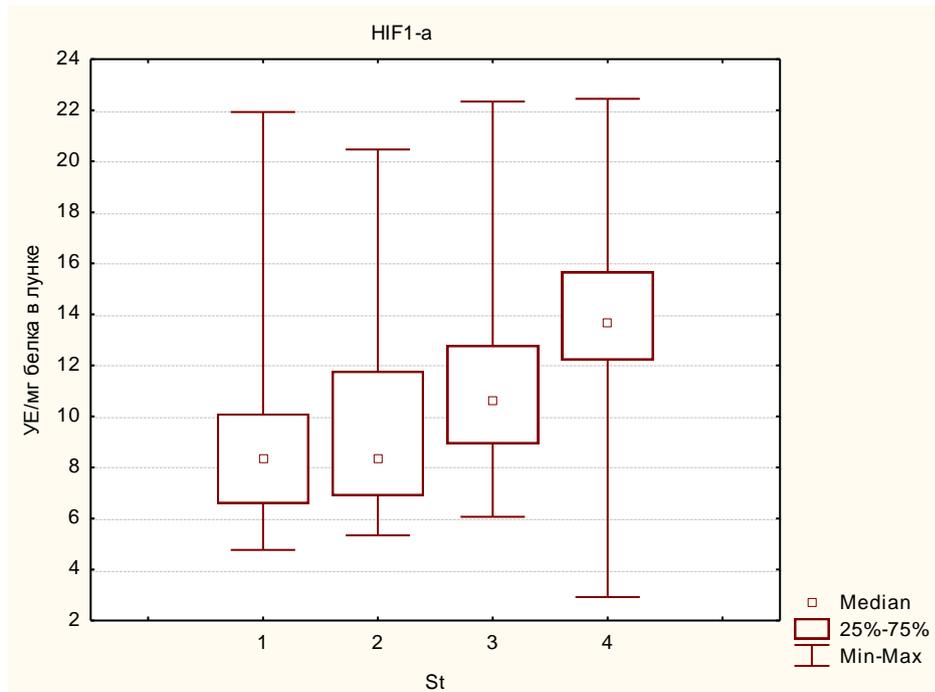


Рис.4.9. Медиана (Median), межквартильный диапазон (25%-75%) и размах (Min-Max) содержания HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли у больных раком СОПР в зависимости от стадии заболевания.

Гистограммы распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных в зависимости от стадии заболевания имели симметричный вид. Модальный класс у больных с I стадией соответствовал 6-10 УЕ/ мг белка в лунке, со II стадией – 6-8 и 10-12 УЕ/ мг белка в лунке, с III стадией – 10-12 УЕ/ мг белка в лунке и при IV стадии – 12-14 УЕ/ мг белка в лунке (рис.4.10).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали, что у пациентов с I по III стадии заболевания множественные различия по содержанию HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате отсутствовали (критерий Крускала-Уоллиса 2,1 при  $p > 0,05$ ), но при сравнительном анализе всех четырех подгрупп, включая пациентов с IV стадией, критерий Крускала-

Уоллиса (12,4) и его доверительная вероятность ( $p < 0,01$ ) свидетельствовали о значимом влиянии стадии заболевания на величину изучаемого показателя.

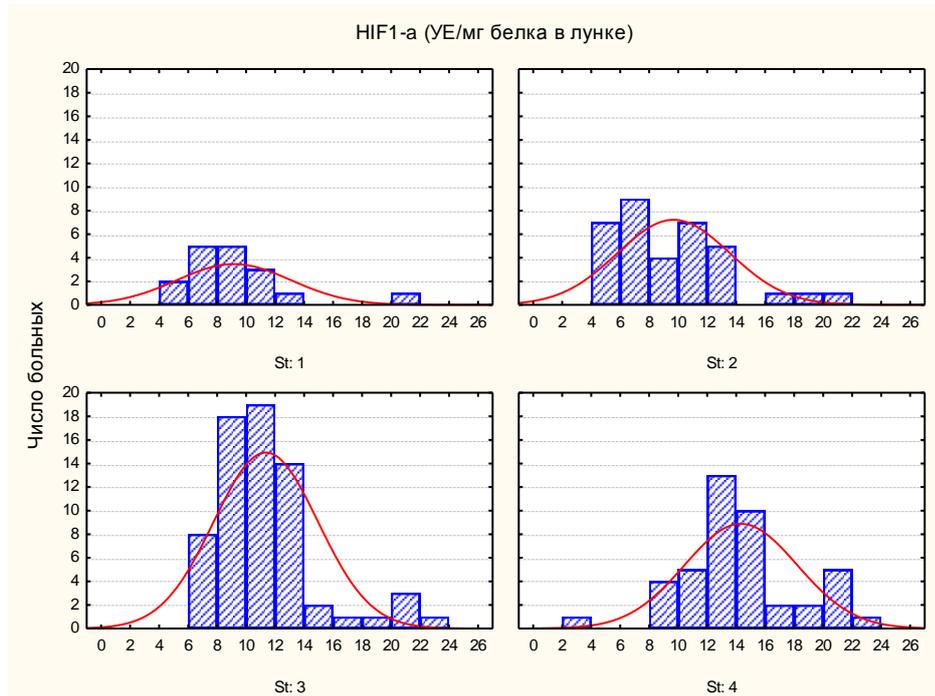


Рис. 4.10. Гистограмма распределения значений содержания HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани в подгруппах больных раком СОПР в зависимости от стадии заболевания.

Попарные сравнения позволили установить статистически значимые различия между содержанием HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани у больных с I, II, III стадиями по сравнению с пациентами с IV стадией заболевания (табл. 4.8).

**Таблица 4.8**

**Доверительная вероятность  $p$  при попарном сравнении величин HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани с учетом стадии заболевания**

Стадия заболевания	I	II	III
II	1,0		
III	0,08	0,11	
IV	0,000002	0,00001	0,0003

Таким образом, учет больных с IV стадией заболевания вносит свой решающий вклад в формирование множественных различий между подгруппами в зависимости от стадии заболевания.

Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате в зависимости от гистопатологической дифференцировки опухоли представлено в таблице 4.9.

Таблица 4.9

**Распределение величин HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/мг белка в лунке) в зависимости от гистопатологической дифференцировки опухоли у больных раком СОПР**

Степень дифференцировки	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
Высокая G1	47	8,2	2,7	6,2	8,4	10,5
Умеренная G2	96	11,5	3,8	8,9	11,8	12,6
Низкая G3	19	15,8	5,2	11,5	15,7	18,4

По мере уменьшения дифференцировки опухолевых клеток содержание HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли возрастало: при G1 –  $8,2 \pm 2,7$  УЕ/мг белка в лунке, G2 –  $11,5 \pm 3,8$  УЕ/мг белка в лунке и G3 –  $15,8 \pm 5,2$  УЕ/мг белка в лунке. В результате однофакторного дисперсионного анализа было установлено, что степень дифференцировки была сопряжена с изменением HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли: критерий Крускала-Уоллиса составил 45,6, а  $p < 0,001$ . Все попарные сравнения трех подгрупп выявили статистически значимые различия: G1-G2 ( $p=0,0002$ ), G1-G3 ( $p=0,0001$ ), G2-G3 ( $p=0,0004$ ) (табл. 4.10).

Таблица 4.10

**Доверительная вероятность p при попарном сравнении величин HIF-1 $\alpha$  в гомогенате опухолевой ткани с учетом гистопатологической дифференцировки опухоли**

Степень дифференцировки	G1	G2
G2	0,0002	1,0
G3	0,0001	0,0004

Сравнительный анализ величин критерия Крускала-Уоллиса (K-W) при оценке влияния размера опухоли (K-W=19,2), поражения лимфоузлов (K-

W=32,1), наличия отдаленных метастазов (K-W=11,5), степени гистопатологической дифференцировки опухоли (K-W=45,6) на концентрацию HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли позволили выявить, что содержание изучаемого гипоксия-индуцибельного фактора в большей мере определялось уровнем дифференцировки опухоли и метастазированием в региональные лимфоузлы и не зависело от размера опухоли и стадии заболевания у пациентов с T1-T3 и St I-III. Только присутствие пациентов с T4 и IV стадией и резкое возрастание у них концентрации HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате приводило к статистически значимому сопряжению фактора и признаков.

#### **4.2. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ в ткани рака слизистой оболочки полости рта и ее связь с клиническими характеристиками заболевания**

При исследовании опухолевой экспрессии HIF-1 $\alpha$  у больных раком СОПР количество позитивных клеток подсчитывали на 1000 клеток. Опухоли, в которых окрашенные клетки составляли 10% и более, считались позитивными по HIF-1 $\alpha$ , если менее 10% - то негативными. Ранжирование числа позитивных опухолевых клеток происходило согласно рекомендациям К. Nakanishi с соавт. (2005): 10–25% позитивных клеток — 1+ или 1 балл (слабое окрашивание); 26–50% — 2+ или 2 балла (средний уровень окрашивания); > 50% — 3+ или 3 балла (сильное окрашивание). Кроме того, проводили качественную оценку окрашивания в клетке – цитоплазматическое, ядерное или смешанный тип окрашивания.

В нормальной, гистологически неизменной слизистой оболочке полости рта экспрессия изучаемого белка не выявлялась, а в опухолевой ткани имела место в 98,8% наблюдений. Слабый уровень опухолевой экспрессии (1+) наблюдали у 42 (25,9%), средний (2++) – у 88 (54,3%) и сильное окрашивание – у 30 (18,5%) пациентов.

На рис. 4.11 представлен различный уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у пациентов раком СОПР, а также негативная экспрессия маркера в гистологически неизменной ткани.

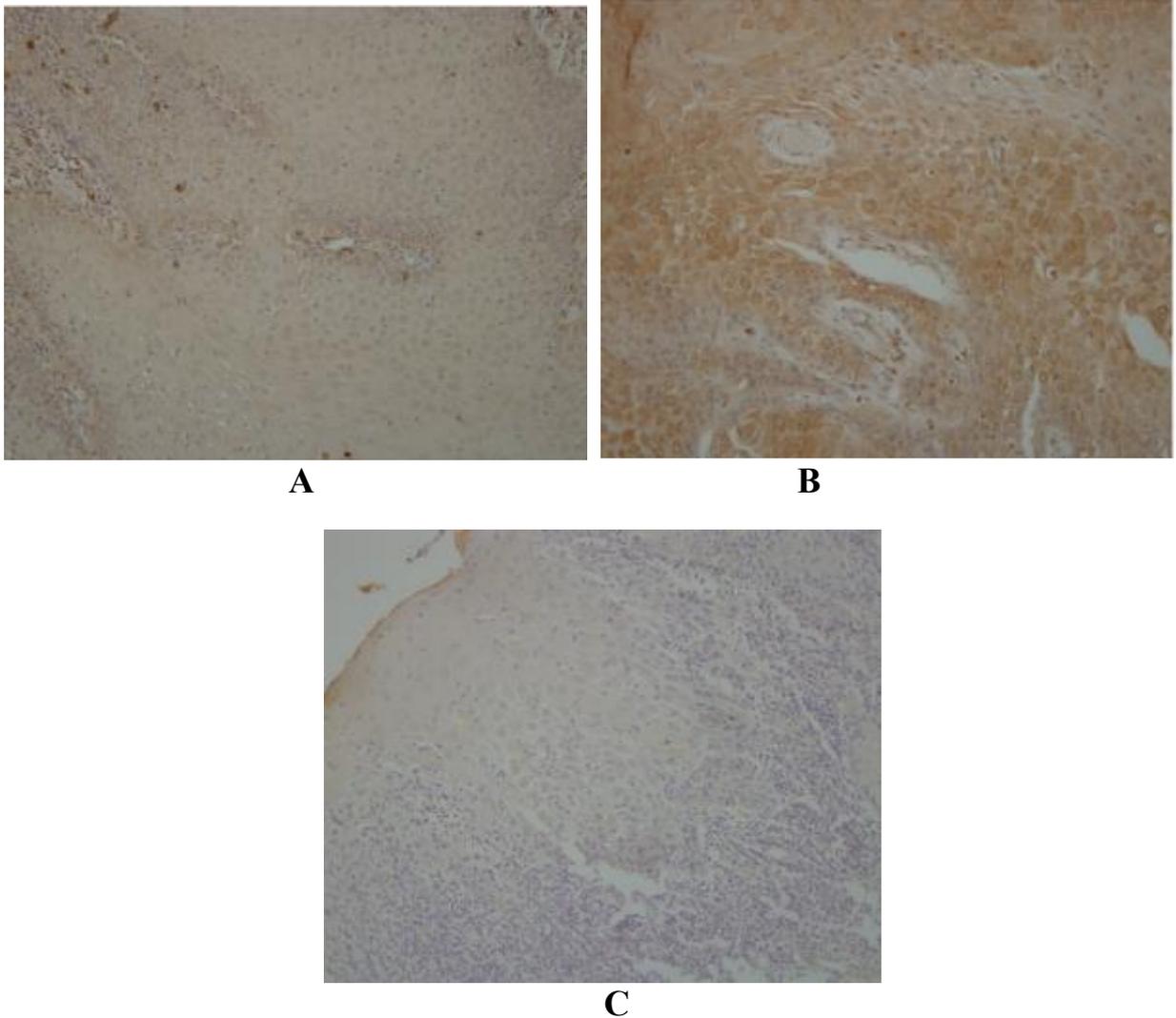


Рис. 4.11. Различный уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  у больных раком СО дна полости рта. А – низкий (1+) уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли, В – высокий уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли, С – негативный контроль. Ув. 100.

У больных при изменении размера опухоли от T1 до T4 слабый уровень экспрессии наблюдался в 47,1%, 34,6%, 20,3% и 25,9%; средний уровень – в 41,2%, 50,9%, 60,9% и 52,4%; сильная экспрессия фактора – в 5,9%, 12,7%, 18,8% и 42,9%, соответственно (табл. 4.11). Критерий сопряжения ( $\chi^2=23,3$ ) и доверительная вероятность  $p=0,005$  свидетельствовали о достоверном уровне ассоциации. Следовательно, с увеличением размера опухоли активация фактора HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках возрастала. При этом, статистически значимо возрастало число

клеток с ядерно-цитоплазматическим типом окрашивания ( $p < 0,0001$ ) (табл. 4.11).

Таблица 4.11

**Характеристика экспрессии HIF-1  $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от размера опухоли**

Размер опухоли	n	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Тип окрашивания	
		0	1+	2+	3+++	цтм	яд-цтм
T1N0M0	17	1 (5,9%)	8 (47,1%)	7 (41,2%)	1 (5,9%)	10 (58,8%)	7 (41,2%)
T2N0-2M0	55	1 (1,8%)	19 (34,6%)	28 (50,9%)	7 (12,7%)	12 (21,8%)	43 (78,2%)
T3N0-2M0	69	-	14 (20,3%)	42 (60,9%)	13 (18,8%)	5 (7,2%)	64 (92,8%)
T4N0-2M0-1	21	-	1 (4,8%)	11 (52,4%)	9 (42,9%)	-	21 (100%)
Всего	162	2 (1,2%)	42 (25,9%)	88 (54,3%)	30 (18,5%)	27 (16,7%)	135 (83,3%)
p ( $\chi^2$ )		p=0,005 ( $\chi^2=23,3$ )				p<0,0001 ( $\chi^2=31,4$ )	

При прорастании рака СОПР в соседние органы (T4) ядерное и цитоплазматическое окрашивание антителами к HIF-1 $\alpha$  встречалось в 100% наблюдений. На рис. 4.12 представлены результаты оценки экспрессии HIF-1 $\alpha$  в эпителии рака СОПР с прорастанием в соседние органы. Отчетливо видно окрашивание ядер и цитоплазмы опухолевых клеток. Локализация экспрессии HIF-1 $\alpha$  в клетке имеет принципиальное значение. При проведении иммуногистохимического исследования белок HIF-1 $\alpha$  в нормальных условиях обнаруживается на очень низком уровне в цитоплазме. Во время гипоксии либо при активации фактора другими транскрипционными молекулами (например NF-kB) HIF1 $\alpha$  стабилизируется и перемещается к ядру. При транспортировке в ядро HIF1 $\alpha$  играет роль транскрипционного фактора. Таким образом, при постановке иммуногистохимической реакции с антителами против HIF1 $\alpha$  можно увидеть начальное прокрашивание цитоплазмы, окрашивание ядра, но можно также заметить выраженное окрашивание ядра и слабое окрашивание цитоплазмы, являющееся результатом деградации HIF1 $\alpha$  в образцах. Локализация

экспрессии HIF1 $\alpha$  в ядре является свидетельством транскрипционной активности фактора, только в цитоплазме – начальным этапом проникновения фактора в клетку.

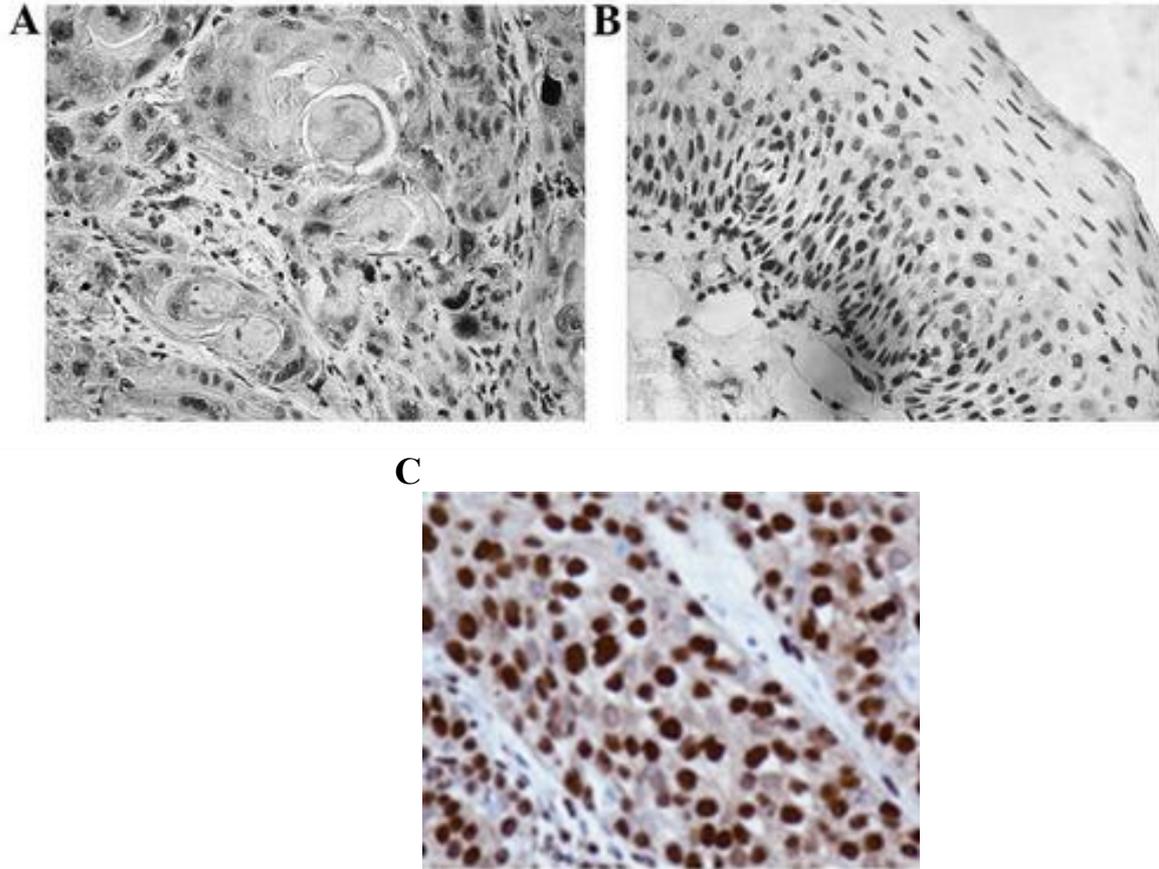


Рис. 4.12. Цитоплазматическое и ядерное окрашивание опухолевых клеток при прорастании рака СОПР в глотку. А – экспрессия HIF-1 $\alpha$  опухолевых клеток при прорастании в глотку, В - нормальный эпителий глотки с отсутствием экспрессии HIF-1 $\alpha$ , С – экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках рака СО дна ПР. Ув.400.

Отдельно нами была проведена оценка достоверности сопряжения изменения размера опухоли от T1 до T3 и активации фактора HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках. В результате было установлено, что при увеличении размера опухоли при раке СОПР от T1 до T3 повышение количества клеток с экспрессией и гиперэкспрессией HIF1 $\alpha$  было статистически незначимым. Критерий сопряжения Хи квадрат Пирсона составил 10,7 при  $p=0,09$ . Таким образом, только при наличии параметров пациентов со всеми стадиями рака по размеру опухоли (T1-T4) происходит формирование достоверного сопряжения между размером опухоли и увеличением числа клеток с

позитивной экспрессией HIF1 $\alpha$ . Между тем, ассоциация повышения размера опухоли от T1 до T3 и количества клеток с ядерно-цитоплазматическим окрашиванием, а значит активацией транскрипционной активности HIF1 $\alpha$  присутствовала с высокой достоверной значимостью ( $p=0,002$ ).

Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от метастатического поражения лимфоузлов представлена в таблице 4.12.

**Таблица 4.12**

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от метастатического поражения лимфоузлов**

Статус лимфоузлов	n	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Тип окрашивания	
		0	1+	2+	3+++	цтм	яд-цтм
T1-3N0M0	71	2 (2,8%)	31 (43,7%)	31 (43,7%)	7 (9,9%)	22 (41%)	49 (69%)
T2-4N1M0	57	-	10 (17,5%)	34 (59,7%)	13 (22,8%)	5 (8,8%)	52 (91,2%)
T2-3N2aM0	22	-	1 (4,6%)	16 (72,7%)	5 (22,7%)	-	22 (100%)
T4N2bM1	7	-	-	3 (42,9%)	4 (57,1%)	-	7 (100%)
T4N2cM1	5	-	-	4 (80%)	1 (20%)	-	5 (100%)
p ( $\chi^2$ )		p=0,0003 ( $\chi^2=35,9$ )				p<0,0001 ( $\chi^2=41,9$ )	

При наличии регионарного метастазирования в лимфоузлы у больных раком СОПР в опухолях резко возрастало число клеток с экспрессией HIF1 $\alpha$  ( $p=0,0003$ ), а также число клеток с ядерно-цитоплазматическим окрашиванием ( $p<0,0001$ ). Сопряжение между этими двумя признаками было статистически значимым. Таким образом, проникновение HIF1 $\alpha$  в клетку, транслокация в ядро и активация транскрипционных свойств фактора сопровождалось лимфогенным метастазированием при раке СОПР.

Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от присутствия отдаленного метастазирования представлена в таблице 4.13.

Таблица 4.13

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от отдаленного метастазирования**

Отдаленные метастазы	n	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Тип окрашивания	
		0	1+	2+	3+++	цтм	яд-цтм
M0	150	2 (1,3%)	42 (28%)	81 (54%)	25 (16,7%)	27 (18%)	123 (82%)
M1	12	-	-	7 (58,3%)	5 (41,7%)	-	12 (100%)
p ( $\chi^2$ )		p=0,06 ( $\chi^2=7,3$ )				p=0,28 ( $\chi^2=1,16$ )	

Анализ полученных результатов позволил установить, что несмотря на тенденцию к повышению числа клеток с позитивной экспрессией HIF1 $\alpha$  при наличии отдаленных метастазов у больных раком СОПР, статистически значимого сопряжения между признаками выявить не удалось (p=0,06). Объяснением этому факту вероятно служит малое количество больных в группе с отдаленными метастазами рака СОПР виду редкой их встречаемости. С повышением стадии заболевания, связанной с изменением размеров опухоли и метастазированием, экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани достоверно возрастала (p=0,001).

Таблица 4.14

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от стадии заболевания**

Стадия заболевания	n	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Тип окрашивания	
		0	1+	2+	3+++	цтм	яд-цтм
I	17	1 (5,9%)	8 (47,1%)	7 (41,2%)	1 (5,9%)	10 (58,8%)	7 (41,2%)
II	35	1(2,9%)	16 (45,7%)	15 (42,9%)	3 (8,6%)	10 (28,6%)	25 (71,4%)
III	67	-	16 (23,9%)	39 (58,2%)	12 (17,9%)	7 (10,4%)	60 (89,6%)
IV	43	-	2 (4,7%)	27 (62,8%)	14 (32,6%)	-	43 (100%)
p ( $\chi^2$ )	162	p=0,001 ( $\chi^2=23,3$ )				p<0,0001 ( $\chi^2=35,8$ )	

Однако, при повышении стадии заболевания от I к III ассоциация с повышенным числом опухолевых клеток, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$ , была статистически незначимой ( $p=0,08$  при  $\chi^2=11,3$ ).

У пациентов с раком СОПР была установлена достоверная зависимость увеличения выраженности экспрессии HIF1 $\alpha$  опухолевыми клетками при снижении дифференцировки от G1 к G3 ( $p<0,0001$ ) (табл. 4.15).

**Таблица 4.15**

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных раком СОПР в зависимости от гистопатологической дифференцировки опухоли**

Степень дифференцировки	n	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Тип окрашивания	
		0	1+	2+	3+++	цтм	яд-цтм
G1	47	1 (2,1%)	27 (57,4%)	13 (27,7%)	6 (12,8%)	27 (57,4%)	20 (42,6%)
G2	96	1 (1%)	13 (13,5%)	70 (72,9%)	12 (12,5%)	-	96 (100%)
G3	19	-	2 (10,5%)	5 (26,3%)	12 (63,2%)	-	19 (100%)
$p(\chi^2)$		$p<0,0001$ ( $\chi^2=64,2$ )					

На рис. 4.13 продемонстрировано, что по мере снижения дифференцировки опухолевых клеток от G1 к G3 экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани возрастала.

Результаты оценки ранговой корреляционной связи по Спирмену между клиническими характеристиками рака СОПР и экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках представлены в таблице 4.16. Проведенный корреляционный анализ позволил установить, что экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках находилась в статистически значимой взаимосвязи с размерами опухоли, лимфогенным метастазированием, отдаленным метастазированием и дифференцировкой опухолевых клеток.

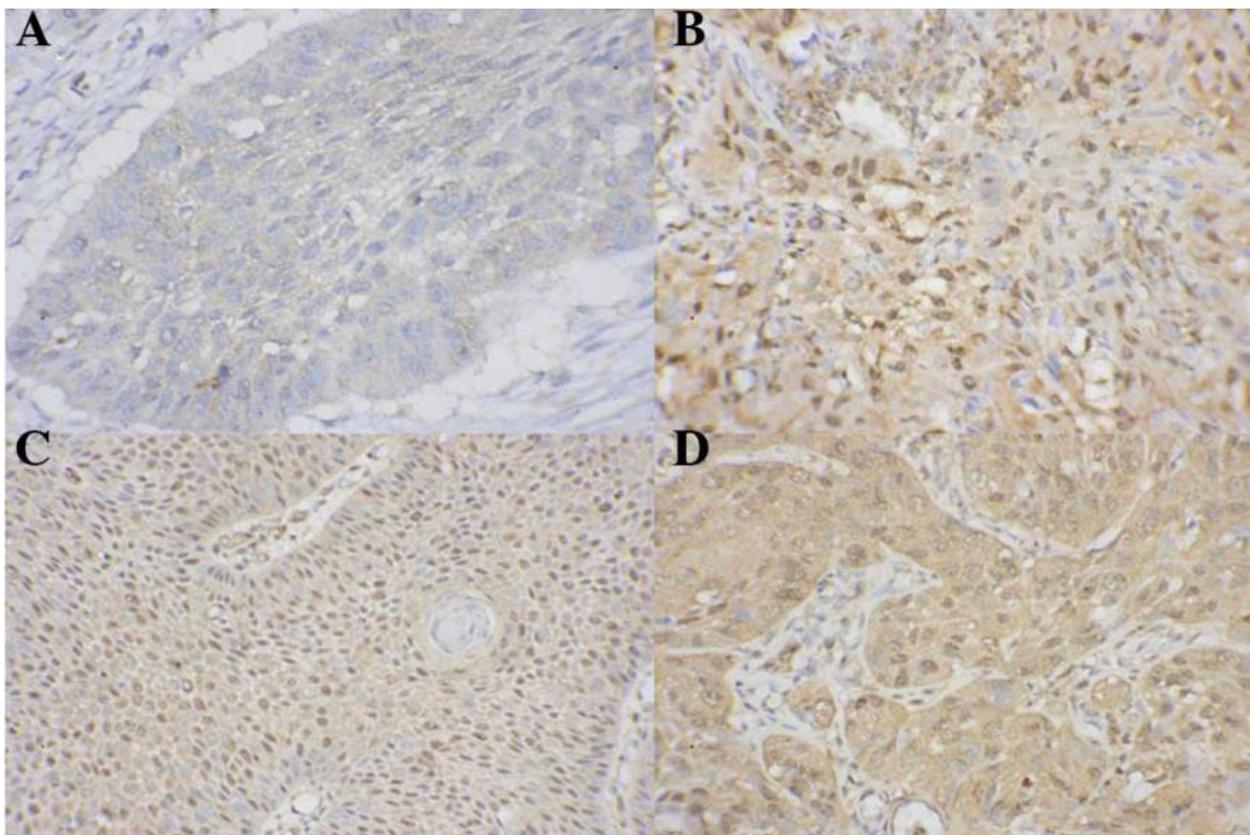


Рис.4.13. Различный уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  у больных раком языка в зависимости от гистопатологической дифференцировки опухоли.

А – гистологически неизменная ткань с негативным контролем экспрессии (x100), В – опухоль с высокой степенью дифференцировки G1 (x100), С - опухоль с умеренной степенью дифференцировки G2 (x40), D - опухоль с низкой степенью дифференцировки G3 (x100).

**Таблица 4.16**

**Результаты оценки ранговой корреляционной связи между клиническими характеристиками рака СОПР и экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках**

Показатель 1	Показатель 2	R	p
Размер опухоли	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	0,34	0,0001
Статус лимфоузлов N0-N2	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	0,40	<0,0001
Отдаленные метастазы	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	0,21	0,007
Дифференцировка G1-G3	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	0,44	<0,0001

Примечание: R – ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

Итак, у больных раком СОПР повышение числа опухолевых клеток с позитивной экспрессией HIF-1 $\alpha$ , транслокация гипоксия-индуцибельного фактора в ядро и его транскрипционная активность находилась в наиболее тесной связи с лимфогенным метастазированием, снижением степени дифференцировки клеток. Сопряжение размеров опухоли, стадии заболевания и экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках было статистически значимым лишь в присутствии пациентов с раком СОПР T1-T4 и I-IV и уступало выраженности ассоциации с опухолевым поражением лимфоузлов и дифференцировкой.

#### **4.3. Взаимосвязь экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ с активностью транскрипционных, апоптических, ростовых, антимикробных и провоспалительных факторов у больных раком слизистой оболочки ротовой полости**

В результате исследования экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР было установлено, что от локализации фактора внутри клетки (в цитоплазме либо в ядре) зависит размер опухоли, стадия заболевания, способность к лимфогенному метастазированию. Ранее в работе Ryu M.H. et al., 2010, было установлено, что условием для активации посредством гипоксия-индуцибельного фактора других транскрипционных молекул, способствующих делению опухолевых клеток, является проникновение фактора в ядро. В связи с этим, на следующем этапе исследования была изучена связь экспрессии HIF-1 $\alpha$  и ядерных факторов транскрипции семейства NF- $\kappa$ B. Как известно, опережающее накопление NF- $\kappa$ B p65 по сравнению с NF- $\kappa$ B p50 с повышением индекса NF- $\kappa$ B p65/ NF- $\kappa$ B p50 свидетельствует о повышении транскрипционной активности фактора NF- $\kappa$ B, который прямо или опосредованно модулирует экспрессию около двухсот генов, контролирующих клеточное деление, апоптоз, неоангиогенез и инвазию – основополагающие процессы канцерогенеза (Чойнзонов Е.Л. с соавт., 2013). Кроме того, активному протеканию неоангиогенеза в

опухолевой ткани способствует ростовой фактор VEGF, от экспрессии которого через образование новых сосудов и усиленное кровоснабжение напрямую зависит прогрессирование опухоли – региональное лимфогенное и отдаленное метастазирование (Su Y. et al., 2006). В связи с этим, в нашу задачу входила оценка взаимосвязи HIF-1 $\alpha$  с содержанием в гомогенате VEGF-A.

Содержание транскрипционных факторов NF-kB и ростового фактора VEGF-A в гомогенате гистологически неизменной ткани у больных раком СОПР представлено в таблице 4.17. а в опухолевом гомогенате – в таблице 4.18.

**Таблица 4.17**

**Содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате гистологически неизменной ткани у больных раком слизистой оболочки ротовой полости**

Параметр	M $\pm$ s	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
HIF-1 $\alpha$ , УЕ/мг белка в лунке	5,2 $\pm$ 2,5	5,1	3,7	2,5
NF-kB p50, УЕ/мг белка в лунке	3,6 $\pm$ 1,6	3,8	2,4	5,3
NF-kB p65, УЕ/мг белка в лунке	2,0 $\pm$ 0,9	2,2	1,1	3,2
Коэффициент NF-kB p65/p50	0,61 $\pm$ 0,06	0,57	0,45	0,73
VEGF-A, пг/мг	54,2 $\pm$ 7,8	55,9	45,2	62,3

В опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной тканью содержание HIF-1 $\alpha$  возросло в 2,2 раза (p<0,05), NF-kB p50 – в 3 раза (p<0,05), NF-kB p65 – в 6 раз (p<0,05), VEGF-A – в 1,5 раза (p<0,05). Повышение коэффициента NF-kB p65/p50 для опухолевой ткани свидетельствовало о преобладании активированных форм NF-kB.

Следовательно, в опухоли активность транскрипционных и ростовых факторов повышалась.

Таблица 4.18

**Содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных раком слизистой оболочки ротовой полости**

Параметр	M±s	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
HIF-1 $\alpha$ , УЕ/мг белка в лунке	11,5±4,2	10,9	8,5	13,3
NF-kB p50, УЕ/мг белка в лунке	10,7±3,4	10,2	7,8	15,2
NF-kB p65, УЕ/мг белка в лунке	12,1±3,8	12,5	8,7	16,1
Коэффициент NF-kB p65/p50	1,17±0,15	1,12	0,92	1,28
VEGF-A, пг/мг	82,6±5,7	83,2	75,4	89,2

Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p50 в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР с различным клиническим статусом показали, что взаимосвязь между изучаемыми факторами усиливалась при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток (табл. 4.19).

Таблица 4.19

**Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p50 в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР с различным клиническим статусом**

Статус	Показатель 1	Показатель 2	R	p
T1-2	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p50	0,11	0,35
T3-4	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p50	0,34	0,04
N0	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p50	0,18	0,21
N1-2	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p50	0,52	0,0001
G1-2	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p50	0,38	0,02
G3	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p50	0,56	<0,0001

Корреляционная связь между содержанием HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p50 в опухолевом гомогенате была наибольшей у больных с низкой степенью дифференцировки G3 (R=0,56 при p<0,0001) и при опухолевом поражении лимфоузлов (R=0,53 при p=0,0001). Известно, что в неизменной ткани ядерный фактор транскрипции NF-kB находится в цитоплазме в неактивном состоянии в ассоциации с ингибитором (Спирина Л.В. с соавт., 2010), что объясняет его низкую активность. Наличие статистической взаимосвязи между HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p50 свидетельствовало о совместной активации двух транскрипционных факторов при развитии и прогрессии рака СОПР.

Структура корреляционной связи между HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p65 в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР повторяла характеристики связи между HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p50 (табл. 4.20). Однако, связь между HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p65 была менее тесной, чем между HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p50. Вероятно, причиной этому послужило несоответствие между градиентом роста HIF-1 $\alpha$ , NF-kB p50 и NF-kB p65 по мере развития и прогрессии рака СОПР.

**Таблица 4.20**

**Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p65 в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР с различным клиническим статусом**

Статус	Показатель 1	Показатель 2	R	p
T1-2	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p65	0,23	0,58
T3-4	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p65	0,31	0,03
N0	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p65	0,21	0,27
N1-2	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p65	0,40	0,002
G1-2	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p65	0,44	0,03
G3	HIF-1 $\alpha$	NF-kB p65	0,47	<0,0001

Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  и VEGF-A в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР с различным клиническим статусом представлены в таблице 4.21. У больных раком СОПР статистически значимая связь между изучаемыми показателями была

установлена при больших размерах опухоли T3-T4 ( $R=0,39$  при  $p=0,03$ ), опухолевом поражении лимфоузлов ( $R=0,62$  при  $p<0,0001$ ) и при снижении дифференцировки опухолевых клеток (при G1-2  $R=0,31$ ,  $p=0,03$ , а при G3 -  $R=0,42$  при  $p=0,004$ ). Наиболее выраженная взаимосвязь между HIF-1 $\alpha$  и VEGF-A была установлена при метастазировании в лимфоузлы, что подтверждает факт последовательной активации HIF-1 $\alpha$ , а затем VEGF-A для регулирования неоангиогенеза (De Lima P.O. et al., 2014).

**Таблица 4.21**

**Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  и VEGF-A в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР с различным клиническим статусом**

Статус	Показатель 1	Показатель 2	R	p
T1-2	HIF-1 $\alpha$	VEGF-A	0,12	0,37
T3-4	HIF-1 $\alpha$	VEGF-A	0,39	0,03
N0	HIF-1 $\alpha$	VEGF-A	0,25	0,32
N1-2	HIF-1 $\alpha$	VEGF-A	0,62	<0,0001
G1-2	HIF-1 $\alpha$	VEGF-A	0,31	0,03
G3	HIF-1 $\alpha$	VEGF-A	0,42	0,004

Экспериментальные данные на лабораторных животных позволили установить, что одним из факторов, стабилизирующих HIF-1 $\alpha$  и ограничивающих транслокацию HIF-1 $\alpha$  в ядро, является лактоферрин (ЛФ) (Захарова Е.Т. с соавт., 2012). На клеточных линиях, выделенных из опухоли шеи и головы, было показано, что ЛФ блокирует G1 и S стадии клеточного цикла опухолевой клетки, индуцирует процессы апоптоза в раковых клетках (Xiao Y. et al., 2004). Механизм ингибирующего влияния ЛФ на пролиферацию опухолевых клеток определяется лактоферрин-опосредуемой индукцией синтеза белковых ингибиторов клеточного цикла p21 и p27 через митоген активирующий протеинкиназный (Damien E. et al., 1999; Xiao Y. et al., 2004). Клинические исследования подтверждают экспериментальные результаты (Fujita K. et al., 2004, 2004a).

Первое предположение о возможной антиканцерогенной активности ЛФ было высказано после того, как было установлено, что в опухолевых клетках ген лактоферрина не экспрессируется или вообще отсутствует (Panella T.J. et al., 1991; Siebert P.D. et al., 1997; Teng C. et al., 2004). Подавление ЛФ процессов канцерогенеза и последующего метастазирования некоторые авторы связывают с индукцией синтеза интерлейкина-18 эпителиальными клетками, что сопровождается изменением уровня экспрессии генов провоспалительных факторов, включая, интерферон- $\gamma$  (Iigo M. et al., 2004). Помимо этого, стимуляция ЛФ синтеза интерлейкина-18 в плазме крови приводит к блокированию эндотелиальных факторов роста, что может объяснить подавление лактоферрином ангиогенеза вокруг опухолевых клеток (Shimamura M. et al., 2004). Однако, существуют и альтернативные сведения, свидетельствующие, что ИЛ-18 может способствовать активации ядерных факторов транскрипции NF- $\kappa$ B в опухолевых клетках (Zandi E. et al., 1999). В связи с актуальной задачей поиска механизмов влияния на активацию транскрипционных и ростовых факторов при раке СОПР, нами было изучено содержание ЛФ и ИЛ-18 в ротовой жидкости (табл. 4.22) и их взаимосвязь с опухолевой экспрессией HIF-1 $\alpha$  (табл. 4.23-4.4).

**Таблица 4.22**

**Содержание лактоферрина и интерлейкина-18 в ротовой жидкости у больных раком слизистой оболочки ротовой полости**

Параметр	M $\pm$ s	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
ЛФ, мкг/дл	2,6 $\pm$ 1,73	2,5	1,8	3,9
ИЛ-18, пг/мл	33,6 $\pm$ 4,28	30,8	23,3	46,8

В ротовой жидкости у больных раком СОПР по сравнению со здоровыми донорами содержание ЛФ было выше в 8,4 раза (2,6 $\pm$ 0,73 мкг/дл против 0,31 $\pm$ 0,08 мкг/дл), а ИЛ-18 – в 3,1 раза (33,6 $\pm$ 4,28 пг/мл против 10,9 $\pm$ 2,5 пг/мл). Установленное различие между пациентами клинической группы и здоровыми донорами было достоверным (p<0,05).

Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и ЛФ ротовой жидкости (табл. 4.23) позволили выявить достоверный уровень связи вне зависимости от размеров опухоли, метастазирования в лимфоузлы и степени дифференцировки. Однако, при повышении размеров опухоли, и особенно, при поражении регионарных лимфоузлов связь между HIF-1 $\alpha$  и ЛФ усиливалась.

**Таблица 4.23**

**Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и ЛФ ротовой жидкости у больных раком СОПР с различным клиническим статусом**

Статус	Показатель 1	Показатель 2	R	p
T1-2	HIF-1 $\alpha$	ЛФ	0,32	0,02
T3-4	HIF-1 $\alpha$	ЛФ	0,43	0,002
N0	HIF-1 $\alpha$	ЛФ	0,31	0,01
N1-2	HIF-1 $\alpha$	ЛФ	0,51	<0,001
G1-2	HIF-1 $\alpha$	ЛФ	0,46	<0,001
G3	HIF-1 $\alpha$	ЛФ	0,48	<0,001

Стабилизация HIF-1 $\alpha$  заключается в ограничении транспорта гипоксия-зависимого фактора в ядро. Изучение влияния уровня ЛФ в ротовой жидкости на локализацию экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках у больных раком СОПР (табл. 4.24) позволило выявить статистически значимое сопряжение: чем выше содержание ЛФ в ротовой жидкости, тем более ограничивается транспорт HIF-1 $\alpha$  в ядро опухолевой клетки. Следовательно, одним из механизмов стабилизации HIF-1 $\alpha$  и ограничением транскрипционной активности фактора является повышение уровня ЛФ в биологических средах.

Таблица 4.24

**Сопряжение между содержанием ЛФ в ротовой жидкости и локализацией экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках у больных раком СОПР**

Содержание ЛФ в ротовой жидкости	Локализация экспрессии HIF-1 $\alpha$		n
	цитоплазма	ядро-цитоплазма	
Выше медианы (2,5 мкг/дл)	25 (30,5%)	57 (69,5%)	82
Ниже медианы (2,5 мкг/дл)	2 (2,5%)	78 (97,5%)	80
p ( $\chi^2$ )	p<0,001 ( $\chi^2=20,9$ )		162

Оценка корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и ИЛ-18 ротовой жидкости у больных раком СОПР (табл. 4.25) выявила меньшую выраженность взаимосвязи между признаками по сравнению с HIF-1 $\alpha$  и ЛФ. Так, достоверная связь между HIF-1 $\alpha$  и ИЛ-18 была установлена у больных со стадией T3-T4 (R=0,29 при p=0,04) и при наличии метастазирования в лимфоузлы (R=0,30 при p=0,04).

Таблица 4.25

**Результаты оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и ИЛ-18 ротовой жидкости у больных раком СОПР с различным клиническим статусом**

Статус	Показатель 1	Показатель 2	R	p
T1-2	HIF-1 $\alpha$	ИЛ-18	0,13	0,32
T3-4	HIF-1 $\alpha$	ИЛ-18	0,29	0,04
N0	HIF-1 $\alpha$	ИЛ-18	0,16	0,13
N1-2	HIF-1 $\alpha$	ИЛ-18	0,30	0,04
G1-2	HIF-1 $\alpha$	ИЛ-18	0,21	0,08
G3	HIF-1 $\alpha$	ИЛ-18	0,22	0,06

Таким образом, продукция ИЛ-18 играла меньшее влияние на экспрессию HIF-1 $\alpha$  по сравнению с секрецией ЛФ.

Апоптоз или программированная клеточная гибель является фактором, способным ограничивать пролиферативную активность опухолевых клеток. Высокая интенсивность апоптоза может привести к стабилизации онкологического заболевания (Soengas M.S. et al., 1999). К проапоптотическим факторам относят антигены *bax*, в связи с чем определение их тканевой экспрессии отражает активность апоптоза (Ebrahimi M. et al., 2008). Иммуногистохимическое исследование позволило выявить статистически значимое сопряжение ( $p < 0,001$ ) между экспрессией гипоксия-зависимого фактора и интенсивностью апоптоза (табл. 4.26).

Таблица 4.26

**Сопряжение между экспрессией HIF-1 $\alpha$  и *bax* в опухолевых клетках у больных раком СОПР**

Параметр	Уровень экспрессии				Количество позитивно окрашенных клеток, %
	0 (0-10%)	1+ (10-25%)	2++ (25-50%)	3+++ (более 50%)	
Экспрессия HIF-1 $\alpha$ в опухолевой ткани	2 (1,2%)	42 (25,9%)	88 (54,3%)	30 (18,5%)	41,3 $\pm$ 5,4
Экспрессия <i>bax</i> в опухолевой ткани	39 (24,1%)	36 (22,2%)	56 (34,6%)	31 (19,1%)	39,8 $\pm$ 3,8
$p (\chi^2)$	$p < 0,001 (\chi^2 = 40,9)$				$> 0,05$

Результаты оценки ранговой корреляционной связи между опухолевой экспрессией HIF-1 $\alpha$  и *bax* у больных раком СОПР (табл. 4.27) позволили выявить, что повышение экспрессии HIF-1 $\alpha$  способствовало усилению экспрессии проапоптотического фактора *bax* только при небольших размерах опухоли (T1-T2) и при отсутствии поражения лимфоузлов, то есть в начальные стадии заболевания.

Таблица 4.27

**Результаты оценки ранговой корреляционной связи между опухолевой экспрессией HIF-1 $\alpha$  и вах у больных раком СОПР с различным клиническим статусом**

Статус	Показатель 1	Показатель 2	R	p
T1-2	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	Экспрессия вах	0,47	0,001
T3-4	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	Экспрессия вах	0,02	0,84
N0	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	Экспрессия вах	0,31	0,04
N1-2	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	Экспрессия вах	0,08	0,75
G1-2	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	Экспрессия вах	0,23	0,58
G3	Экспрессия HIF-1 $\alpha$	Экспрессия вах	0,07	0,62

Таким образом, HIF-1 $\alpha$  является проапоптотическим фактором только при начальных стадиях рака СОПР.

Итак, гипоксия-индуцибельный фактор-1 $\alpha$  можно отнести к транскрипционным, способствующим активации ядерного фактора транскрипции NF-kB при раке СОПР. Наиболее тесно взаимосвязь между транскрипционными факторами была выражена при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток. HIF-1 $\alpha$  также можно отнести к проангиогенным факторам за счет прямой связи с экспрессией ростового фактора VEGF-A. Наиболее тесное сопряженное повышение экспрессии факторов HIF-1 $\alpha$  и VEGF-A наблюдалось у больных раком СОПР при метастазировании в региональные лимфоузлы. Стабилизация HIF-1 $\alpha$  с ограничением его транслокации в ядро при раке СОПР достигалась при региональном возрастании уровня ЛФ. Проапоптотическую роль HIF-1 $\alpha$  играл только на ранних стадиях заболевания, поскольку достоверная связь была установлена только при размерах опухоли T1-T2 и отсутствии поражения лимфоузлов.

#### 4.4. Изучение показателей экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$ при оценке общей выживаемости больных раком слизистой оболочки полости рта

При наблюдении за больными раком СОПР в течение двух лет установлено, что общее количество умерших было 45 (27,8%). Относительная величина общей выживаемости составила 72,2% (n=117) и зависела от стадии заболевания по TNM: при T1N0M0 – 100%, T2N0-2M0 - 83,6%, T3N0-2M0 - 71% и T4N1-2M0-1 - 23,8% (табл. 4.28).

Выживаемость больных была оценена с учетом выраженности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли у больных раком СОПР. В подгруппу с негативной (HIF-1 $\alpha$  0) и слабо выраженной экспрессией (HIF-1 $\alpha$  1+) было объединено 44 пациентов, а в другой подгруппе больных были объединены пациенты с умеренной (2++) и сильно выраженной (3+++)  
экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли.

**Таблица 4.28**

**Выживаемость больных раком СОПР с учетом выраженности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли у больных раком СОПР**

TNM	n	Число живых и умерших	HIF-1 $\alpha$ «0-1+»	HIF-1 $\alpha$ «2+++-3+++»	Всего
T1N0M0	17	живы	9 (100%)	8 (100%)	17 (100%)
		умерли	-	-	-
		всего	9	8	
T2N0-2M0	55	живы	17 (85%)	29 (83%)	46 (83,6%)
		умерли	3 (15%)	6 (17%)	9 (16,4%)
		всего	20 (100%)	35 (100%)	55 (100%)
T3N0-2M0	69	живы	10 (71%)	39 (71%)	49 (71%)
		умерли	4 (29%)	16 (29%)	20 (29%)
		всего	14 (100%)	55 (100%)	69 (100%)
T4N1-2M0-1	21	живы	1 (100%)	4 (20%)	5 (23,8%)
		умерли	0	16 (80%)	16 (76,2%)
		всего	1 (100%)	20 (100%)	
Всего	162	живы	37 (84%)	80 (68%)	117 (72,2%)
		умерли	7 (16%)	38 (32%)	45 (27,8%)
		всего	44 (100%)	118 (100%)	

Из 44 больных с негативной и слабовыраженной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли умерли 16% (n=7), что в 2 раза ниже по сравнению с подгруппой больных с умеренной и сильной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли (38 (32%) больных из 118) . Число выживших больных с негативной и слабовыраженной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли (84%), напротив, было выше по сравнению пациентами с умеренной и сильной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли (68%). Оценка достоверности сопряжения выживаемости больных раком СОПР и выраженностью экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли была статистически значимой (p=0,039) (табл. 4.29).

На следующем этапе проводили множительную оценку выживания больных раком СОПР по Каплану-Мейеру в общем по группе и в подгруппах в зависимости от экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли. Как известно, по методу Каплана-Мейера при оценке функции выживания вероятности выживания в каждом интервале перемножаются, что приводит к определению значения вероятности, что пациент проживет более определенного периода времени. Вероятность того, что больной раком СОПР проживет более 2 лет составила 0,55 (рис.4.14).

**Таблица 4.29**

**Сопряжение выживаемости больных раком СОПР и выраженности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли**

Число живых и умерших	HIF-1 $\alpha$ «0-1+»	HIF-1 $\alpha$ «2++-3+++»	Всего
живы	37	80	117 (72,2%)
умерли	7	38	45 (27,8%)
p ( $\chi^2$ )	p=0,039 ( $\chi^2=4,24$ )		

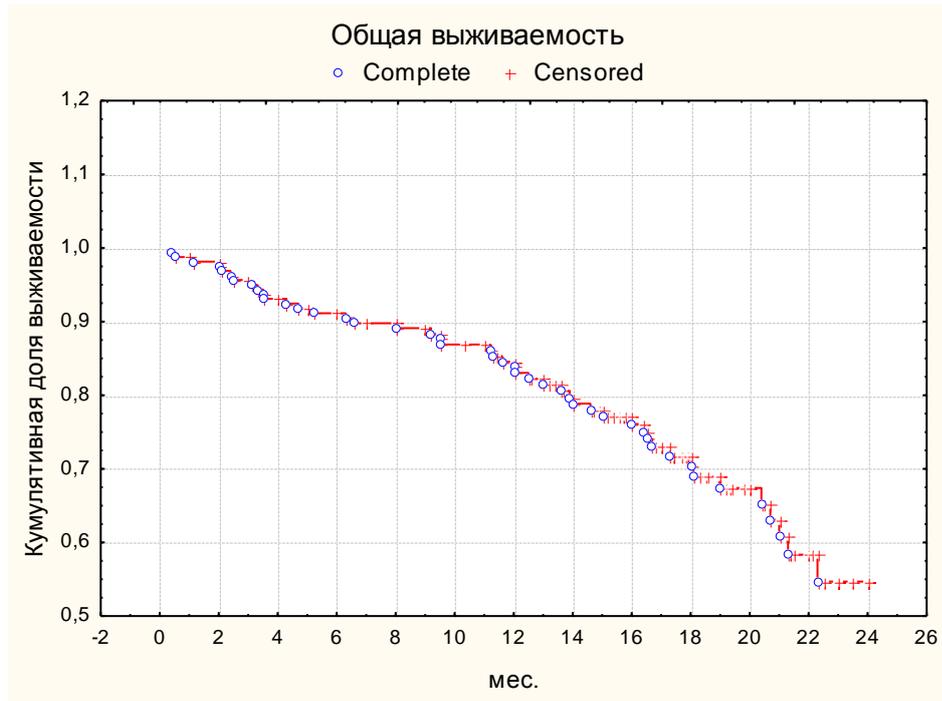


Рис. 4.14. Оценка двухгодичной общей выживаемости по Каплану-Мейеру у больных раком СОПР. Complete – завершённый случай (умер), Censored – жив.

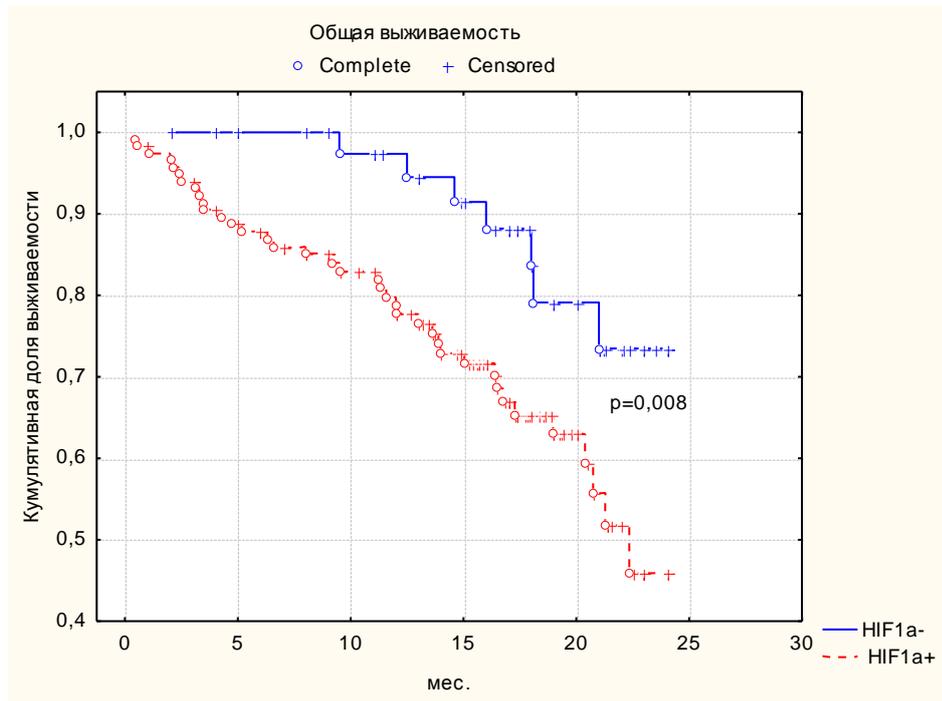


Рис. 4.15. Оценка двухгодичной общей выживаемости по Каплану-Мейеру у больных раком СОПР в зависимости от выраженности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли. Complete – завершённый случай (умер), Censored – жив. HIF-1 $\alpha$ - экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  негативная и 1+; HIF-1 $\alpha$ + - экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  2++ и 3+++.

Общая выживаемость у больных в зависимости от выраженности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли достоверно различалась ( $p=0,008$ ): у больных с негативной и слабовыраженной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли оценка выживания по Каплану-Мейеру была выше по сравнению с пациентами с умеренной и сильной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли (рис.4.15).

У пациентов с негативной и слабо выраженной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли вероятность того, что больной проживет более двух лет составила 0,73, а для больных с умеренной и сильной экспрессией HIF-1 $\alpha$  в опухоли - 0,46.

Следовательно, негативная и слабо выраженная экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухоли была сопряжена с более высокой вероятностью выживания больных через два года после операции и комбинированного лечения рака СОПР.

В заключении необходимо отметить, что экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в опухоли у больных раком СОПР была различной в зависимости от клинической картины основного заболевания. Чем выше содержание HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и выше экспрессия в опухоли, тем ниже уровень дифференцировки клеток и способности к метастазированию в региональные лимфоузлы. При повышении размеров опухоли от T1 до T3 и стадии заболевания от I к III имелась тенденция к возрастанию экспрессии HIF-1 $\alpha$  и количественного содержания в опухоли. Только резкое возрастание концентрации HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и выраженности экспрессии фактора у больных с T4 и IV стадией приводило к статистически значимому сопряжению уровня экспрессии фактора и размеров опухоли. Повышение содержания HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР сопровождалось активацией ядерного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, что наиболее тесно проявлялось при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток. При метастазировании в региональные лимфоузлы была выявлена тесная связь между повышением

содержания HIF-1 $\alpha$  и VEGF-A, что способствовало активации неоангиогенеза. Именно от локализации HIF-1 $\alpha$  в опухолевой клетке зависели такие признаки как размер опухоли и способность к метастазированию в лимфоузлы, дифференцировка клеток. Следовательно, стабилизировать HIF-1 $\alpha$  в цитоплазме возможно через лактоферрин-зависимый механизм. Проапоптическую роль HIF-1 $\alpha$  с тесной связью с экспрессией фактора bax играл только на ранних стадиях заболевания T1-T2, что может оказывать благоприятную роль в ограничении роста опухоли. Общая выживаемость больных раком СОПР была выше при негативной и слабо выраженной экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли.

## ГЛАВА 5

### ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ГНОЙНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА И НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ГНОЙНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

#### 5.1. Экспрессия факторов транскрипции, неоангиогенеза, апоптоза в ткани опухоли и ротовой жидкости у больных раком СОПР при развитии гнойных осложнений комбинированного лечения

У больных основной группы после хирургического лечения развились гнойно-воспалительные осложнения, а у пациентов группы сравнения они отсутствовали. Ретроспективно у пациентов с раком СОПР, разделенных по принципу наличия или отсутствия гнойно-воспалительных осложнений, оценивали исходный уровень содержания транскрипционного фактора НIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли, полученном из операционного биоптата (табл. 5.1).

**Таблица 5.1**

**Распределение величин НIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) у больных основной группы и группы сравнения с учетом размеров опухоли**

Размер опухоли	Основная группа, n=96	Группа сравнения, n=45	В общем по группе	p <sub>осн-срав</sub>
T1N0M0	9,4 $\pm$ 0,78	8,7 $\pm$ 0,47	9,1 $\pm$ 1,18	>0,05
T2N0-2M0	12,2 $\pm$ 0,85	9,1 $\pm$ 0,39	10,7 $\pm$ 0,65	<0,05
T3N0-2M0	13,7 $\pm$ 0,72	9,8 $\pm$ 0,53	11,7 $\pm$ 0,55	<0,05

Распределение величин содержания НIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли у больных основной группы и группы сравнения оценивали с учетом размеров опухоли. При размере опухоли T1 содержание НIF-1 $\alpha$  в супернатанте ткани опухоли было сходным. При T2 уровень изучаемого гипоксия-зависимого транскрипционного фактора в опухолевом гомогенате

в основной группе был выше по сравнению с группой сравнения на 34% ( $12,2 \pm 0,85$  УЕ/ мг белка в лунке против  $9,1 \pm 0,39$  УЕ/ мг белка в лунке,  $p < 0,05$ ), а при стадии Т3 – на 39,8% ( $13,7 \pm 0,72$  УЕ/ мг белка в лунке против  $9,8 \pm 0,53$  УЕ/ мг белка в лунке,  $p < 0,05$ ) (рис.5.1). Как в основной, так и в группе сравнения по мере повышения размера опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли возрастало. Однако, в основной группе градиент роста транскрипционного фактора от Т1 до Т3 был более выраженным, чем в группе сравнения.

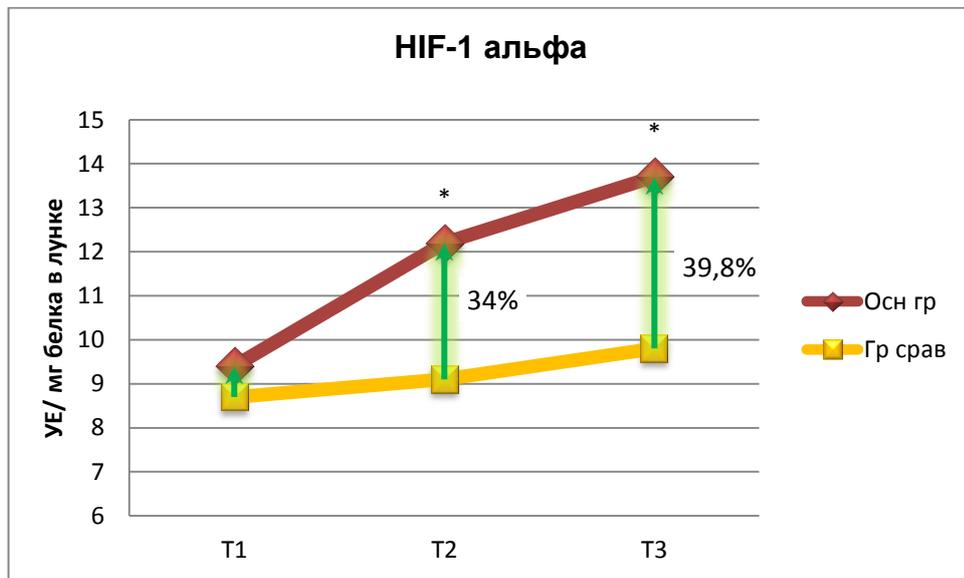


Рис. 5.1. Отличие уровня HIF-1 $\alpha$  в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) у больных основной группы по сравнению с группой сравнения с учетом размеров опухоли. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения представлено в таблице 5.2. У пациентов при развитии гнойно-воспалительных осложнений в супернатанте ткани опухоли в большей мере повышалось ( $p < 0,05$ ) содержание HIF-1 $\alpha$  (на 38,7%) и NF- $\kappa$ B p65 (на 35,2%) (рис. 5.2). Концентрация фактора NF- $\kappa$ B p50 хотя и возрастала со статистической значимостью ( $p < 0,05$ ), но уступала по амплитуде роста предыдущим факторам (на 16,8%) (рис. 5.2). Ядерный транскрипционный фактор карра-В (NF- $\kappa$ B) является ключевым фактором транскрипции,

контролирующим пролиферацию клеток. NF-kB p65, являясь димером субъединиц p50 и p65, может проявлять транскрипционную активность, а гомодимер p50/50 относится к

Таблица 5.2

**Содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения**

Показатель	Основная группа, n=96	Группа сравнения, n=45	В общем по группе	p <sub>осн-срав</sub>
HIF-1 $\alpha$ , УЕ/мг белка в лунке	12,9 $\pm$ 0,7	9,3 $\pm$ 0,6	11,5 $\pm$ 4,2	<0,05
NF-kB p50, УЕ/мг белка в лунке	11,1 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,4	10,7 $\pm$ 3,4	<0,05
NF-kB p65, УЕ/мг белка в лунке	14,6 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 0,8	12,1 $\pm$ 3,8	<0,05
Коэффициент NF-kB p65/p50	1,32 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,15	<0,05
VEGF-A, пг/мг	90,3 $\pm$ 1,5	74,6 $\pm$ 1,7	82,6 $\pm$ 5,7	<0,05

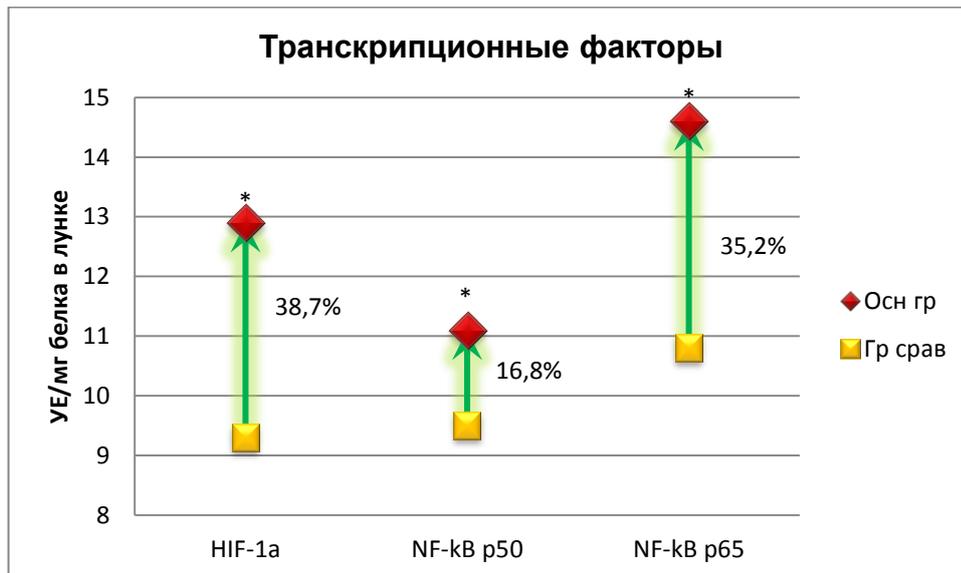


Рис.5.2. Отличие уровней транскрипционных факторов в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка в лунке) у больных основной группы по сравнению с группой сравнения. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

неактивным комплексам. Повышение содержания в опухоли NF-κB p65 наряду с повышением коэффициента соотношения NF-κB p65/p50 свидетельствовало о возрастании транскрипционного потенциала в опухоли у больных в основной группе. Существуют сведения, что как при воспалении в условиях гипоксии HIF-1α может повысить транскрипционный потенциал ядерных транскрипционных факторов kappa-B (Серебровская Т.В., 2005), так и сам фактор NF-κB активирует HIF-1α в условиях нормоксии (Van Uden P., 2008). В связи с этим, расставить приоритеты в причинно-следственной связи между факторами трудно, можно лишь говорить о взаимосвязанной их активации, способствующей росту пролиферативного потенциала опухолевых клеток у больных раком СОПР при развитии гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения.

У пациентов основной группы фактор VEGF-A, способствующий росту сосудов и ангиогенезу в опухоли, по сравнению с группой сравнения также был повышен ( $p < 0,05$ ) на 21% (рис.5.3), что, вероятно, было следствием накопления фактора HIF-1α.

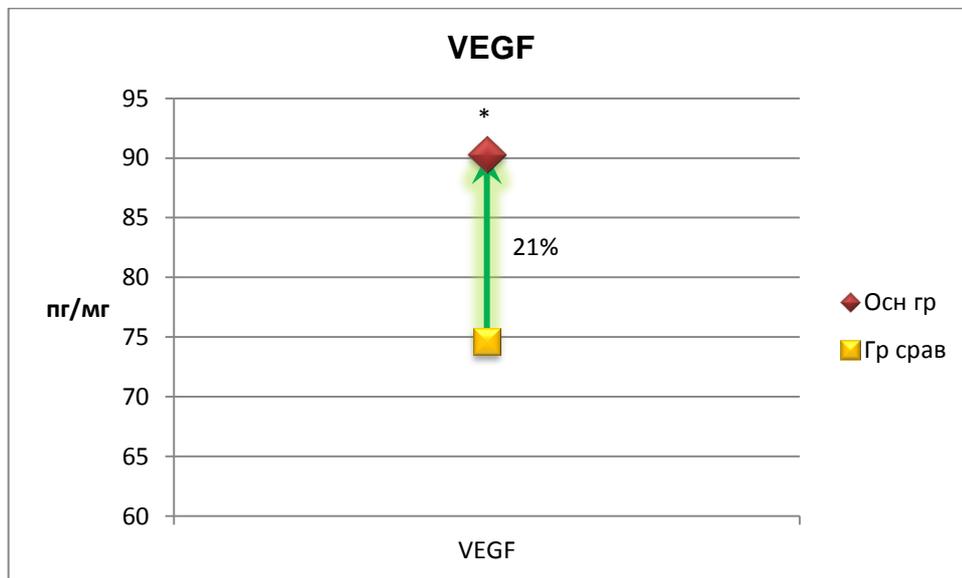


Рис. 5.3. Отличие уровня ростового фактора VEGF в тканевом гомогенате опухоли (пг/мл) у больных основной группы по сравнению с группой сравнения. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения по результатам ИГХ исследования представлена в таблице 5.3 и отдельно в зависимости от размеров опухоли иллюстрированы на рис. 5.4.

Таблица 5.3

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом размера опухоли**

	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Всего
	0	1+	2++	3+++	
<b>Основная группа, n=96</b>					
T1N0M0	-	3 (27,3%)*	7 (63,6%)	1 (9,1%)	11 (100%)
T2N0-2M0	-	7 (18,9%)*	25 (67,6%)*	5 (13,5%)	37 (100%)
T3N0-2M0	-	2 (4,2%)*	36 (75%)*	10 (20,8%)	48 (100%)
<b>Группа сравнения, n=45</b>					
T1N0M0	1 (16,7%)	5 (83,3%)	-	-	6 (100%)
T2N0-2M0	1 (5,6%)	12 (66,7%)	3 (16,7%)	2 (11,1%)	18 (100%)
T3N0-2M0	-	12 (57,1%)	6 (28,6%)	3 (14,3%)	21 (100%)

Примечание: \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

При размере опухоли T1 у больных основной группы преобладал средний уровень опухолевой экспрессии (2++) (63,6%), а у пациентов группы сравнения – слабый уровень опухолевой экспрессии (1+) (83,3%). Та же самая закономерность прослеживалась и при размере опухоли T2 (рис.5.4). У больных основной группы при T2N0-2M0 средний уровень опухолевой экспрессии (2++) встречался в 67,6% и был чаще других, а у пациентов группы сравнения – слабый уровень опухолевой экспрессии (1+) (66,7%) преобладал по частоте. При T2N0-2M0 сильная экспрессия фактора (3+++) в основной группе встречалась в 13,5%, а в группе сравнения – в 11,1%. При T3N0-2M0 в основной группе средний уровень опухолевой экспрессии (2++), по-прежнему, преобладал (75%), возросло число опухолевых препаратов, где выраженность экспрессии была сильной (20,8%) (рис.5.4). В группе сравнения при T3N0-2M0 половина препаратов имела слабый уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$  (57,1%), а другая половина по сумме (42,9%) средний и сильный уровень выраженности экспрессии фактора HIF-1 $\alpha$  (рис.5.4).

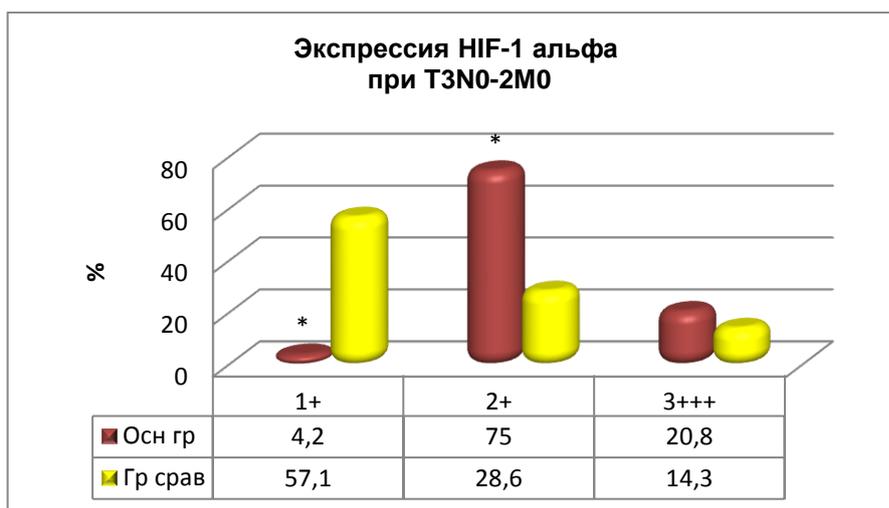
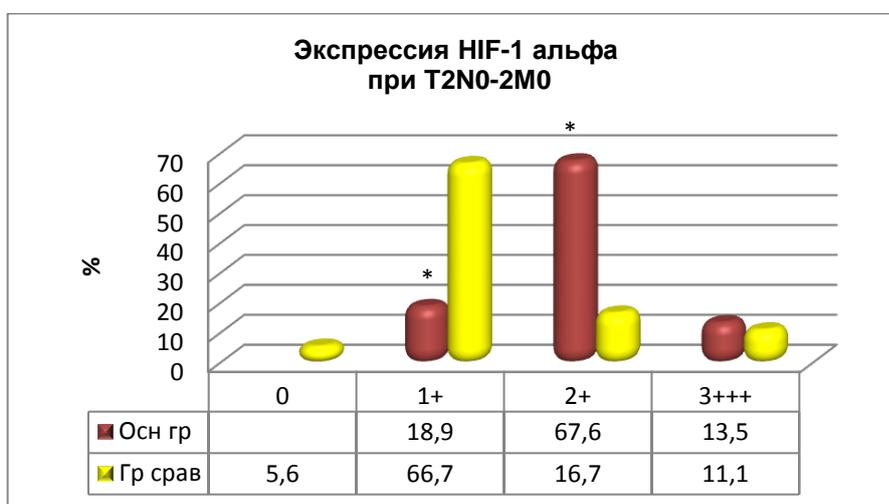
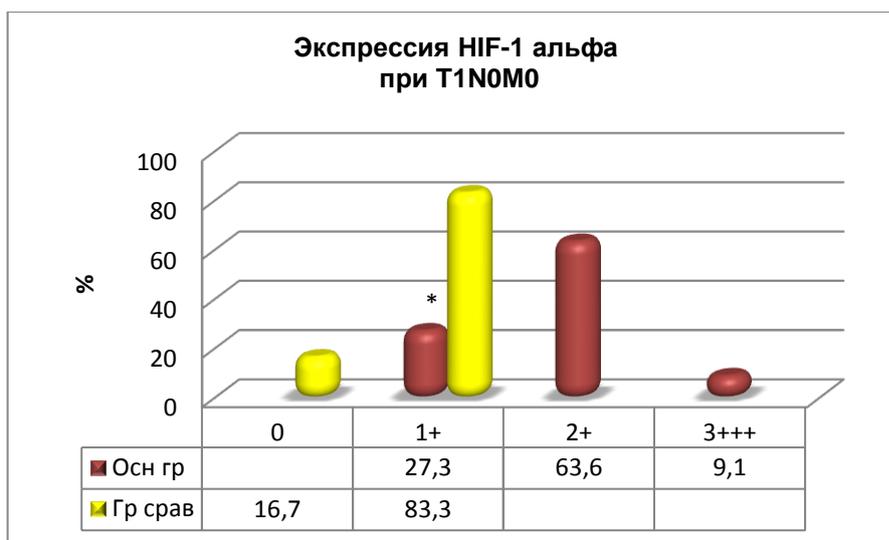


Рис. 5.4. Частота экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли у больных основной группы и группы сравнения с учетом размера опухоли. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Таким образом, в основной группе, где развились гнойно-воспалительные осложнения, зависимость транскрипционной активности опухолевых клеток от гипоксии была высокой.

Тип окрашивания клеток при ИГХ исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли позволял судить о наличии или отсутствии транслокации фактора в ядро. HIF1 $\alpha$  может перемещаться из цитоплазмы в ядро, где формирует активный HIF-1-комплекс. В нормальных условиях количество белка HIF1 $\alpha$  в ядре резко ограничено и повышается только в условиях гипоксии, отражая функциональную активность HIF-1-комплекса. HIF1 $\alpha$  связывается в ядре с гипоксия-реакционными элементами в гипоксия-ассоциированных генах, что усиливает транскрипционную активность (Ryu M.H. et al., 2010). Таким образом, наличие HIF1 $\alpha$  в ядре ассоциировано с повышением транскрипционной активности клеток.

Характеристики типа окрашивания клеток опухоли у больных основной группы и группы сравнения даны в таблице 5.4.

**Таблица 5.4**

**Характеристики типа окрашивания клеток опухоли у больных основной группы и группы сравнения при иммуногистохимическом исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли с учетом размера опухоли**

Размер опухоли	Основная группа, n=96			Группа сравнения, n=45		
	Тип окрашивания					
	цтм	яд-цтм	всего	цтм	яд-цтм	всего
T1N0M0	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11 (100%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)*	6 (100%)
T2N0-2M0	3 (8,1%) <sup>o</sup>	34 (91,9%)* <sup>o</sup>	37 (100%)	9 (50%)	9 (50%)	18 (100%)
T3N0-2M0	-	48 (100%) <sup>o</sup>	48 (100%)	5 (23,8%)	16 (76,2%)*	21 (100%)

Примечание: \* - достоверное отличие между типом окрашивания при  $p < 0,05$ , <sup>o</sup> - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

В основной группе ядерно-цитоплазматический тип окрашивания опухолевых клеток при размерах опухоли T1N0M0 наблюдался

приблизительно в половине случаев, при T2N0-2M0 – резко повышался до 91,9% и при T3N0-2M0 достигал 100%. В группе сравнения при T1N0M0 ядерно- цитоплазматический тип окрашивания опухолевых клеток имел место в трети случаев (33,3%), при T2N0-2M0 – в половине случаев (50%) и при T3N0-2M0 в 76,2% (рис.5.5).

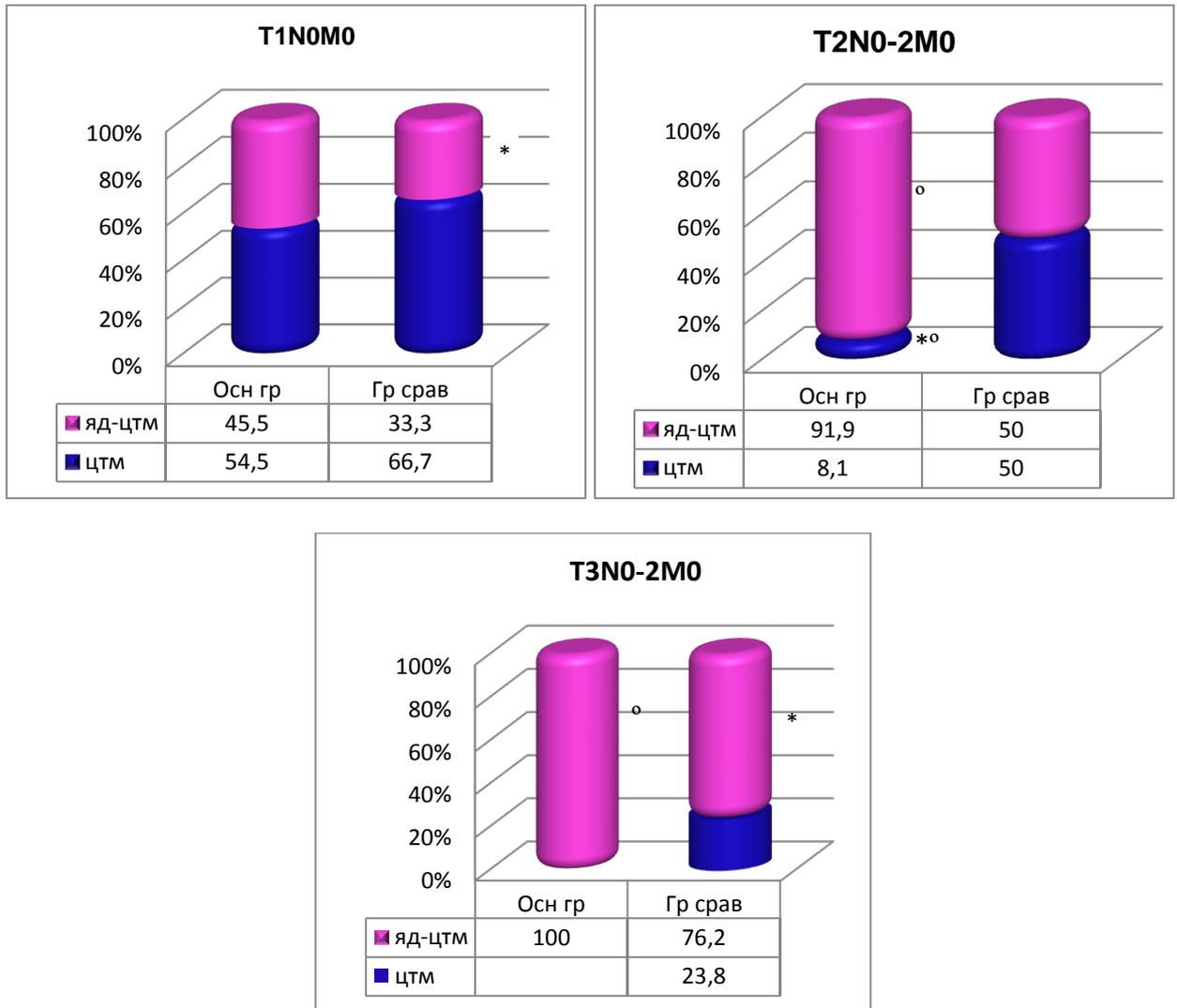


Рис. 5.5. Частота типов окрашивания клеток опухоли у больных основной группы и группы сравнения при ИГХ исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли с учетом размера опухоли. \* - достоверное отличие между типом окрашивания при  $p < 0,05$ , ° - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Следовательно, в основной группе развитие гнойных осложнений было сопряжено с тем, что транслокация HIF-1 $\alpha$  в ядро с активацией транскрипционной активности клеток была выражена сильнее.

К белкам, участвующим в процессах пролиферации клеток и апоптозе, относится Вах (Goll D.E. et al., 2003; Guicciardi M.E. et al., 2003). Белки Вах ускоряют апоптоз и поэтому носят название проапоптозные. От интенсивности апоптоза во-многом зависит способность организма противостоять развитию опухоли. Характеристика экспрессии маркера апоптоза Вах в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом размера опухоли представлена в таблице 5.5 и иллюстрирована на рис. 5.6.

Таблица 5.5

**Характеристика экспрессии маркера апоптоза Вах в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом размера опухоли**

	Уровень экспрессии Вах				Всего
	0	1+	2++	3+++	
<b>Основная группа, n=96</b>					
T1N0M0	3 (27,3%)	1 (9,1%)	4 (36,4%)	3 (27,3%)*	11 (100%)
T2N0-2M0	6 (16,2%)	12 (32,4%)*	13 (35,1%)	6 (16,2%)*	37 (100%)
T3N0-2M0	22 (45,8%)	16 (33,3%)	8 (16,7%)	2 (4,2%)	48 (100%)
<b>Группа сравнения, n=45</b>					
T1N0M0	-	-	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)
T2N0-2M0	1 (5,6%)	1 (5,6%)	5 (27,8%)	11 (61,1%)	18 (100%)
T3N0-2M0	7 (33,3%)	6 (28,6%)	4 (19%)	4 (19%)	21 (100%)

В основной группе средняя выраженность экспрессии (2++) белка Вах встречалась чаще при небольших размерах опухоли T1 (36,4%) и T2 (35,1%), а при T3 экспрессия Вах была чаще низкой (1+) (33,3%) (рис.5.6). В группе сравнения экспрессия Вах при малых размерах опухоли была выраженной (3+++) и встречалась при T1 в 66,7%, а при T2 в 61,1%. При T3 в группе сравнения в основном наблюдалось либо отсутствие экспрессии проапоптического белка – 45,8%, либо его слабая экспрессия (1+) – в 33,3%. Таким образом, в группе сравнения при отсутствии гнойных осложнений после операции при малых размерах опухоли экспрессия проапоптического фактора Вах была выражена в большей мере, чем в основной группе. В

основной группе экспрессия белка вах была менее выраженной во всех стадиях от T1 до T3.

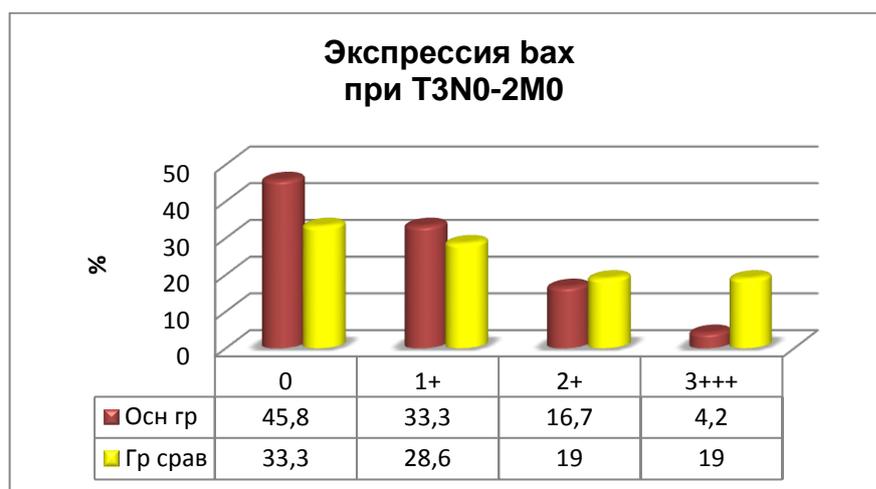
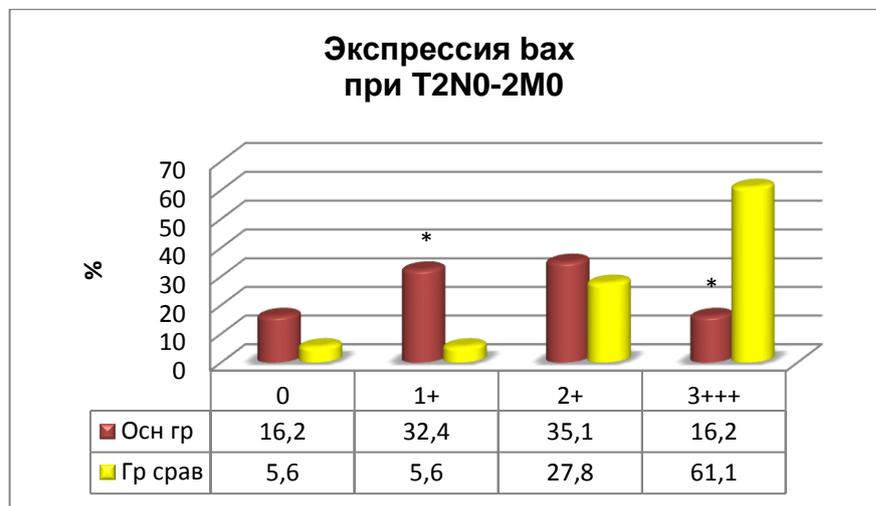
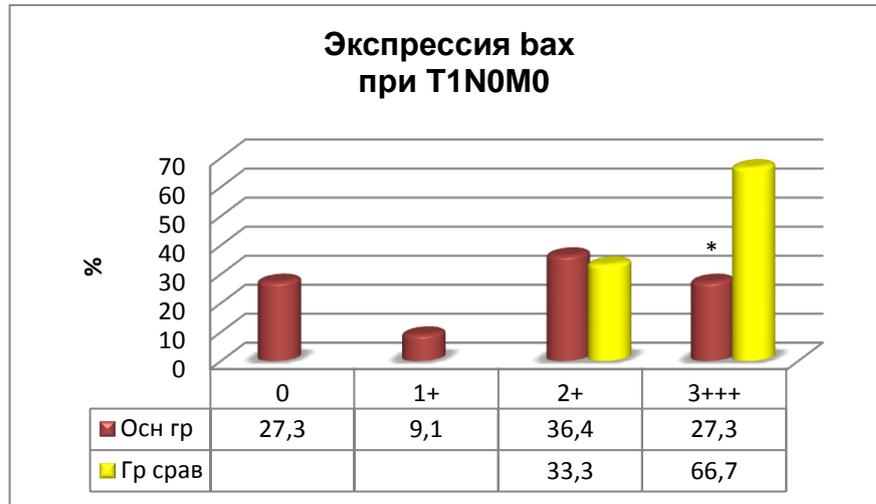


Рис. 5.6. Частота экспрессии вах в ткани опухоли у больных основной группы и группы сравнения с учетом размера опухоли. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Исследование экспрессии транскрипционных факторов (HIF-1 $\alpha$ , NF-kB), факторов неангиогенеза (VEGFA), апоптотических факторов (вax семейства bcl-2) в ткани опухоли рака СОПР сопряжено с инвазивным получением биоптата. Ротовая жидкость является более удобной биологической средой для проведения исследования. Определение биомаркеров в свободной нестимулированной слюне является новым подходом к ранней диагностике злокачественных опухолей челюстно-лицевой области, к прогнозированию их рецидивирования и метастазирования.

Уровни HIF-1 $\alpha$ , лактоферрина, интерлейкина-8 и VEGF в ротовой жидкости у больных основной группы и группы сравнения отражены в таблице 5.6.

**Таблица 5.6**

**Уровни HIF-1 $\alpha$ , лактоферрина, интерлейкина-8 и VEGF в ротовой жидкости у больных основной группы и группы сравнения**

Показатель	Основная группа, n=96	Группа сравнения, n=45	p
HIF-1 $\alpha$ , мкг/мл	37,5 $\pm$ 1,16	35,6 $\pm$ 1,34	>0,05
Лактоферрин, мкг/дл	2,0 $\pm$ 0,24	3,5 $\pm$ 0,38	<0,05
ИЛ-8, пг/мл	3328,5 $\pm$ 56,2	2895,6 $\pm$ 66,9	<0,05
VEGF, пг/мг	31,2 $\pm$ 1,27	24,6 $\pm$ 1,83	<0,05

Содержание в ротовой жидкости HIF-1 $\alpha$  у пациентов основной группы (37,5 $\pm$ 1,16 мкг/мл) и группы сравнения (35,6 $\pm$ 1,34 мкг/мл) практически не различалось. Это может быть связано со сложной белковой структурой гипоксия-зависимого фактора и трудностями его попадания в ротовую жидкость, поскольку HIF-1 $\alpha$  относится к тканевым факторам, регулирующим транскрипцию, и более информативен при исследовании его в ткани. По этой же причине транскрипционные факторы NF-kB p50 и NF-kB p65 в ротовой жидкости не определялись. У больных основной группы статистически значимые отличия концентраций в ротовой жидкости были

установлены для лактоферрина, интерлейкина-8 и ростового фактора VEGF (рис.5.7).

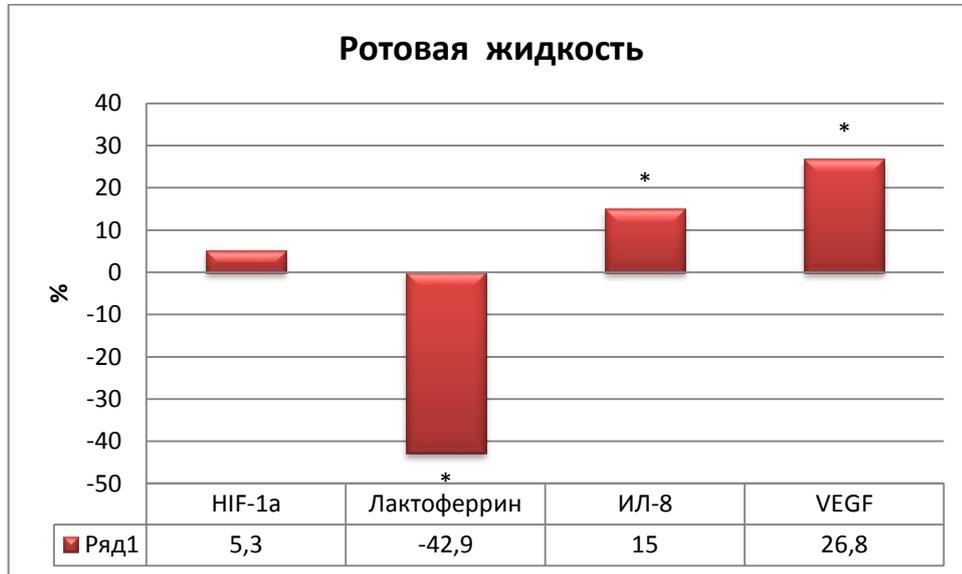


Рис. 5.7. Процентное изменение НIF-1 $\alpha$ , лактоферрина, интерлейкина-8 и VEGF в ротовой жидкости у больных основной группы по сравнению с группой сравнения. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

У пациентов основной группы в отличие от больных группы сравнения концентрация антимикробного белка лактоферрина была снижена на 42,9% ( $p < 0,05$ ), ИЛ-8 повышена на 15% ( $p < 0,05$ ) и сосудистого фактора VEGF повышена на 26,8% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, при развитии гнойных осложнений местно в биологических средах развивается снижение интенсивности антимикробной защиты за счет лактоферрина, повышение содержания провоспалительных факторов (ИЛ-8) и гликопротеинов семейства VEGF, способствующих ангио- и лимфогенезу, повышающих проницаемость сосудов.

Поскольку у больных изучаемых двух групп в ткани опухоли различие содержания НIF-1 $\alpha$  было выраженным, а в ротовой жидкости отличий не было, то было предпринято определение концентрации НIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови. В результате было установлено, что в основной группе содержание

НIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови составило  $83,2 \pm 2,5$  мкг/мл, а в группе сравнения  $45,7 \pm 2,1$  мкг/мл. У здоровых доноров ( $n=25$ ) в сыворотке крови содержание НIF-1 $\alpha$  составило  $33,2 \pm 1,8$  мкг/мл (рис.5.8). У больных основной группы по сравнению с группой сравнения уровень НIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови был на 82,1% выше ( $p < 0,001$ ), а по сравнению со здоровыми донорами – на 150,6% выше ( $p < 0,001$ ) (рис.5.9).

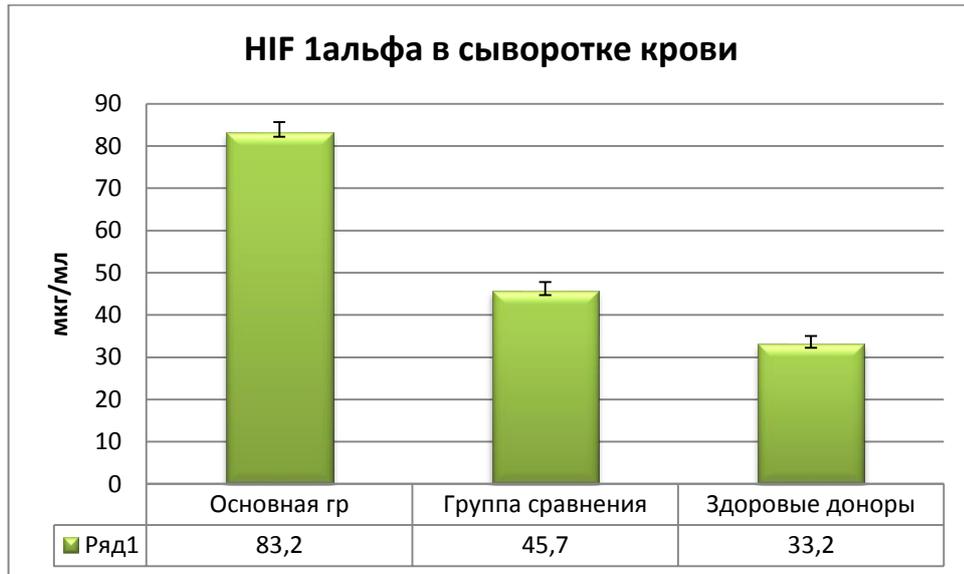


Рис. 5.8. Уровень НIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови у больных основной группы, группы сравнения и у здоровых доноров

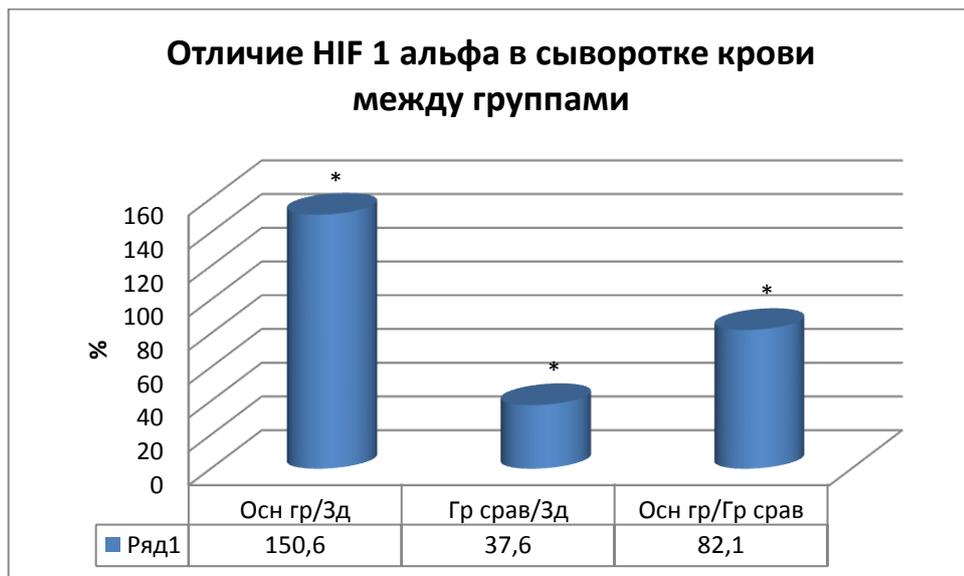


Рис. 5.9. Отличие НIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови у больных основной группы, группы сравнения и у здоровых доноров. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Таким образом, у больных раком СОПР в ротовой жидкости определение фактора HIF-1 $\alpha$  неинформативно, поскольку не отражает его экспрессию в ткани СОПР. Более информативным является определение HIF-1 $\alpha$  фактора в сыворотке крови.

Итак, развитие гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР сопряжено с повышением транскрипционной активности опухолевых клеток, о чем свидетельствовала повышенная экспрессия в ткани HIF-1 $\alpha$ , транслокация его из цитоплазмы в ядро, активация ядерного транскрипционного фактора карра-В, процессов неоангиогенеза. В ротовой жидкости как гомеостатической среде для процессов в слизистой оболочке ротовой полости у больных основной группы было отмечено снижение антимикробных факторов и повышение провоспалительных медиаторов. Оценка содержания HIF-1 $\alpha$  в ротовой жидкости была мало информативной, поскольку не отражала интенсивности тканевой экспрессии гипоксия-зависимого транскрипционного фактора. Поскольку при гнойных воспалительных процессах у больных раком СОПР была изменена система факторов, способствующих пролиферации опухолевых клеток, то на следующем этапе была проведена оценка тех же процессов, но с учетом прогрессии заболевания.

## **5.2. Экспрессия факторов транскрипции, неоангиогенеза, апоптоза в ткани опухоли и ротовой жидкости у больных раком СОПР при прогрессии основного заболевания**

У больных основной группы частота прогрессирования основного заболевания (рецидивы опухоли, регионарные и отдаленные метастазы, летальный исход) наблюдалась у 39 (40,6%), а в группе сравнения у 4 (8,9%) пациентов.

Исходное содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания отражено в таблице 5.7.

**Таблица 5.7**

**Исходное содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания**

Показатель	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45	
	Прогрессия+	Прогрессия-	Прогрессия+	Прогрессия-
HIF-1 $\alpha$ , УЕ/мг белка в лунке	14,9 $\pm$ 0,8* <sup>o</sup>	11,8 $\pm$ 0,9 <sup>o</sup>	10,7 $\pm$ 0,3*	9,0 $\pm$ 0,6
NF-kB p50, УЕ/мг белка в лунке	12,2 $\pm$ 1,0* <sup>o</sup>	10,5 $\pm$ 0,7	10,7 $\pm$ 0,2*	9,1 $\pm$ 0,9
NF-kB p65, УЕ/мг белка в лунке	17,3 $\pm$ 1,2* <sup>o</sup>	12,4 $\pm$ 0,8 <sup>o</sup>	12,1 $\pm$ 0,4*	10,5 $\pm$ 0,7
Коэффициент NF-kB p65/p50	1,43 $\pm$ 0,2 <sup>o</sup>	1,17 $\pm$ 0,3	1,14 $\pm$ 0,1	1,15 $\pm$ 0,5
VEGF-A, пг/мг	99,6 $\pm$ 3,2* <sup>o</sup>	84,8 $\pm$ 2,9 <sup>o</sup>	81,2 $\pm$ 1,4*	73,3 $\pm$ 2,6
Всего	39	57	4	41

Примечание: \* - достоверное отличие между подгруппами с прогрессией и отсутствием прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ ; <sup>o</sup> - достоверное отличие между подгруппами основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ .

При прогрессии заболевания в двух изучаемых группах содержание HIF-1 $\alpha$ , NF-kB p50, NF-kB p65 и VEGF-A в супернатанте опухоли было выше по сравнению с больными со стабильным течением заболевания. Однако, амплитуда прироста транскрипционных и ростовых факторов при прогрессировании заболевания была выше в основной группе по сравнению с группой сравнения (рис.5.10).

Так, в основной группе у пациентов с прогрессированием заболевания по сравнению с больными при стабильном течении болезни HIF-1 $\alpha$ , NF-kB p50, NF-kB p65 и VEGF-A возросли, соответственно, на 26,3% ( $p < 0,05$ ), 16,2% ( $p < 0,05$ ), 39,5% ( $p < 0,05$ ) и 17,5% ( $p < 0,05$ ), а в группе сравнения на 18,9% ( $p < 0,05$ ), 17,6% ( $p < 0,05$ ), 15,2% ( $p < 0,05$ ) и 10,8% ( $p < 0,05$ ). Повышенное содержание транскрипционных и ростовых факторов в опухоли у пациентов

с гнойно-воспалительными осложнениями комбинированного лечения было ассоциировано с более частым прогрессированием рака СОПР.

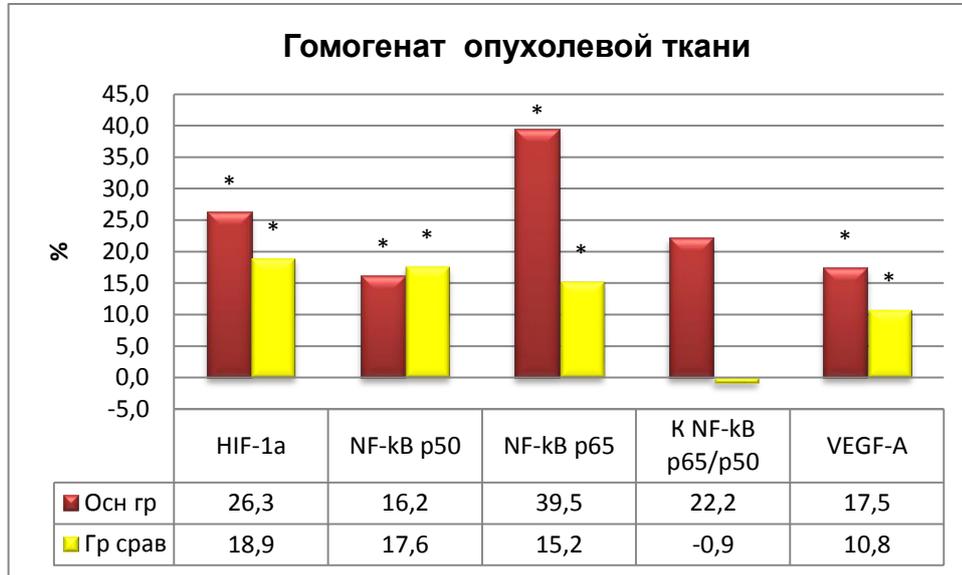


Рис. 5.10. Процентное изменение транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения. \* - достоверное отличие показателя в подгруппе с прогрессированием заболевания при  $p < 0,05$ .

Экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани в основной группе при прогрессировании заболевания была выше по сравнению с пациентами этой же группы, но без прогрессии болезни (табл. 5.8). Сильная выраженность экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани в основной группе при прогрессировании заболевания встречалась в 38,5%, а при отсутствии прогрессии – в 1,8%, средняя выраженность экспрессии при прогрессии болезни – в 53,8%, а при отсутствии прогрессии – в 82,5% (рис.5.11). Слабая выраженность экспрессии встречалась при прогрессии болезни – в 7,7%, а при отсутствии прогрессии – в 15,8% и не различалась по частоте ( $p > 0,05$ ).

Таблица 5.8

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания**

	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$				Всего
	0	1+	2+	3+++	
<b>Основная группа, n=96</b>					
Прогрессия+	-	3 (7,7%)	21 (53,8%)* <sup>o</sup>	15 (38,5%)*	39 (100%)
Прогрессия-	-	9 (15,8%)	47 (82,5%)	1 (1,8%)	57 (100%)
<b>Группа сравнения, n=45</b>					
Прогрессия+	-	-	1 (25%)	3 (75%)*	4 (100%)
Прогрессия-	2 (4,9%)	29 (70,7%)	8 (19,5%)	2 (4,9%)	41 (100%)

Примечание: \* - достоверное отличие между подгруппами с прогрессией и отсутствием прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ ; <sup>o</sup> - достоверное отличие между подгруппами основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ .

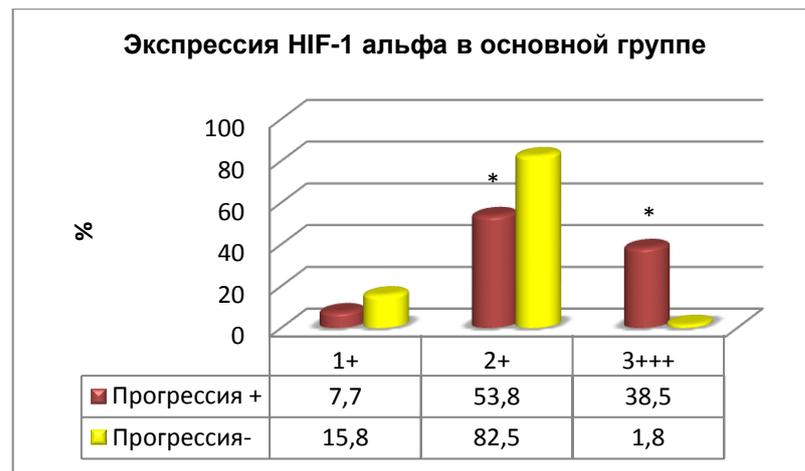


Рис. 5.11. Частота экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания. \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

В группе сравнения при прогрессии заболевания преобладала по частоте (75%) сильная выраженность экспрессии HIF-1 $\alpha$  (3+++), а при отсутствии прогрессирования чаще всего встречалась слабая выраженность экспрессии (1+) (70,7%).

Таким образом, такие факторы как гнойные осложнения после операции, прогрессирование рака СОПР по совокупности были ассоциированы с высокой экспрессией транскрипционных и ростовых факторов в опухоли.

У больных основной группы как при прогрессировании (94,9%), так и при стабильном течении заболевания (84,9%) транслокация HIF-1 $\alpha$  в ядро опухолевых клеток, сопровождающаяся ядерно-цитоплазматическим типом окрашивания при ИГХ исследовании была высокой по частоте (табл. 5.9).

**Таблица 5.9**

**Характеристики типа окрашивания клеток опухоли у больных основной группы и группы сравнения при иммуногистохимическом исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли с прогрессии заболевания**

	Основная группа, n=96			Группа сравнения, n=45		
	Тип окрашивания					
	цтм	яд-цтм	всего	цтм	яд-цтм	всего
Прогрессия +	2 (5,1%)	36 (94,9%)*	39 (100%)	-	4 (100%)	4 (100%)
Прогрессия -	6 (10,5%)	51 (89,5%)* <sup>o</sup>	57 (100%)	18 (43,9%)	23 (56,1%)	41 (100%)

Примечание: \* - достоверное отличие между типом окрашивания при  $p < 0,05$ ; <sup>o</sup> - достоверное отличие между подгруппами основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ .

У пациентов группы сравнения при прогрессировании заболевания (100%) ядерно-цитоплазматический тип окрашивания опухолевых клеток встречался чаще по сравнению со стабильным течением болезни (56,1%) (рис. 5.12). Таким образом, гнойно-некротические процессы в регионе являются дополнительным фактором, усиливающим проникновение HIF-1 $\alpha$  в ядро для активации транскрипции.

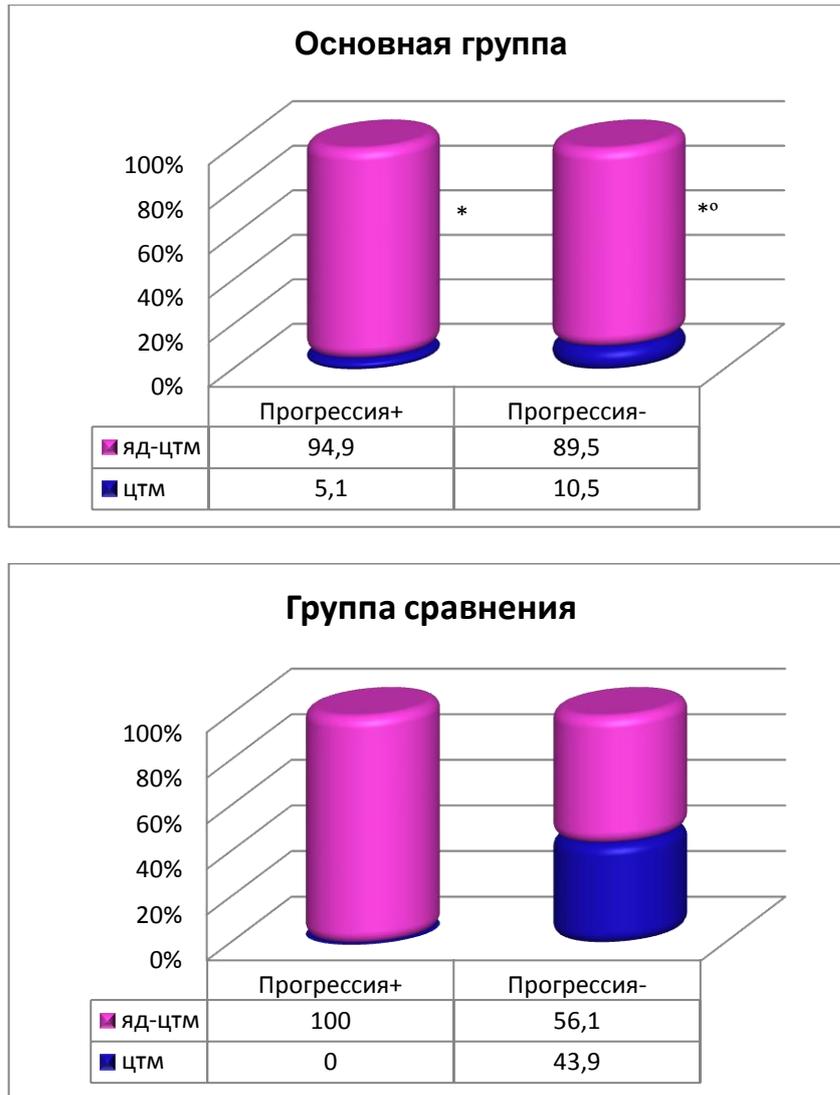


Рис. 5.12. Частота типов окрашивания клеток опухоли у больных основной группы и группы сравнения при ИГХ исследовании экспрессии НIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли с учетом прогрессии заболевания. \* - достоверное отличие между типом окрашивания при  $p < 0,05$ , ° - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Характеристика экспрессии маркера апоптоза бах в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания представлена в таблице 5.10 и иллюстрирована на рисунке 5.13. Как в основной группе, так и в группе сравнения, прослеживалась тенденция снижения экспрессии проапоптотического белка бах у пациентов с прогрессией заболевания. Следовательно, активация апоптоза являлась сдерживающим механизмом для прогрессирования рака СОПР.

Таблица 5.10

**Характеристика экспрессии маркера апоптоза *bax* в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания**

	Уровень экспрессии <i>bax</i>				Всего
	0	1+	2+	3+++	
<b>Основная группа, n=96</b>					
Прогрессия+	5(12,8%)*°	8 (20,5%)*°	16 (41%)*	1 (25,6%)*	39 (100%)
Прогрессия-	26(45,6%)°	21 (36,8%)°	9 (15,8%)°	10 (1,8%)°	57 (100%)
<b>Группа сравнения, n=45</b>					
Прогрессия+	2 (50%)*	2 (50%)*	-	-	4 (100%)
Прогрессия-	6 (14,6%)	5 (12,2%)	11 (26,8%)	19 (46,3%)	41 (100%)

Примечание: \* - достоверное отличие между подгруппами с прогрессией и отсутствием прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ ; ° - достоверное отличие между подгруппами основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ .

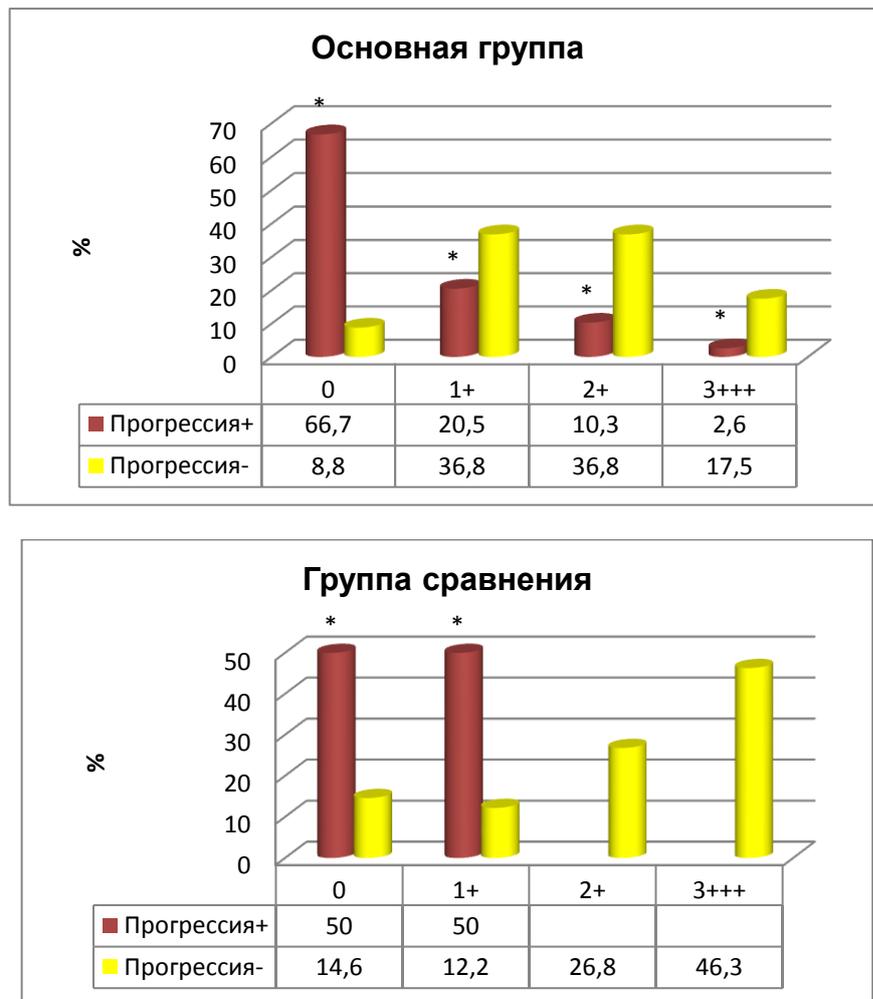


Рис. 5.13. Частота экспрессии *bax* в ткани опухоли у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания. \* - достоверное отличие между подгруппами при  $p < 0,05$ .

В ротовой жидкости в основной группе при прогрессировании заболевания по сравнению с пациентами со стабильным течением заболевания содержание лактоферрина было ниже ( $p < 0,05$ ) на 51,7% ( $1,4 \pm 0,2$  мкг/дл против  $2,9 \pm 0,3$  мкг/дл), ИЛ-8 выше ( $p < 0,05$ ) на 20,2% ( $3627 \pm 45$  пг/мл против  $3018 \pm 73$  пг/мл), VEGF выше ( $p < 0,05$ ) на 19,9% ( $33,1 \pm 1,8$  пг/мл против  $27,6 \pm 1,9$  пг/мл) (табл. 5.11 и рис. 5.14).

Таблица 5.11

**Исходное содержание транскрипционных, про- и противовоспалительных, ростовых факторов в ротовой жидкости у больных основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания**

Показатель	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45	
	Прогрессия+	Прогрессия-	Прогрессия+	Прогрессия-
ИФ-1 $\alpha$ , мкг/мл	$39,5 \pm 2,5$	$36,2 \pm 2,1$	$35,2 \pm 1,9$	$35,8 \pm 2,2$
Лактоферрин, мкг/дл	$1,4 \pm 0,2^{*o}$	$2,9 \pm 0,3^o$	$3,1 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,2$
ИЛ-8, пг/мл	$3627 \pm 45^{*o}$		$2981 \pm 62$	$2850 \pm 70$
VEGF, пг/мл	$33,1 \pm 1,8^{*o}$	$27,6 \pm 1,9$	$24,8 \pm 1,5$	$24,2 \pm 1,7$
Всего	39	57	4	41

\* - достоверное отличие между подгруппами с прогрессией и отсутствием прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ ; ° - достоверное отличие между подгруппами основной группы и группы сравнения с учетом прогрессии заболевания при  $p < 0,05$ .

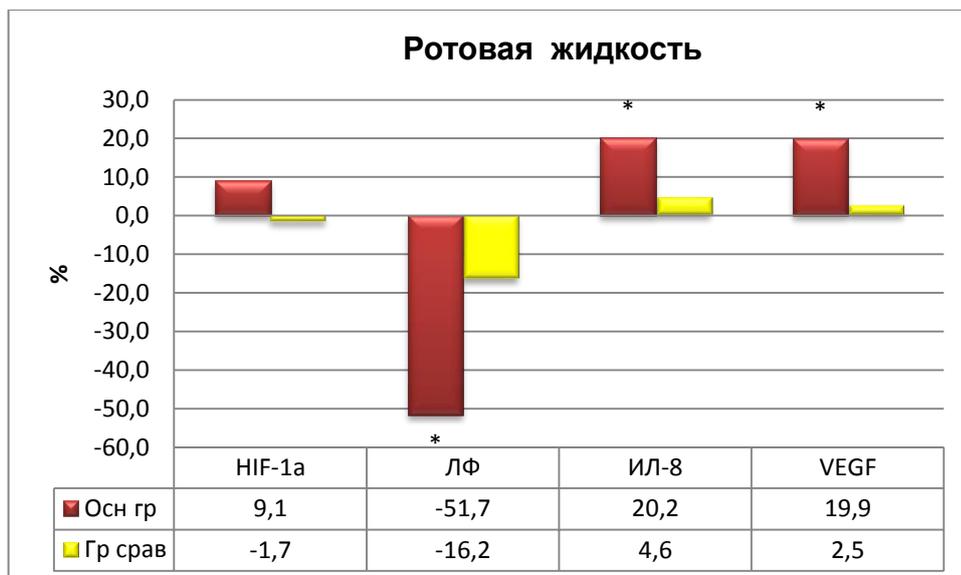


Рис. 5.14. Процентное изменение транскрипционных, про- и противовоспалительных, ростовых факторов в ротовой жидкости у больных основной группы и группы сравнения. \* - достоверное отличие показателя в подгруппе с прогрессированием заболевания при  $p < 0,05$ .

Концентрация HIF-1 $\alpha$  в ротовой жидкости у пациентов основной группы при прогрессировании заболевания не изменялась. Напротив, в сыворотке крови в основной группе при прогрессировании заболевания по сравнению с пациентами со стабильным течением заболевания содержание HIF-1 $\alpha$  резко возросло до  $103,2 \pm 2,8$  мкг/мл против  $67,4 \pm 2,5$  мкг/мл на 53,1% ( $p < 0,05$ ).

У пациентов в группе сравнения в ротовой жидкости при прогрессировании заболевания отмечалось только статистически значимое снижение лактоферрина на 16,2% ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.14). Концентрация HIF-1 $\alpha$  как в ротовой жидкости ( $35,2 \pm 1,9$  мкг/мл и  $35,8 \pm 2,2$  мкг/мл), так и в сыворотке крови ( $47,8 \pm 1,2$  мкг/мл и  $45,1 \pm 2,0$  мкг/мл) при прогрессии рака СОПР в группе сравнения статистически значимо не различалась.

Таким образом, у пациентов с раком СОПР и гнойными осложнениями химиолучевого и хирургического комбинированного лечения была выявлена более выраженная экспрессия транскрипционных и ростовых факторов в опухоли с усиленной транслокацией гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в ядро, снижением в ротовой жидкости антимикробных факторов защиты и повышением провоспалительных медиаторов и маркеров, повышающих проницаемость сосудистых стенок. При прогрессировании заболевания у пациентов с гнойными воспалительными осложнениями комбинированного лечения установленные закономерности проявлялись с большей выраженностью. Изменения гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в ротовой жидкости как при развитии гнойных осложнений комбинированного лечения, так и при прогрессии заболевания неинформативны, не отражают его колебание в ткани опухоли и требуют определения фактора в сыворотке крови.

Для профилактики и лечения гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при обширных оперативных вмешательствах у онкологических больных в Московском научно-

исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена был разработан препарат для внутривенного вливания Лапрот, активным компонентом которого является лактоферрин человека выделенный из женского молока ранних сроков лактации (Патент 2165769 от 13.07.2000) (Чиссов В.И. с соавт., 2001). Препарат абсолютно безопасен, нетоксичен и может сочетаться с любой терапией, что доказано в до- и пострегистрационных клинических исследованиях (Немцова Е.Р. с соавт., 2006). Лактоферрин характеризуется видоспецифичностью белка, получаемого из женского молока и поэтому не вызывает аллергической реакции. Лапрот рекомендуется вводить в 1-е сутки после хирургической санации гнойного очага в разовой дозе 50 мг (суточная доза 50-100мг) внутривенно, капельно со скоростью 3 мл/мин. Кратность введения и курсовые дозы - 7 инфузий (350-700 мг). Кроме того, наряду с внутривенными инфузиями препарат Лапрот применяют местно в виде 0,1-0,05% раствора для промывания и орошения ран после предварительной хирургической санации и дренирования гнойных очагов. На основе полученных результатов в ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена» была разработана новая медицинская технология «Препарат Лапрот в терапии гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений», которая разрешена к применению Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (разрешение на применение № ФС-2007/249 от 29.12.2007).

Нами учитывались признанные свойства лактоферрина, которые являются доказанными – антиоксидантные, антибактериальные и противовирусные, иммуномодулирующие (Захарова Е.Т. с соавт., 2012). Новыми объективными показаниями для применения Лапрота у больных раком СОПР при гнойных осложнениях после операции, установленными в нашей работе, были доказанное снижение лактоферрина в ротовой жидкости у больных при развитии гнойно-воспалительных осложнений и при

прогрессии заболевания, а также то, что лактоферрин стабилизирует NF- $\kappa$ B и ограничивает его транслокацию в ядро. В нашей работе было установлено, чем выше содержание ЛФ в ротовой жидкости, тем ниже частота ядерно-плазматического типа окрашивания опухолевых клеток, а следовательно, транспорт NF- $\kappa$ B в ядро опухолевой клетки, транскрипционная активность.

В следующей главе после разработки прогностических алгоритмов в отношении выделения континента больных раком СОПР, которые имеют высокий риск развития гнойных осложнений после операции, а также риск прогрессии заболевания будет отражена эффективность использования у этой категории больных препарата Лапрот.

## ГЛАВА 6

# РАННЕЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ГНОЙНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

### 6.1. Прогнозирование развития гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания у больных раком слизистой оболочки полости рта

Алгоритм дополнительного обследования больных раком СОПР для дооперационного прогнозирования гнойных воспалительных послеоперационных осложнений и прогрессирования заболевания включает исследование ротовой жидкости, зубного налета и биоптата опухоли (табл. 6.1). До операции в ротовой жидкости с помощью иммуноферментного анализа необходимо определить содержание антимикробного белка лактоферрина в мкг/дл, провоспалительного цитокина ИЛ-8 в пг/мл и фактора роста сосудов VEGF. В зубном налете с помощью панели «Дентоскрин» методом ПЦР в режиме реального времени рекомендуется провести качественно-количественный анализ спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости. Методика подразумевает не только выявление микроорганизма, но и оценку количества бактерий в мл, сопоставление фактического результата с клинически значимой концентрацией. В биоптате опухоли, полученном при диагностических мероприятиях либо во время операции, необходимо с помощью иммуноферментного метода в супернатанте оценить содержание HIF-1 $\alpha$  в УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 в УЕ/мг белка в лунке и VEGF-A в пг/мг. Кроме того, с помощью ИГХ рекомендуется проанализировать выраженность экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли и тип окрашивания опухолевых клеток (цитоплазматический или

ядерно-цитоплазматический), выраженность экспрессии маркера апоптоза *bax*. Сопоставление полученных показателей по алгоритмам, изложенным в таблицах 6.2-6.5, позволит исходно оценить риск прогрессирования, рецидивирования и метастазирования заболевания, развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.

Таблица 6.1

**Алгоритм дополнительного обследования больных раком СОПР для раннего прогнозирования гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания**

Субстрат	Показатель	Метод	Единицы измерения
Ротовая жидкость	Лактоферрин	ИФА	мкг/дл
	Интерлейкин-8	ИФА	пг/мл
	VEGF	ИФА	пг/мл
Зубной налет	Обнаружение <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> панелью «Дентоскрин» (ООО НПФ «Литех» Россия)	Метод ПЦР в режиме реального времени	Качественное обнаружение, количественное определение концентрации (кл/мл)
Биоптат опухоли	Содержание HIF-1 $\alpha$ в супернатанте	ИФА	УЕ/мг белка в лунке
	Содержание NF-kB p65 в супернатанте	ИФА	УЕ/мг белка в лунке
	Содержание VEGF-A в супернатанте	ИФА	пг/мг
	Экспрессия HIF-1 $\alpha$ в ткани и тип окрашивания клетки	ИГХ	Число HIF-1 $\alpha$ позитивных клеток на 1000 клеток, локализация окрашивания
	Экспрессия маркера апоптоза <i>bax</i>	ИГХ	Число HIF-1 $\alpha$ позитивных клеток на 1000 клеток

Заключение о низком риске рецидива заболевания формируется, если у больного со стадией рака СОПР T<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> в ротовой жидкости содержание лактоферрина выше 0,4 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 12 УЕ/мг белка в лунке, имеет место снижение концентрации NF- $\kappa$ B p65 ниже 10 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 75 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  умеренно или сильно выраженная (то есть, число позитивных клеток более 25%), тип окрашивания цитоплазмальный или фактор HIF-1 $\alpha$  не достиг ядра, экспрессия проапоптического фактора bax сильно выраженная (число позитивных клеток более 25%) (табл. 6.2). Патогенетическое заключения такого обоснования видится в следующем: повышенное содержание фактора HIF-1 $\alpha$  в супернатанте опухоли свидетельствует, что гипоксия сдерживает рост опухоли, HIF-1 $\alpha$  выступает как проапоптотический фактор, обеспечивая высокую интенсивность апоптоза. Стабилизация HIF-1 $\alpha$  за счет высокого содержания лактоферрина ограничивает его транслокацию в ядро, объясняя цитоплазматический тип окрашивания клеток при ИГХ, приводит к ограничению активации транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B, фактора роста сосудов VEGF-A, что снижает пролиферативный потенциал опухолевых клеток и рост кровеносных сосудов.

Дифференциальные точки разделения концентрации лактоферрина в ротовой жидкости, HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 и VEGF-A в супернатанте биоптата опухоли были определены методом ROC- анализа. Эти уровни показателей соответствуют выделению группы пациентов с низким риском прогрессирования заболевания с наибольшей диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью. На рис. 6.1 отражена ROC-кривая, которая представляет собой графическую характеристику качества бинарного классификатора – зависимости доли верных положительных классификаций от доли ложных положительных классификаций при варьировании уровня отсечения решающего правила.

Чувствительность модели – это доля истинно положительных случаев, а специфичность – доля истинно отрицательных случаев, которые были верно идентифицированы моделью. Изложенный алгоритм был апробирован на проспективной группе. Диагностическая чувствительность представленного алгоритма для заключения о низком риске рецидива заболевания составила 90%, а специфичность 71%, диагностическая точность или эффективность соответствовала 82%.

Таблица 6.2

### Этапы формирования заключения о низком риске рецидива заболевания

Стадирование заболевания	Больные раком СОПР стадии T <sub>1-2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>		
Субстрат	Ротовая жидкость	Супернатант биоптата опухоли	Биоптат опухоли, ИГХ
<i>Маркер №1</i>	ЛФ	HIF-1 $\alpha$	HIF-1 $\alpha$
Изменение маркера №1	Повышение	Повышение	Экспрессия 2+ или 3+, тип окрашивания цитоплазмальный
Критическая точка маркера №1	Выше 0,4 мкг/дл	12 УЕ/мг белка в лунке	Число позитивных клеток более 25%
<i>Маркер №2</i>		NF-kB p65	baх
Изменение маркера №2		Снижение	Экспрессия 3+
Критическая точка маркера №2		10 УЕ/мг белка в лунке	Число позитивных клеток более 25%
<i>Маркер №3</i>		VEGF-A	
Изменение маркера №3	Снижение		
Критическая точка маркера №3		75 пг/мг	
Общее заключение	Риск прогрессирования заболевания низкий		
Патогенетическое объяснение	Гипоксия сдерживает рост опухоли, HIF-1 $\alpha$ выступает как проапоптотический фактор, высокая интенсивность апоптоза, стабилизация HIF-1 $\alpha$ за счет высокого содержания лактоферрина ограничивает его транслокацию в ядро и активацию транскрипционных факторов NF-kB, фактора роста сосудов VEGF-A.		

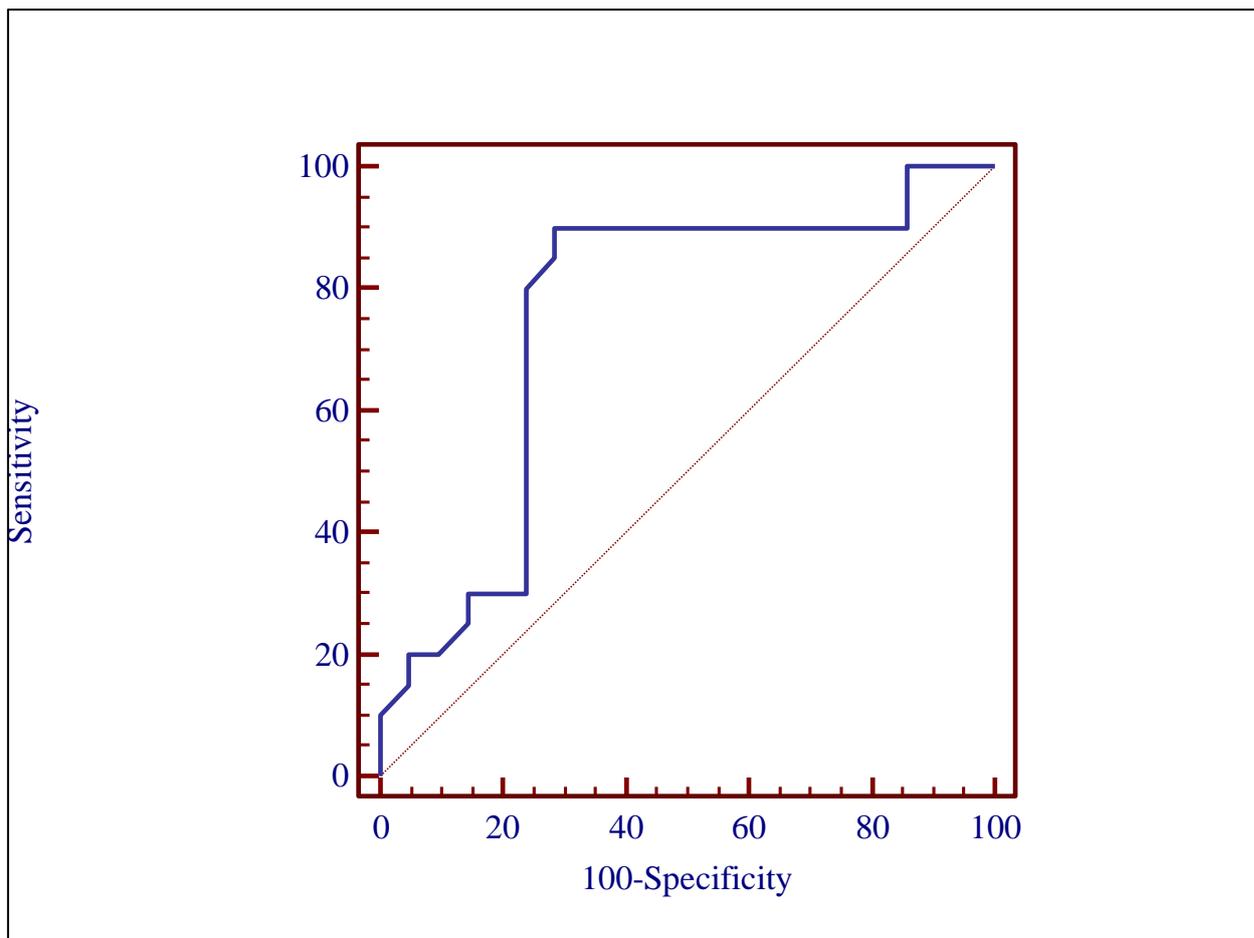


Рис. 6.1. ROC-кривая для определения риска прогрессирования рака СОПР по результатам исследования ротовой жидкости, зубного налета и биоптата опухоли.

Заключение о высоком риске роста опухоли и рецидивов вследствие выраженного пролиферативного потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР  $T_{2-3}N_{0-2}M_0$  в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 14 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 16 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 80 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  сильно выраженная (то есть, число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный или фактор HIF-1 $\alpha$  уже транслоцирован в ядро и является активатором других транскрипционных факторов (табл. 6.3). Патогенетическое заключения такого обоснования заключается в следующем: низкая стабилизация HIF-1 $\alpha$  за счет низкого содержания лактоферрина приводит к транслокации HIF-1 $\alpha$

в ядро, происходит активация транскрипционных факторов NF-κB. Однако низкая активность ангиогенеза сдерживает метастатический потенциал.

Таблица 6.3

**Этапы формирования заключения о высоком риске роста опухоли и рецидивирования заболевания**

Стадирование заболевания	Больные раком СОПР стадии T <sub>2-3</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>		
Субстрат	Ротовая жидкость	Супернатант биоптата опухоли	Биоптат опухоли, ИГХ
Маркер №1	ЛФ	НIF-1α	НIF-1α
Изменение	Снижение	Повышение	Экспрессия 3+, тип окрашивания цитоплазмально-ядерный
Критическая точка	1,9 мкг/дл	14 УЕ/мг белка в лунке	Число позитивных клеток более 50%
Маркер №2		NF-κB p65	
Изменение		Повышение	
Критическая точка		16 УЕ/мг белка в лунке	
Маркер №3		VEGF-A	
Изменение		Снижение	
Критическая точка		80 пг/мг	
Заключение	Высокий риск роста опухоли и рецидивов. Высокий пролиферативный потенциал опухолевых клеток.		
Патогенетическое объяснение	Низкая стабилизация НIF-1α за счет низкого содержания лактоферрина, транслокация НIF-1α в ядро, активация транскрипционных факторов NF-κB, низкая активность ангиогенеза снижает метастатический потенциал.		

Диагностическая чувствительность алгоритма для заключения о высоком риске роста опухоли и рецидивов составила 82%, а специфичность 72%, диагностическая точность соответствовала 78%, что отражено на рис. 6.2.

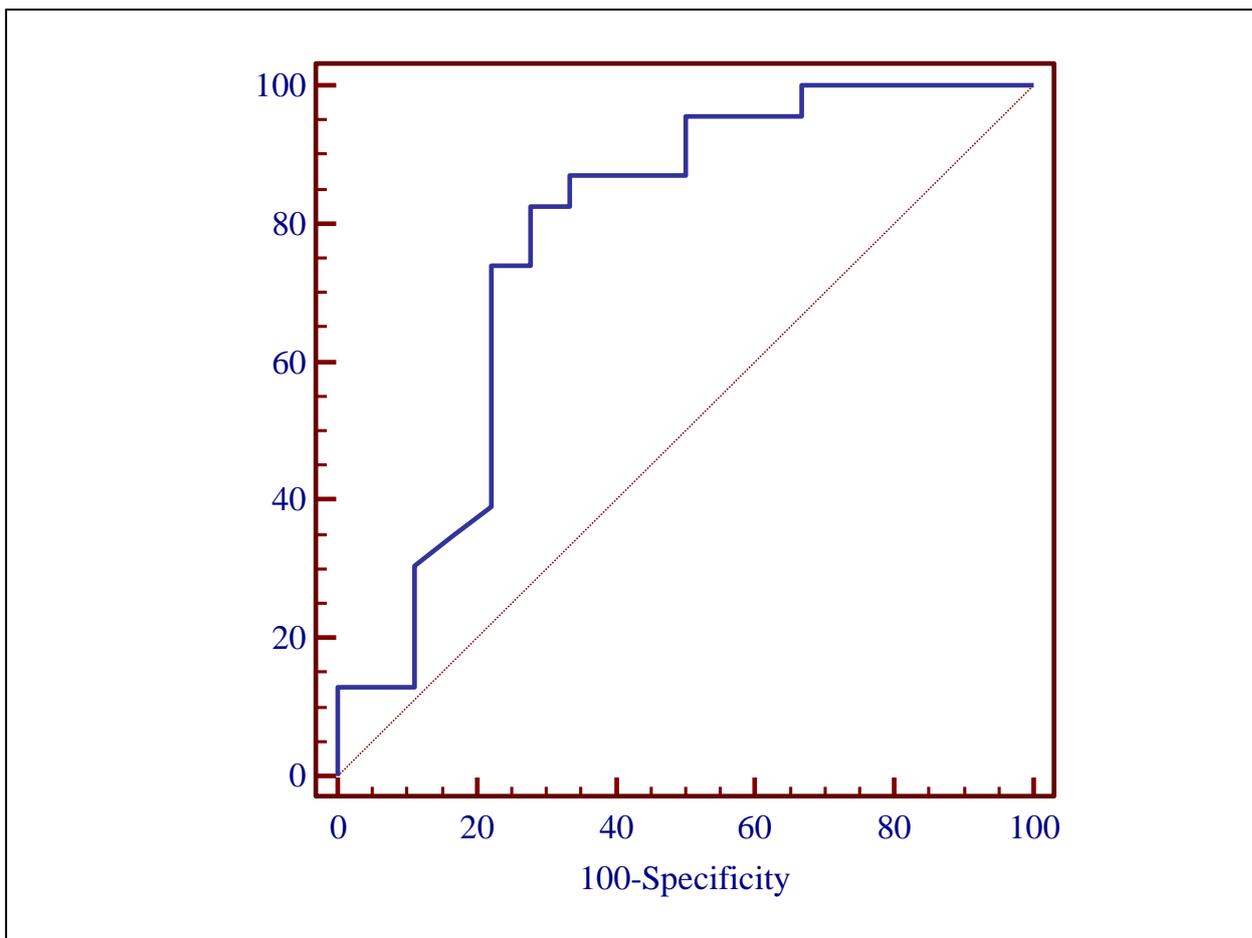


Рис. 6.2. ROC-кривая для определения риска роста опухоли и рецидивов у больных раком СОПР по результатам исследования ротовой жидкости, зубного налета и биоптата опухоли.

Заключение о высоком риске прогрессирования заболевания и метастазирования вследствие выраженного метастатического потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР  $T_2-3N_{0-2}M_0$  в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 16,5 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 18 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A выше 105 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  сильно выраженная (то есть, число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный или фактор HIF-1 $\alpha$  уже транслоцирован в ядро и является активатором других транскрипционных факторов (табл. 6.4).

Таблица 6.4

**Этапы формирования заключения о высоком риске прогрессирования и метастазирования заболевания**

Стадирование заболевания	Больные раком СОПР стадии T <sub>1-3</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>		
Гнойно-воспалительные осложнения комбинированного лечения	Присутствуют		
Субстрат	Ротовая жидкость	Супернатант биоптата опухоли	Биоптат опухоли, ИГХ
<i>Маркер №1</i>	ЛФ	HIF-1 $\alpha$	HIF-1 $\alpha$
Изменение	Снижение	Повышение	Экспрессия 3+, тип окрашивания цитоплазмально-ядерный
Критическая точка	1,9 мкг/дл	16,5 УЕ/мг белка в лунке	Число позитивных клеток более 50%
<i>Маркер №2</i>		NF-kB p65	
Изменение		Повышение	
Критическая точка		18 УЕ/мг белка в лунке	
<i>Маркер №3</i>		VEGF-A	
Изменение		Повышение	
Критическая точка		105 пг/мг	
Заключение	Высокий риск прогрессирования заболевания и метастазирования. Высокий метастатический потенциал.		
Патогенетическое объяснение	Низкая стабилизация HIF-1 $\alpha$ за счет низкого содержания лактоферрина, транслокация HIF-1 $\alpha$ в ядро, активация транскрипционных факторов NF-kB, стимуляция ангиогенеза, образование новой сосудистой сети, повышение метастатического потенциала.		

Диагностическая чувствительность алгоритма для заключения о высоком риске прогрессирования заболевания и метастазирования составила

91%, а специфичность 67%, диагностическая точность соответствовала 81%, что отражено на рис. 6.3.

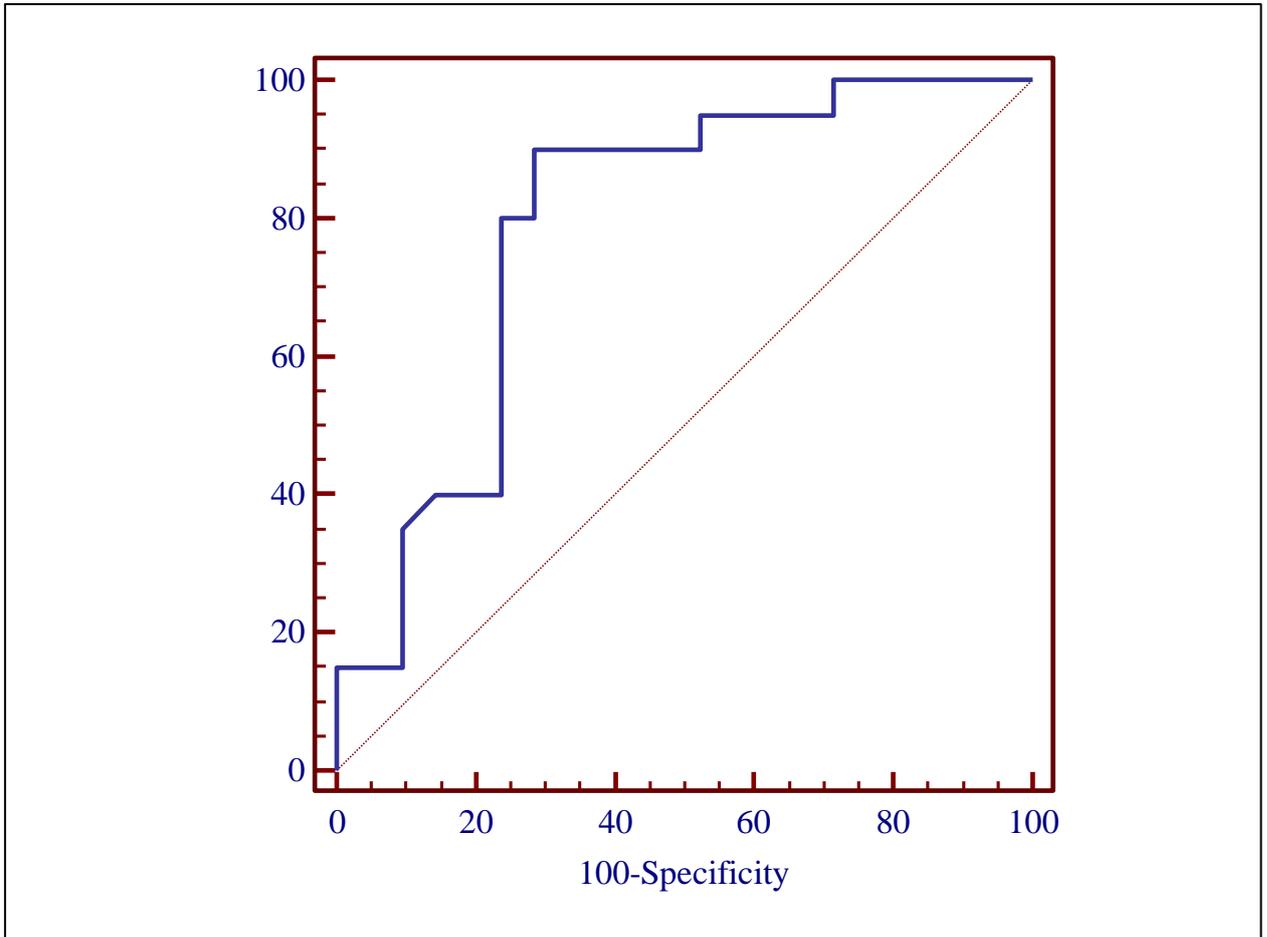


Рис.6.3. ROC-кривая для определения риска прогрессирования заболевания и метастазирования у больных раком СОПР по результатам исследования ротовой жидкости, зубного налета и биоптата опухоли.

Этапы формирования заключения о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения отражены в таблице 6.5. Заключение о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений после операции формируется, если у больного со стадией рака СОПР  $T_{2-3}N_{0-2}M_0$  в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, провоспалительного цитокина ИЛ-8 – выше 3335 пг/мл, ростового фактора VEGF выше 32 пг/мл, в зубном налете выявляются *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в концентрации выше  $10^4$  кл/мл, *Porphyromonas gingivalis* – выше  $10^5$  кл/мл, *Treponema denticola* – выше  $10^6$  кл/мл. Обращает на себя внимание факт, что диагностически значимым является именно

исходное снижение антимикробного пептида лактоферрина до операции еще до развития гнойно-воспалительных осложнений. При развитии гнойно-деструктивных процессов в ротовой полости лактоферрин многократно возрастал до 20-30 мкг/дл.

Таблица 6.5

**Этапы формирования заключения о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения**

Субстрат	Ротовая жидкость	Зубной налет
<i>Маркер №1</i>	ЛФ	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Изменение	Снижение	Выявление, превышение КЗК
Критическая точка	1,9 мкг/дл	10 <sup>4</sup> кл/мл
<i>Маркер №2</i>	ИЛ-8	Porphyromonas gingivalis
Изменение	Повышение	Выявление, превышение КЗК
Критическая точка	3335 пг/мл	10 <sup>5</sup> кл/мл
<i>Маркер №3</i>	VEGF	Treponema denticola
Изменение	Повышение	Выявление, превышение КЗК
Критическая точка	32 пг/мл	10 <sup>6</sup> кл/мл
Заключение	Высокий риск развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения	
Патогенетическое объяснение	Снижение антимикробной защиты за счет низкого уровня лактоферрина, повышение титра патогенной микрофлоры ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF, способствующего повышению просвета кровеносных сосудов, их проницаемости, хемотаксису макрофагов и гранулоцитов	

Патогенетическое объяснение разработанного алгоритма видится в следующем: снижение антимикробной защиты за счет низкого уровня лактоферрина, а также повышение титра патогенной микрофлоры ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF, способствующего повышению просвета кровеносных сосудов, их проницаемости, хемотаксису макрофагов и

гранулоцитов, способствует в дальнейшем развитию гнойно-деструктивных осложнений комбинированного лечения.

Диагностическая чувствительность алгоритма для заключения о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения составила 83%, специфичность 69%, диагностическая эффективность соответствовала 76%, что отражено на рис. 6.4.

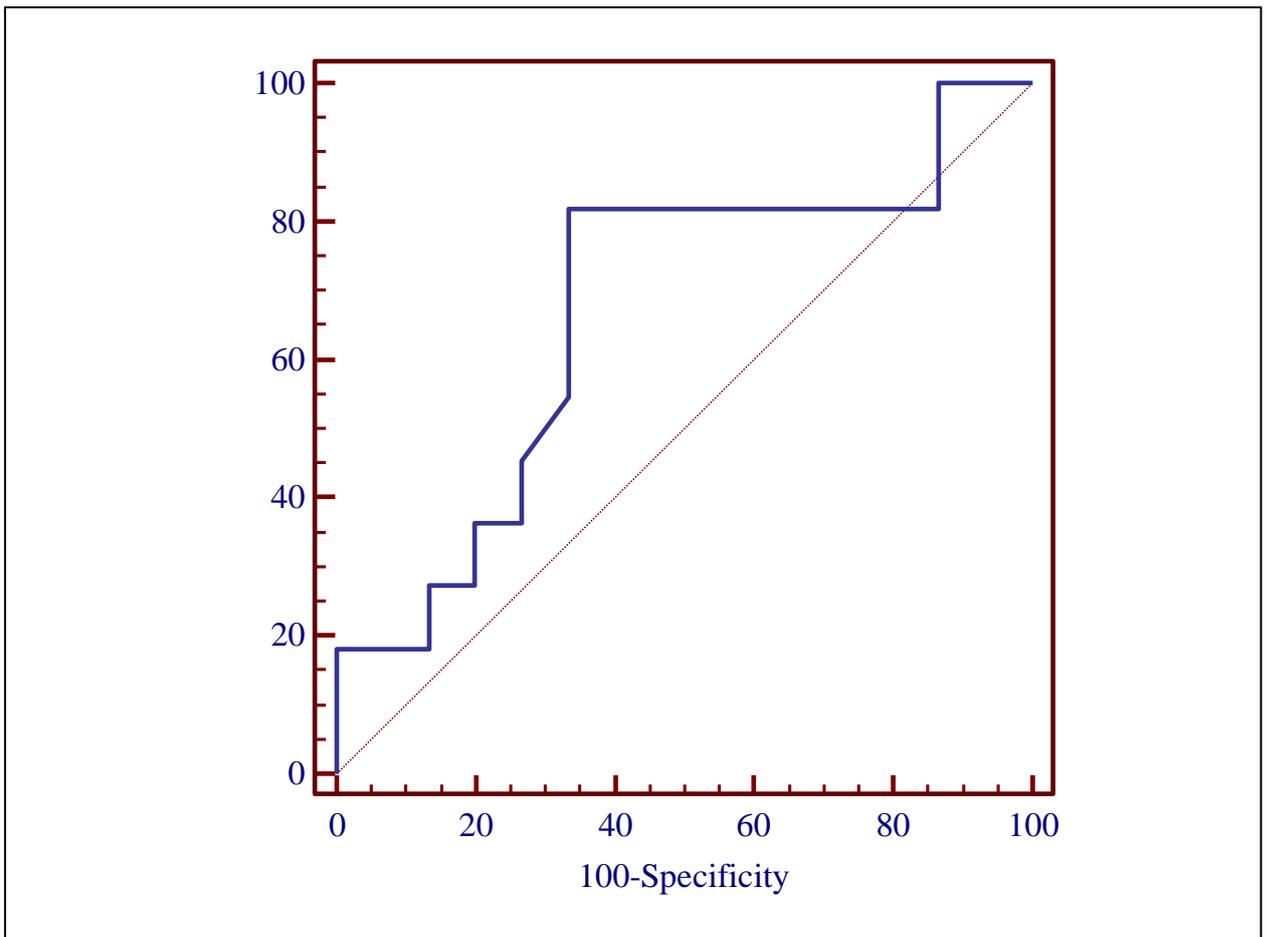


Рис. 6.4. ROC-кривая для определения риска развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР по результатам исследования ротовой жидкости и зубного налета.

Итоговый алгоритм одновременной оценки риска развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания отражен в таблице 6.6.

Таблица 6.6

**Итоговый алгоритм оценки риска развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания**

Ротовая жидкость			Зубной налет A.a., P.g., T.d. >K3K	Биоптат опухоли					
ЛФ	ИЛ-8	VEGF		Супернатант				ИГХ	
				HIF-1α	NF-kB p65	VEGF		HIF-1α	
↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	3+	ц/я	
<b>Высокий риск гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения</b>									
<b>Высокий риск роста опухоли и рецидивов</b>									
<b>Высокий риск прогрессирования и метастазирования опухоли</b>									

Суммарное количество верно квалифицированных и ложных заключений позволило рассчитать параметры итоговой ROC-кривой (рис.6.4).

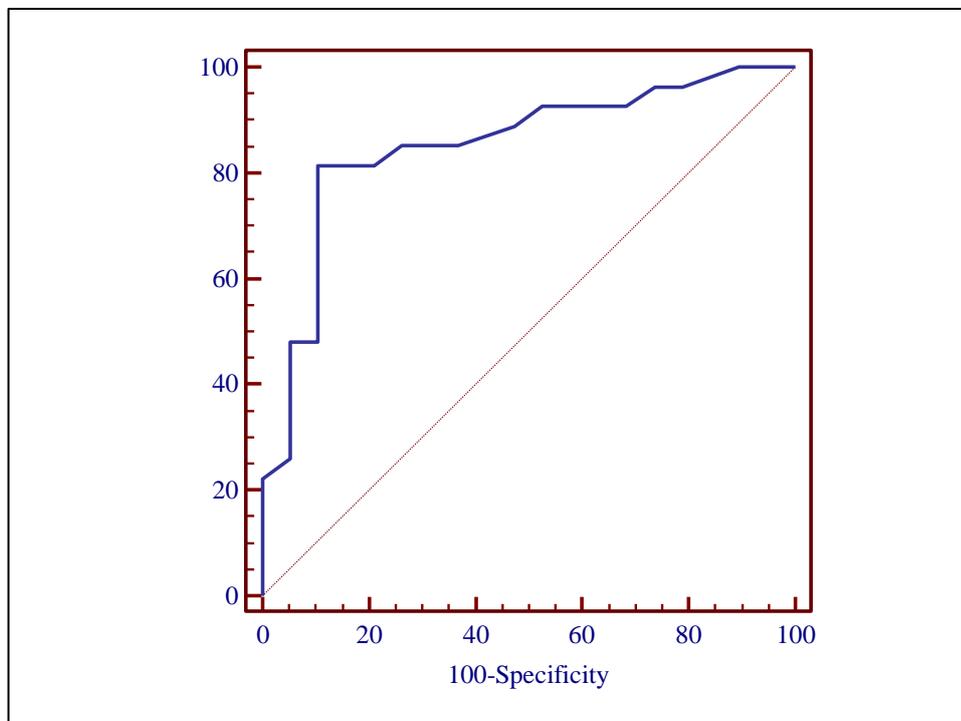


Рис. 6.4. ROC-кривая для определения риска развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания у больных раком СОПР.

Диагностическая чувствительность итогового алгоритма составила 82%, специфичность 89%, диагностическая точность соответствовала 85%.

## **6.2. Эффективность оптимизации противоопухолевой терапии рака СОПР с целью профилактики и коррекции гнойных осложнений путем активации врожденных антимикробных механизмов и стабилизации транскрипционной активности NF-1 $\alpha$**

Методика прогнозирования прогрессирования заболевания и риска развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений была апробирована на 50 пациентах (38 мужчин и 12 женщин) проспективной группы раком СОПР со стадией T<sub>2-3</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub>. Возраст пациентов колебался от 36 до 63 лет, составив в среднем 57,1 $\pm$ 2,3 лет. Пациенты проспективной группы не входили в основную группу и группу сравнения. Распределение больных проспективной группы по стадии TNM рака СОПР было следующим: T2N0M0 – 9 (18%), T2N1M0 – 17 (34%), T3N0M0 - 10 (20%), T3N1M0 - 14 (28%).

Среди 50 пациентов проспективной группы низкий риск прогрессирования рака СОПР был установлен у 11 (22%), высокий риск роста опухоли и рецидивов – у 15 (30%), высокий риск прогрессирования заболевания и метастазирования – 24 (48%) пациентов, высокий риск развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений – у 33 (66%) больных. Среди 33 пациентов с высоким риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений у 12 (36,4%) больных был одновременно выявлен высокий риск роста опухоли и рецидивов, а у 21 (63,6%) - высокий риск метастазирования.

Из 33 больных с высоким риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений 17 (51,5%) пациентам в послеоперационный период был дополнительно назначен препарат на основе лактоферрина

Лапрот внутривенно и местно, а 16 (48,5%) больных получали стандартную терапию без оптимизации.

У больных в двух подгруппах, дополнительно получавших препарат на основе лактоферрина, а также при отсутствии дополнительных терапевтических мер, проводили сравнительный анализ сроков заживления послеоперационной раны (табл. 6.7), частоты осложнений послеоперационного периода, проводили качественно-количественный анализ патогенных микроорганизмов в зубном налете, определяли уровни лактоферрина, ИЛ-8 в слюне, в биоптатах тканей, полученных при некрэктомии, оценивали содержание в супернатантах ткани HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A, определяли тип окрашивания клеток при ИГХ исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани СОПР.

**Таблица 6.7**

**Сроки и вид заживления у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Показатели	Больные с высоким риском гнойно-воспалительных п/о осложнений		p
	Лапрот+ (n=17)	Лапрот- (n=16)	
Сроки эпителизации тканей ротовой полости, мес.	4,2 $\pm$ 1,3	6,7 $\pm$ 1,5	<0,05
Заживление первичным натяжением, абс. (%)	14 (82,4%)	4 (25%)	0,003
Заживление вторичным натяжением, абс. (%)	3 (17,6%)	12 (75%)	0,003

У пациентов, получавших Лапрот, сроки эпителизации тканей ротовой полости были короче на 37,3% (p<0,05) по сравнению с пациентами без

оптимизации терапии ( $4,2 \pm 1,3$  мес. против  $6,7 \pm 1,5$  мес.). Заживление раны первичным натяжением у больных при оптимизации послеоперационного лечения происходило в 82,4% ( $n=14$ ), что было чаще ( $p=0,003$ ) по сравнению с пациентами без оптимизации терапии (25%). Высокая частота заживления раны вторичным натяжением у больных, не получавших Лапрот, была обусловлена частой встречаемостью гнойно-некротических послеоперационных осложнений (табл. 6.8).

Таблица 6.8

**Структура гнойно-некротических послеоперационных осложнений у больных при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Оложнения	Больные с высоким риском гнойно-воспалительных п/о осложнений				p
	Лапрот+ (n=17)		Лапрот- (n=16)		
	Абс.	%	Абс.	%	
Частичный некроз лоскута	1	5,9	3	18,8	0,55
Частичный некроз культи языка, остатков слизистой альвеол нижней челюсти и дна полости рта	-	-	2	12,5	-
Абсцессы и флегмона ЧЛО	-	-	3	18,8	-
Нагноение кожной послеоперационной раны, формирование оростомы, свищей	2	11,8	3	18,8	0,94
Остеомиелит нижней челюсти	-	-	1	6,3	-
Всего	3	17,6	12	75,0	0,003

Общее число гнойных осложнений среди пациентов, не получавших препарата на основе лактоферрина, было статистически значимо чаще ( $p=0,003$ ) по сравнению с больными, у которых послеоперационная терапия была оптимизирована (75% против 17,6%). Однако, достоверное различие частоты частных случаев осложнений не наблюдалось. Гнойные осложнения

со стороны лоскута (частичный некроз лоскута) в подгруппе Лапрот+ наблюдались в 5,9%, а в подгруппе Лапрот- в 18,8%. У одного из больных без оптимизации терапии в результате некроза и его отторжения имело место кровотечение, которое было остановлено тампонированием, лигированием кровоточащего сосуда и прошиванием его в ране.

Частичный некроз культи языка, остатков слизистой альвеол нижней челюсти и дна полости рта имели место только у 2 (12,5%) больных из подгруппы, не получавших препарата на основе лактоферрина. Нагноение кожной послеоперационной раны, формирование оростомы, свищей отмечалось в подгруппе, получавших Лапрот в 11,8%, а в подгруппе без оптимизации терапии в 18,8%. Остеомиелит возник у одного пациента (6,3%) из подгруппы Лапрот- с локализацией опухоли на альвеолярном отростке челюсти.

Таким образом, использование препарата на основе лактоферрина, обладающего целым комплексом доказанных свойств – антибактериальными, антиоксидантами, иммуномодулирующими, антисептическими, у больных раком СОПР в послеоперационный период привело к снижению общего числа гнойно-некротических осложнений.

Качественное и количественное соотношение в зубном налете бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, у пациентов двух подгрупп определяли через 2 недели после операции (табл. 6.9).

У больных, получавших дополнительно препарат на основе лактоферрина, для всех изучаемых бактерий частота превышений клинически значимой концентрации была статистически значимо ниже по сравнению в пациентами со стандартным лечением: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – 64,7% против 100% ( $p=0,03$ ), *Treponema denticola* – 64,7% против 100% ( $p=0,03$ ), *Porphyromonas gingivalis* – 58,8% против 93,8% ( $p=0,05$ ), *Prevotella intermedia* - 58,8% против 93,8% ( $p=0,05$ ), *Fusobacterium nucleatum* 29,4% против 81,3% ( $p=0,008$ ), *Porphyromonas endodontalis* - 35,3%

против 81,3% ( $p=0,02$ ), *Tannerella forsythensis* - 35,3% против 75% ( $p=0,05$ ) (табл. 6.9).

Таблица 6.9

**Частота качественного выявления микробов зубного налета у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Вид микроба	Больные с высоким риском гнойно-воспалительных п/о осложнений				p
	Лапрот+ (n=17)		Лапрот- (n=16)		
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	11	64,7	12	75,0	0,79
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	58,8	15	93,8	0,05
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	8	47,1	16	100,0	0,002
<i>Treponema denticola</i>	8	47,1	15	93,8	0,01
<i>Prevotella intermedia</i>	9	52,9	14	87,5	0,05
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7	41,2	13	81,3	0,04
<i>Tannerella forsythensis</i>	11	64,7	12	75,0	0,79

Частота превышений клинически значимой концентрации (КЗК) микробов зубного налета у больных при дополнительном назначении препарата на основе лактоферрина была статистически значимо ниже по сравнению с пациентами, не получавшими Лапрот, для всех изучаемых микробов: *Porphyromonas endodontalis* (35,3% против 81,3%,  $p=0,02$ ), *Porphyromonas gingivalis* (58,8% против 93,8%,  $p=0,05$ ), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (64,7% против 100%,  $p=0,03$ ), *Treponema denticola* (64,7% против 100%,  $p=0,03$ ), *Prevotella intermedia* (58,8% против 93,8%,  $p=0,05$ ), *Fusobacterium nucleatum* (29,4% против 81,3%,  $p=0,008$ ), *Tannerella forsythensis* (35,3% против 75,0%,  $p=0,05$ ) (табл. 6.10).

Следовательно, использование препарата на основе антимикробного пептида лактоферрина, позволило снизить частоту встречаемости и число превышений клинически значимой концентрации микробов ротовой полости, ассоциированных с развитием гнойно-деструктивных процессов.

Таблица 6.10

**Частота превышений КЗК микробов зубного налета у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Вид микроба	Больные с высоким риском гнойно-воспалительных п/о осложнений				p
	Лапрот+ (n=17)		Лапрот- (n=16)		
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	6	35,3	13	81,3	0,02
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	58,8	15	93,8	0,05
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	11	64,7	16	100,0	0,03
<i>Treponema denticola</i>	11	64,7	16	100,0	0,03
<i>Prevotella intermedia</i>	10	58,8	15	93,8	0,05
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5	29,4	13	81,3	0,008
<i>Tannerella forsythensis</i>	6	35,3	12	75,0	0,05

У больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без использования препарата на основе лактоферрина в ротовой жидкости определяли только содержание лактоферрина и интерлейкина-8 (таблица 6.11), поскольку факторы транскрипции оценивали непосредственно в ткани. Исходно различия в концентрации лактоферрина и ИЛ-8 в двух подгруппах отсутствовали ( $p > 0,05$ ). Однако, динамика изучаемых показателей в зависимости от дополнительных терапевтических мер была различной. У

больных, которым был назначен Лапрот, содержание лактоферрина в слюне возрастало в 6,3 раза ( $p < 0,001$ ) с  $1,83 \pm 0,21$  мкг/дл до  $11,5 \pm 0,36$  мкг/дл, а ИЛ-8 снижался на 75,4% ( $p < 0,001$ ) с  $3348 \pm 30,5$  пг/мл до  $824 \pm 11,8$  пг/мл. У пациентов, не получавших Лапрот, концентрация лактоферрина слюны статистически значимо не изменялась ( $p > 0,05$ ), а содержание ИЛ-8 снижалось с  $3352 \pm 28,1$  пг/мл до  $2948 \pm 25,3$  пг/мл на 12% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6.11

**Содержание лактоферрина и интерлейкина-8 у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Показатель	Лапрот+ (n=17)		Лапрот- (n=16)	
	До операции	После лечения	До операции	После лечения
Лактоферрин, мкг/дл	$1,83 \pm 0,21$	$11,5 \pm 0,36^{*o}$	$17,9 \pm 1,9$	$22,4 \pm 2,4$
ИЛ-8, пг/мл	$3348 \pm 30,5$	$824 \pm 11,8^{*o}$	$3352 \pm 28,1$	$2948 \pm 25,3^{*}$

Примечание: \* - достоверные отличия показателей до и после операции при  $p < 0,05$ , ° - достоверные отличия у больных Лапрот+ и Лапрот- при  $p < 0,05$ .

Таким образом, назначение препарата на основе лактоферрина, сопровождалось усилением антимикробной защиты слюны и снижением провоспалительного медиатора ротовой жидкости.

Биоптат СОПР был взят у больных проспективной группы в случае некрэктомии, лечении абсцессов и других гнойно-деструктивных осложнений в послеоперационный период. Это позволило повторно оценить содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани и провести ИГХ исследование с оценкой экспрессии ИЛ-1 $\alpha$  и особенностей распределения фактора в цитоплазме и ядре у пациентов при применении препарата на основе лактоферрина и при стандартной терапии. Число пациентов, у которых двухкратно до операции и в

послеоперационный период после курса Лапрота был взят биоптат СОПР составило 13, а при стандартной терапии – 15.

До операции содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений в двух подгруппах не различалось ( $p>0,05$ ) (табл. 6.12). После лечения с дополнительным назначением Лапрота в опухолевом гомогенате транскрипционные факторы HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p65 снижались на 23,8% ( $p<0,05$ ) и 30,2% ( $p<0,05$ ) (рис.6.5-6.6), соответственно, васкулососудистый фактор роста VEGF-A снижался на 15,7% ( $p<0,05$ ) (рис.6.7).

Таблица 6.12

**Содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Показатель	Лапрот+ (n=13)		Лапрот- (n=15)	
	До операции	После лечения	До операции	После лечения
HIF-1 $\alpha$ , УЕ/мг белка в лунке	17,8 $\pm$ 1,8	12,8 $\pm$ 1,5* <sup>o</sup>	17,2 $\pm$ 1,3	16,8 $\pm$ 1,5
NF-kB p65, УЕ/мг белка в лунке	18,7 $\pm$ 1,1	13,4 $\pm$ 1,6* <sup>o</sup>	18,5 $\pm$ 1,5	19,2 $\pm$ 1,7
VEGF-A, пг/мг	106,6 $\pm$ 2,7	92,2 $\pm$ 3,3* <sup>o</sup>	105,7 $\pm$ 2,1	109,4 $\pm$ 2,9

Примечание: \* - достоверные отличия показателей до и после операции при  $p<0,05$ , <sup>o</sup> - достоверные отличия у больных Лапрот+ и Лапрот- при  $p<0,05$ .

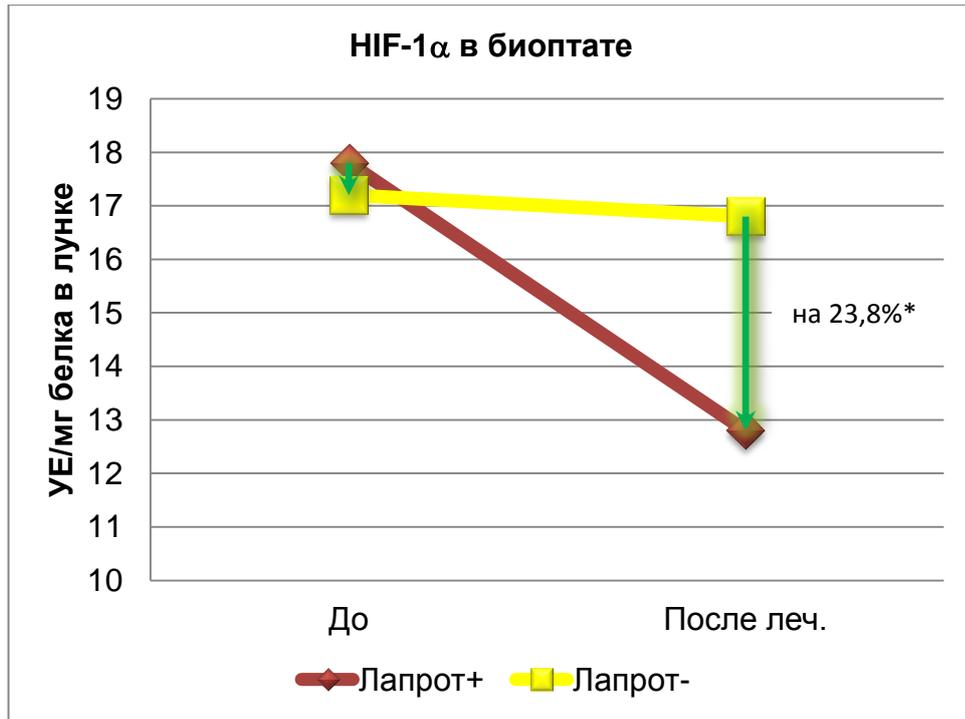


Рис. 6.5. Динамика гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в опухолевом биоптате у больных при дополнительном назначении и отсутствии применения Лапрота. \* - достоверное отличие у больных Лапрот+ и Лапрот- при  $p < 0,05$ .

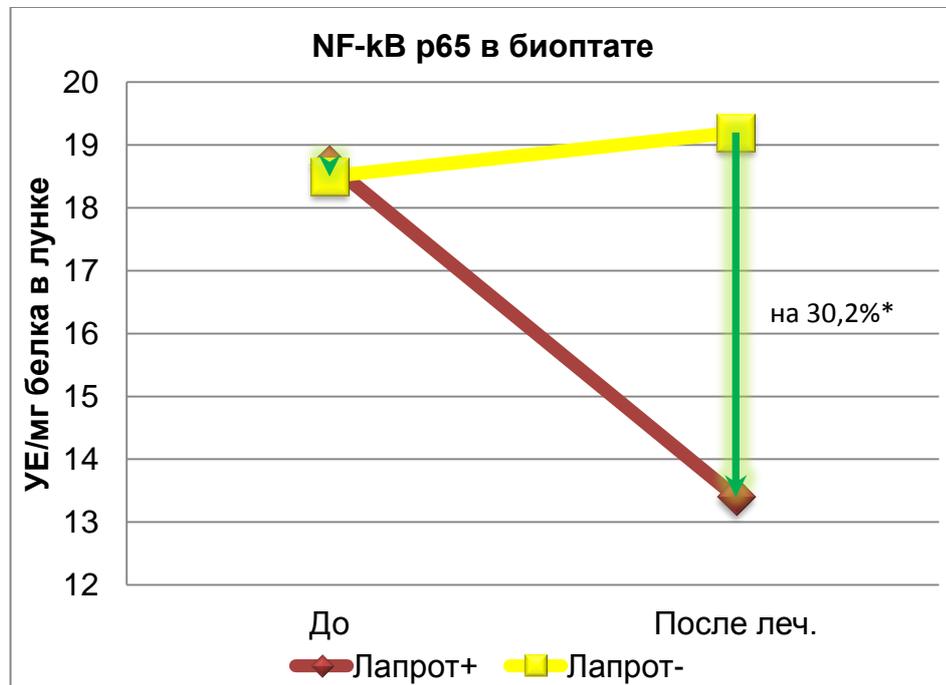


Рис. 6.6. Динамика транскрипционного фактора NF-kB p65 в опухолевом биоптате у больных при дополнительном назначении и отсутствии применения Лапрота. \* - достоверное отличие у больных Лапрот+ и Лапрот- при  $p < 0,05$ .

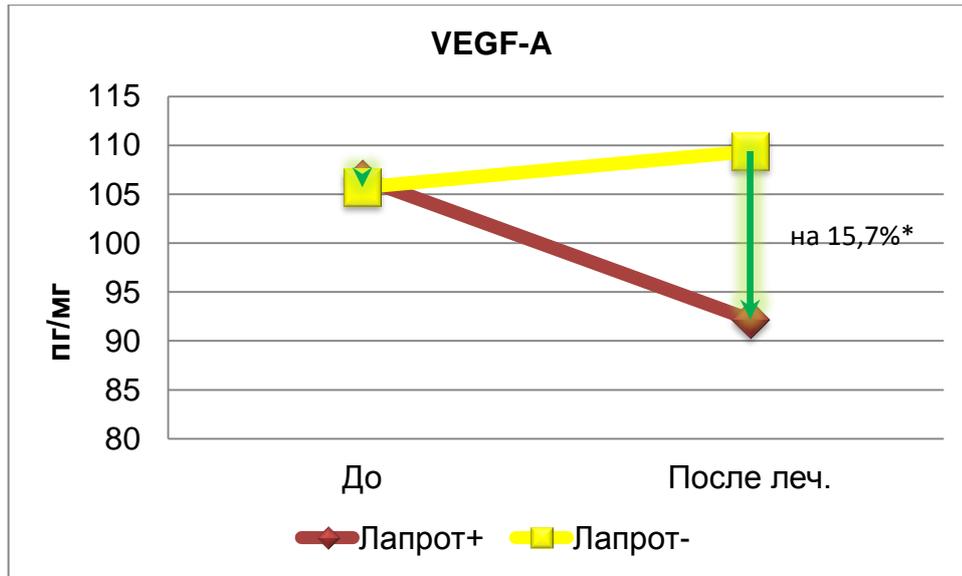


Рис. 6.7. Динамика в опухолевом биоптате ростового фактора VEGF-A у больных при дополнительном назначении и отсутствии применения Лапрота. \* - достоверное отличие у больных Лапрот+ и Лапрот- при  $p < 0,05$ .

ИГХ исследование экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных при дополнительном назначении и без использования препарата на основе лактоферрина показало, что достоверное снижение выраженности экспрессии с 3+ до 2+ имело место только при дополнительном назначении Лапрота (табл. 6.13).

**Таблица 6.13**

**Характеристика экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Назначение препарата	Этап	Уровень экспрессии HIF-1 $\alpha$			Всего
		1+	2++	3+++	
Лапрот+	Исх.	-	1 (7,7%)	12 (92,3%)	13 (100%)
	После леч.	-	9 (69,2%)*	4 (30,8%)*	13 (100%)
Лапрот-	Исх.	-	2 (13,3%)	13 (86,7%)	15 (100%)
	После леч.	-	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100%)

Примечание: \* - достоверное отличие между группами при  $p < 0,05$ .

Оптимизация терапии у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений хотя и не привела к статистически значимому снижению частоты цитоплазменной локализации HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках, но появилась тенденция к повышению частоты нахождения HIF-1 $\alpha$  в цитоплазме без транслокации в ядро (табл. 6.14).

Таблица 6.14

**Характеристики типа окрашивания клеток опухоли при ИГХ исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани опухоли у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина**

Назначение препарата	Этап	Тип окрашивания		
		цтм	яд-цтм	всего
Лапрот+	Исх.	-	13 (100%)	13 (100%)
	После леч.	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13 (100%)
Лапрот-	Исх.	-	15 (100%)	15 (100%)
	После леч.	1 (6,7%)	14 (93,3%)	15 (100%)

Исходно в двух подгруппах цитоплазменная локализация HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках не встречалась. После лечения в подгруппе Лапрот+ цитоплазменный тип окрашивания клеток встречался в 38,5%, а при отсутствии оптимизации лечения – в 6,7%.

Итак, применение препарата на основе лактоферрина у больных с высоким риском гнойных осложнений позволило снизить частоту гнойно-некротических послеоперационных осложнений за счет усиления антимикробного потенциала слюны, ограничившего число превышений клинически значимой концентрации патогенных микробов ротовой полости, снижения провоспалительного медиатора ротовой жидкости ИЛ-8. При оптимизации терапии после операции снижение числа гнойно-

воспалительных послеоперационных осложнений было сопряжено с ограничением пролиферативного и метастатического потенциала: в опухолевом гомогенате снижалась концентрация транскрипционных факторов HIF-1 $\alpha$  и NF- $\kappa$ B p65, васкулосудистого фактора роста VEGF-A, выраженность экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани, намечалась тенденция к ограничению транслокации HIF-1 $\alpha$  в ядро. Следовательно, при применении препарата на основе лактоферрина кроме иммуномодулирующего, антимикробного развивался еще и противоопухолевый эффект, что важно при профилактике и лечении гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применяемое комплексное лечение рака СОПР в значительной мере определяет развитие гнойных осложнений в послеоперационный период (Иванов В.М. с соавт., 2013), так как цитостатический эффект от лучевого воздействия и химиотерапии у этого контингента больных может вести к мукозиту с вовлечением в этот процесс всех составных компонентов ротовой полости: самой слизистой, малых и больших слюнных желёз, костных структур с изменениями в зубах, а также сопровождаться остеомиелитом (Попович В.И., 2000). У пациентов раком СОПР после лучевого, химиотерапевтического и оперативного воздействия эрозивно-язвенные изменения СОПР развиваются в 85,1%, инфекционные раневые осложнения, связанные с некрозом кожно-мышечного или кожно-жирового лоскутов в 55,4%, ангулярный стоматит в 13,8%, остеомиелит челюсти в 13,4% (Матякин Е.Г. с соавт., 2013).

Наличие различной микрофлоры в ротовой полости, способной в любой момент привести к серьезным гнойно-воспалительным осложнениям, обостряющимся при проведении химиолучевой терапии, является дополнительным патогенным фактором. Данные обстоятельства заставляют постоянно совершенствовать профилактические лечебные мероприятия, повышать кратность осмотров, изучать и совершенствовать методы прогнозирования осложнений в полости рта у больных раком СОПР. Однако, в настоящее время не решен главный вопрос для онкологов. Не сказывается ли развитие гнойных осложнений на прогрессии основного заболевания у больных раком СОПР? Если сказывается, то какие механизмы лежат в основе данного сопряжения?

В литературных исследованиях показано, что гипоксия-индуцибельный фактор-1 $\alpha$  способствует местному ограничению воспалительного процесса (Kim S.Y. et al., 2011). Бактериальная инфекция активирует подкласс NF-1 $\alpha$  генов-мишеней, специфически связанных с уничтожением микробов,

демонстрируя посредством этого, что HIF-1 $\alpha$  обладает жизненно важной функцией во врожденном иммунитете и способствует ограничению системного распространения инфекции из первоначального источника. Повышенная активность HIF-1 $\alpha$  содействует синтезу защитных факторов и увеличивает бактерицидную активность, обеспечивает способы усиления врожденных иммунных реакций на микробную, в том числе бактериальную, инфекцию. При этом, HIF-1 $\alpha$  является фактором, активирующим транскрипцию клеток при попадании в ядро, стимулирует секрецию факторов неоангиогенеза (De Lima P.O. e al., 2014), что может напрямую сказываться на течении онкологического заболевания.

Исходя из вышеизложенного, целью работы было выявить на основе молекулярных, иммунологических, иммуногистохимических изменений ткани опухоли, ротовой жидкости и микробиологических исследований зубного налета больных раком СОПР патогенетические взаимосвязи развития гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования рака СОПР для выявления факторов прогноза их развития и оптимизации подходов к лечению гнойно-деструктивных процессов полости рта.

Всего в работе было обследовано 212 больных. Клиническую группу составили 141 больной первичным резектабельным раком СОПР T<sub>1-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> и 21 пациент со стадией T<sub>4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0-1</sub>. В зависимости от наличия или отсутствия гнойных осложнений пациенты клинической группы были разделены на две группы: основная и группа сравнения. Основную группу (n=96) составили больные, у которых после химиолучевого и хирургического лечения развивались гнойные осложнения: некроз мышечного или кожно-жирового лоскута, используемого для пластики, остеомиелит нижней челюсти, флегмона нижней челюсти. У больных группы сравнения (n=45) гнойные осложнения не наблюдались. Группу здоровых доноров составили 35 пациентов без онкологической патологии. Проспективная группа (n=50) была

организована для оценки эффективности разработанных алгоритмов прогнозирования и лечения.

В первые 12 мес. после окончания комбинированного первичного лечения в 68% больных раком СОПР со стадией  $T_{1-3}N_{0-2}M_0$  наблюдали гнойные осложнения, куда были объединены местные раневые осложнения, в том числе некроз кожно-мышечного лоскута, некроз кожно-жирового лоскута, а также абсцессы и флегмона ЧЛЮ, остеомиелит нижней челюсти, сепсис. Гиперпластический гингивит, эрозивно-язвенный гингивит, ангулярный стоматит, оральный мукозит рассматривались как воспалительные последствия комбинированного лечения рака СОПР. У больных раком СОПР со стадией  $T_4N_{1-2}M_{0-1}$  гнойные осложнения в первые 12 мес. после окончания комбинированного первичного лечения наблюдались чаще – в 90,5%.

У больных основной группы и группы сравнения проводили сравнительный анализ частоты прогрессирования рака СОПР. Рецидив опухоли (21,9% против 4,4%,  $p=0,009$ ), метастазы в региональные лимфоузлы (33,3% против 15,6%,  $p=0,028$ ), летальный исход (26% против 8,9%,  $p=0,02$ ), общее число случаев прогрессии заболевания (40,6% против 8,9%,  $p=0,0001$ ) достоверно чаще ( $p<0,05$ ) наблюдались в основной группе по сравнению с группой сравнения. Таким образом, от наличия или отсутствия гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком СОПР зависела частота прогрессирования основного заболевания, что требовало дальнейшего изучения сопряжения этих двух фактов.

В ближайшие два года после окончания первичного комбинированного лечения при наличии гнойных осложнений по сравнению с группой сравнения относительный риск развития рецидива опухоли составил 1,44 ( $p=0,001$ ), относительный риск метастазирования в региональные узлы был 1,31 ( $p=0,012$ ), риск развития летального исхода соответствовал 1,36 ( $p=0,003$ ).

Таким образом, у больных раком СОПР наличие гнойных осложнений комбинированного лечения было ассоциировано с последующим развитием прогрессирования заболевания.

Для развития гнойных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР были установлены исходные патогенетические механизмы: снижение антимикробной защиты за счет низкого уровня антимикробного белка лактоферрина, повышение титра патогенной микробиоты ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF, способствующего повышению просвета кровеносных сосудов, их проницаемости, хемотаксису макрофагов и гранулоцитов. По результатам исследования зубного налета и слюны методом ПЦР в реальном времени и масс-спектрометрии развитие гнойных осложнений после хирургических вмешательств в составе комбинированного первичного лечения у больных раком СОПР ассоциировано с наличием в зубном налете бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* в концентрациях, превышающих клинически значимую, различием интенсивности масс-спектров для белков слюны SERPINA1, F2 предшественник протромбина, гипоксия индуцибельный фактор 1.

Рак СОПР зачастую сопровождается быстрым и неограниченным ростом, что ведет к формированию тканевой гипоксии (Brennan P.A. et al., 2004). Гипоксия индуцибельный фактор-1 является ключевым медиатором ответа ткани на гипоксию (Lin P.Y. et al., 2008). HIF1 $\alpha$  функционирует как активатор транскрипции при гипоксии. Связываясь с промоторами более 100 генов, регулирующих рост опухоли, фактор HIF1 $\alpha$  участвует в канцерогенезе (Eckert A.W. et al., 2012). HIF1 $\alpha$  при развитии гипоксии в опухолевой ткани стимулирует ген синтеза фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Данное обстоятельство усиливает ангиогенез и адаптацию ткани к гипоксии. Кроме того, HIF-1 $\alpha$  влияет на

течение воспалительного процесса (Kim S.Y. et al., 2011), регулируя синтез важных молекулярных эффекторов иммунной защиты, включая гранулированные протеазы, антимикробные пептиды, оксид азота и фактор некроза опухоли- $\alpha$ . Повышенная активность HIF-1 $\alpha$  содействует синтезу защитных факторов и увеличивает бактерицидную активность, обеспечивает способы усиления врожденных иммунных реакций на микробную, в том числе бактериальную, инфекцию.

От экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в опухоли у больных раком СОПР зависела клиническая картина основного заболевания. Чем выше содержание HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и выше экспрессия в опухоли, чем ниже был уровень дифференцировки клеток и способности к метастазированию в региональные лимфоузлы. При повышении размеров опухоли от T1 до T3 и стадии заболевания от I к III имелась тенденция к возрастанию экспрессии HIF-1 $\alpha$  и количественного содержания в опухоли. Только резкое возрастание концентрации HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате и выраженности экспрессии фактора у больных с T4 и IV стадией приводило к статистически значимому сопряжению уровня экспрессии фактора и размеров опухоли. Повышение содержания HIF-1 $\alpha$  в опухолевом гомогенате у больных раком СОПР сопровождалось активацией ядерного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, что наиболее тесно проявлялось при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток. При метастазировании в региональные лимфоузлы была выявлена тесная связь между повышением содержания HIF-1 $\alpha$  и VEGF-A, что способствовало активации неоангиогенеза. Стабилизация HIF-1 $\alpha$  с ограничением его транслокации в ядро при раке СОПР достигалась при региональном возрастании уровня ЛФ в ротовой жидкости. Именно от локализации HIF-1 $\alpha$  в опухолевой клетке зависели такие признаки как размер опухоли и способность к метастазированию в лимфоузлы, дифференцировка клеток. Следовательно,

стабилизировать HIF-1 $\alpha$  в цитоплазме возможно через лактоферрин-зависимый механизм.

К белкам, участвующим в процессах пролиферации клеток и апоптозе, относится Bax (Goll D.E. et al., 2003; Guicciardi M.E. et al., 2003). Белки Bax ускоряют апоптоз и поэтому носят название проапоптотные. От интенсивности апоптоза во-многом зависит способность организма противостоять развитию опухоли. Проапоптотическую роль HIF-1 $\alpha$  с тесной связью с экспрессией фактора bax играл только на ранних стадиях заболевания T1-T2, что может оказывать благоприятную роль в ограничении роста опухоли. Общая выживаемость больных раком СОПР была выше при негативной и слабо выраженной экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухоли.

Развитие гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения у больных раком СОПР было сопряжено с повышением транскрипционной активности опухолевых клеток, о чем свидетельствовала повышенная экспрессия в ткани HIF-1 $\alpha$ , транслокация его из цитоплазмы в ядро, активация ядерного транскрипционного фактора карра-В, процессов неоангиогенеза.

Исследование экспрессии транскрипционных факторов в ткани опухоли рака СОПР сопряжено с инвазивным получением биоптата. Ротовая жидкость является более удобной биологической средой для проведения исследования. Определение транскрипционного фактора в свободной нестимулированной слюне может способствовать новым подходом к ранней диагностике злокачественных опухолей челюстно-лицевой области, к прогнозированию их рецидивирования и метастазирования. В связи с этим, мы определили содержание HIF-1 $\alpha$  в ротовой жидкости. Было показано, что уровень транскрипционного фактора у пациентов основной группы и группы сравнения статистически не различался. Это может быть связано со сложной белковой структурой гипоксия-зависимого фактора и трудностями его попадания в ротовую жидкость, поскольку HIF-1 $\alpha$  относится к тканевым

факторам, регулирующим транскрипцию, и более информативен при исследовании его в ткани.

Найденные выраженные различия в содержании HIF-1 $\alpha$  у больных раком СОПР на тканевом уровне и отсутствие различий при исследовании ротовой жидкости обусловили необходимость определения концентрации HIF-1 $\alpha$  на системном уровне (в сыворотке крови). В результате обнаружено, что уровень HIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови был на 82,1% выше у больных основной группы по сравнению с группой сравнения, а по сравнению со здоровыми донорами – на 150,6%.

Таким образом, выявлена взаимосвязь экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора и развития гнойных осложнений у больных раком СОПР как на тканевом, так и на системном уровне. Выявленный нами различный уровень HIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови больных раком СОПР в зависимости от наличия гнойных осложнений комбинированного лечения, а также по сравнению со здоровыми донорами, при дальнейшем исследовании может способствовать разработке диагностических тестов развития злокачественного процесса, а также для оценки течения послеоперационного периода этой категории больных.

В работе был разработан алгоритм прогнозирования развития гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания у больных раком слизистой оболочки полости рта. Дополнительное обследование больных раком СОПР для исходного прогнозирования гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания включает определение в ротовой жидкости содержания антимикробного белка лактоферрина и провоспалительного цитокина ИЛ-8, фактора роста сосудов VEGF, в зубном налете проведение качественно-количественного анализа спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, в биоптате опухоли содержание HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 и VEGF-A в супернатанте,

ИГХ оценка выраженности опухолевой экспрессии HIF-1 $\alpha$  и типа окрашивания опухолевых клеток, выраженности экспрессии маркера апоптоза bax.

У больных раком СОПР исходное повышение интенсивности масс-спектров для белков слюны SERPINA1, F2 предшественник протромбина, гипоксия индуцибельный фактор 1- $\alpha$ , выявление в зубном налете *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в концентрации выше 10<sup>4</sup> кл/мл, *Porphyromonas gingivalis* – выше 10<sup>5</sup> кл/мл, *Treponema denticola* – выше 10<sup>6</sup> кл/мл, повышение содержания в ротовой жидкости лактоферрина ниже 19 мкг/дл, провоспалительного цитокина ИЛ-8 выше 3335 пг/мл сопряжено с развитием гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения с диагностической чувствительностью 83%, диагностической специфичностью 69% и точностью 76% (p<0,001).

Заключение о высоком риске роста опухоли и рецидивов вследствие выраженного пролиферативного потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР T<sub>2-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 19 мкг/мл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 14 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 16 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 80 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  сильно выраженная (число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазменно-ядерный.

Заключение о высоком риске прогрессирования заболевания с повышением метастатического потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР T<sub>2-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 19 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 16,5 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 18 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A выше 105 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  сильно выраженная (число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазменно-ядерный.

Методика прогнозирования прогрессирования заболевания и риска развития гнойных осложнений комбинированного лечения была апробирована на 50 проспективной группы раком СОПР со стадией T<sub>2-3</sub>N<sub>0</sub><sub>1</sub>M<sub>0</sub>. Среди 50 пациентов проспективной группы низкий риск прогрессирования рака СОПР был установлен у 11 (22%), высокий риск роста опухоли и рецидивов – у 15 (30%), высокий риск прогрессирования заболевания и метастазирования – 24 (48%) пациентов, высокий риск развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений – у 33 (66%) больных. Среди 33 пациентов с высоким риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений у 12 (36,4%) больных был одновременно выявлен высокий риск роста опухоли и рецидивов, а у 21 (63,6%) - высокий риск метастазирования. Диагностическая чувствительность итогового алгоритма составила 82%, специфичность 89%, диагностическая точность соответствовала 85%.

Для профилактики гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений у онкологических больных был разработан препарат для внутривенного вливания Лапрот на основе лактоферрина. Нами учитывались признанные свойства лактоферрина, которые являются доказанными – антиоксидантные, антибактериальные и противовирусные, иммуномодулирующие (Захарова Е.Т. с соавт., 2012). Новыми объективными показаниями для применения Лапрота у больных раком СОПР при гнойных осложнениях после операции, установленными в нашей работе, были доказанное снижение лактоферрина в ротовой жидкости у больных при развитии гнойно-воспалительных осложнений и при прогрессии заболевания, а также то, что лактоферрин стабилизирует NF-1 $\alpha$  и ограничивает его транслокацию в ядро. В нашей работе было установлено, чем выше содержание ЛФ в ротовой жидкости, тем ниже частота ядерно-плазматического типа окрашивания опухолевых клеток, а следовательно, транспорт NF-1 $\alpha$  в ядро опухолевой клетки, транскрипционная активность.

Из 33 больных с высоким риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений 17 (51,5%) пациентам в послеоперационный период был дополнительно назначен препарат на основе лактоферрина Лапрот внутривенно и местно, а 16 (48,5%) больных получали стандартную терапию без оптимизации.

У пациентов, получавших Лапрот, сроки эпителизации тканей ротовой полости были короче на 37,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с пациентами без оптимизации терапии ( $4,2 \pm 1,3$  мес. против  $6,7 \pm 1,5$  мес.). Заживление раны первичным натяжением у больных при оптимизации послеоперационного лечения происходило в 82,4% ( $n=14$ ), что было чаще ( $p=0,003$ ) по сравнению с пациентами без оптимизации терапии (25%). Высокая частота заживления раны вторичным натяжением у больных, не получавших Лапрот, была обусловлена частой встречаемостью гнойно-некротических послеоперационных осложнений. Общее число гнойно-некротических осложнений среди пациентов, не получавших препарата на основе лактоферрина, было статистически значимо чаще ( $p=0,003$ ) по сравнению с больными, у которых послеоперационная терапия была оптимизирована (75% против 17,6%).

Таким образом, использование препарата на основе лактоферрина, обладающего целым комплексом доказанных свойств – антибактериальными, антиоксидантами, иммуномодулирующими, антисептическими, у больных раком СОПР в послеоперационный период привело к снижению общего числа гнойно-некротических осложнений за счет усиления антимикробного потенциала слюны, ограничившего число превышений клинически значимой концентрации патогенных микробов ротовой полости, ассоциированных с развитием гнойно-деструктивных процессов, снижения провоспалительного медиатора ротовой жидкости ИЛ-8. При оптимизации терапии после операции снижение числа гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений было сопряжено с ограничением пролиферативного и метастатического потенциала: в опухолевом гомогенате

снижалась концентрация транскрипционных факторов HIF-1 $\alpha$  и NF-kB p65, васкулососудистого фактора роста VEGF-A, выраженности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ткани, намечалась тенденция к ограничению транслокации HIF-1 $\alpha$  в ядро. Следовательно, препарат на основе лактоферрина имеет кроме иммуномодулирующего, антимикробного еще и противоопухолевый эффект.

Итак, в работе установлен факт прямой взаимосвязи пролиферативного потенциала опухолевых клеток, активности неоангиогенеза, апоптоза, прогрессии опухоли у больных раком СОПР от активности гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  в клетках опухоли, что патогенетически обосновывает необходимость лечебного воздействия на стабилизацию гипоксия-зависимого фактора транскрипции. В работе патогенетически обосновано применение оптимальных сочетаний диагностических тестов для раннего прогнозирования рецидивов и метастазов рака СОПР, гнойных осложнений после комбинированного специализированного лечения.

## ВЫВОДЫ

1. В первые 12 месяцев после окончания комбинированного первичного лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта T<sub>1-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> гнойные осложнения наблюдаются в 68% и способствуют прогрессированию основного заболевания. У больных раком слизистой оболочки полости рта при развитии гнойных осложнений в течение двух лет наблюдения продолженный рост опухоли (26% против 8,9%, p=0,03), рецидив опухоли (21,9% против 4,4%, p=0,009), метастазы в региональные лимфоузлы (33,3% против 15,6%, p=0,028), общее число случаев прогрессии заболевания (40,6% против 8,9%, p=0,0001) наблюдаются достоверно чаще (p<0,05) по сравнению с пациентами без гнойных осложнений.

2. Развитие гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком слизистой оболочки полости рта сопряжено с повышением транскрипционной активности опухолевых клеток, интенсивности процессов неоангиогенеза и снижением активности апоптоза, что является патогенетической основой прогрессии опухолевого заболевания. В супернатанте ткани опухоли содержание гипоксия-индуцибельного фактора 1-α повышается на 38,7% (12,9±0,7 УЕ/мг белка против 9,3±0,6 УЕ/мг белка, p<0,05), транскрипционного фактора каппа-В р65 на 35,2% (14,6±0,9 УЕ/мг белка против 10,8±0,8 УЕ/мг белка, p<0,05), ростового васкулоэндотелиального фактора-А на 21% (90,3±1,5 пг/мг против 74,6±1,7 пг/мг, p<0,05), наблюдается снижение экспрессии проапоптического фактора bax в ткани опухоли. В ротовой жидкости при развитии гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком слизистой оболочки полости рта содержание гипоксия-индуцибельного фактора 1-α не изменяется (p>0,05), а ростового васкулоэндотелиального фактора-А повышается на 26,8% (p<0,05).

3. У больных раком слизистой оболочки полости рта выявление в зубном налете *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в концентрации выше 10<sup>4</sup> кл/мл, *Porphyromonas gingivalis* – выше 10<sup>5</sup> кл/мл, *Treponema denticola* –

выше  $10^6$  кл/мл, снижение содержания в ротовой жидкости лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, повышение провоспалительного цитокина ИЛ-8 выше 3335 пг/мл сопряжено с развитием гнойных осложнений комбинированного лечения, включая хирургическое, с диагностической чувствительностью 83%, диагностической специфичностью 69% и точностью 76% ( $p < 0,001$ ).

4. У больных раком слизистой оболочки полости рта гипоксия-индуцибельный фактор 1- $\alpha$  способствует активации ядерного фактора транскрипции каппа-В с усилением связи между транскрипционными факторами при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток. Гипоксия-индуцибельный фактор 1- $\alpha$  является проангиогенным фактором за счет прямой связи с экспрессией ростового васкулоэндотелиального фактора -А при раке слизистой оболочки полости рта, усиливающейся при метастазировании в региональные лимфоузлы. При раке слизистой оболочки полости рта стабилизация гипоксия-индуцибельного фактора 1- $\alpha$  с ограничением его транслокации в ядро достигается при региональном возрастании уровня лактоферрина в ротовой жидкости. Проапоптическую роль гипоксия-индуцибельный фактор 1- $\alpha$  играет только на ранних стадиях заболевания, способствуя усилению экспрессии Вах в опухолевой ткани при малых размерах и отсутствии поражения лимфоузлов.

5. У больных слизистой оболочки полости рта негативная и слабо выраженная экспрессия гипоксия-индуцибельный фактор 1- $\alpha$  в опухоли сопряжена с более высокой вероятностью двухлетней послеоперационной выживаемости (76%) по сравнению с выживаемостью при умеренной и сильной экспрессии (46%) ( $p < 0,05$ ). Развитие гнойных осложнений комбинированного лечения, метастазирования в регионарные лимфатические узлы сопряжено с повышением в опухолевой ткани экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора 1- $\alpha$ , транслокацией его из цитоплазмы в ядро опухолевых клеток.

6. У больных раком слизистой оболочки полости рта определение исходного риска гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования опухолевого заболевания требует проведения оценки содержания лактоферрина, ИЛ-8 и VEGF-A в ротовой жидкости, качественно-количественного анализа в зубном налете спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, содержания гипоксия-индуцибельного фактора 1- $\alpha$ , ядерного транскрипционного фактора каппа-B p65 и васкулоэндотелиального фактора-A в супернатанте опухоли, иммуногистохимической оценки выраженности опухолевой экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора 1- $\alpha$  и типа окрашивания опухолевых клеток, выраженности экспрессии маркера апоптоза bax.

7. Системное и местное применение препарата на основе лактоферрина у больных раком слизистой оболочки полости рта с высоким риском гнойных осложнений комбинированного лечения позволяет снизить частоту последних с 75% до 17,6% ( $p=0,003$ ) за счет усиления антимикробного потенциала ротовой жидкости, снижения провоспалительного медиатора ИЛ-8 на 75,4% ( $p<0,001$ ), ограничения числа превышений клинически значимой концентрации патогенных микробов ротовой полости *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*. При этом ограничивается пролиферативный и метастатический потенциал опухолевых клеток: в опухолевой ткани снижается концентрация транскрипционных факторов гипоксия индуцибельного фактора 1- $\alpha$  на 23,8% ( $p<0,05$ ), транскрипционного фактора каппа-B p65 на 30,2% ( $p<0,05$ ), васкулоэндотелиального фактора роста-A на 15,7% ( $p<0,05$ ), выраженности экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора 1- $\alpha$  в ткани опухоли.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Алгоритм дополнительного обследования больных раком СОПР для раннего прогнозирования гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания должен включать определение в ротовой жидкости содержания антимикробного белка лактоферрина и провоспалительного цитокина ИЛ-8, фактора роста сосудов VEGF-A, в зубном налете проведение качественно-количественного анализа спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, в биоптате опухоли содержание HIF-1 $\alpha$ , NF-kB p65 и VEGF-A в супернатанте, ИГХ оценка выраженности опухолевой экспрессии HIF-1 $\alpha$  и типа окрашивания опухолевых клеток, выраженности экспрессии маркера апоптоза bax.

2. Заключение о высоком риске роста опухоли и рецидивов вследствие выраженного пролиферативного потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР T<sub>2-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 19 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 14 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 16 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 80 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  сильно выраженная (число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный.

3. Заключение о высоком риске прогрессирования заболевания с повышением метастатического потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР T<sub>2-3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 19 мкг/мл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 $\alpha$  выше 16,5 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 18 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A выше 105 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 $\alpha$  сильно выраженная (число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный.

**Указатель литературы**

1. Агабекян Г.О., Кропотов М.А., Саприна О.А., Стельмах Д.К., Пак М.Б. Первично-множественный плоскоклеточный рак слизистых оболочек органов головы и шеи (обзор литературы). // Современная онкология. - 2014. –№2. -С.82-86.
2. Аладин А.С., Петрова Л.Н., Важенин А.В., Сулацкая Е.Ю., Васильев Ю.С., Смирнов В.А., Епишев В.В., Жаринова А.С., Яйцев С.В. Эндопротезирование у больных со злокачественными новообразованиями головы и шеи. // Онкология. –2012. –№1.-С.59-61.
3. Бабиченко И.И., Григорьян А.С., Катушкина А.А. Экспрессия кератина 8 при гиперкератозе и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта. // Архив патологии. -2011. -№6. -С.18-21.
4. Бабиченко И.И., Григорьян А.С., Ковязин В.А., Катушкина А.А. Особенности экспрессии белка Ki-67 при лейкоплакии и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта. // Стоматология. -2010. -№6. -С.4-6.
5. Боровской Е.В., Машкиллейсон А.Л. Заболевания слизистой оболочки полости рта и губ. // Медпресс. -2001.
6. Брусина Е.Б., Кутихин А.Г. Молекулярная эпидемиология рака: новые горизонты профилактики. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -2011. -№3. -С.27-32.
7. Будовский А.И., Алексахина С.Н., Имянитов Е.Н. Эпидемиология и молекулярный патогенез опухолей полости рта и глотки вопросы онкологии. // –2014. –№1. -С.14-17.
8. Бузов Д.А., Харитонов М.П., Дорофеев А.В. Диагностика рака слизистой оболочки полости рта в крупном индустриальном центре. // Уральский медицинский журнал. -2012. -№4. -С.35-36.
9. Ваккер А.В. Злокачественные первично-множественные опухоли лор-органов. // Вестник оториноларингологии. –2002. –№2.-С.37-39.

10. Викулова Ю.В. Современное состояние вопроса диагностики рака полости рта и ротоглотки. // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2012. – №3. – С.51-54.
11. Гарбузов М.И., Вельшер Л.З. Реальные каналы первичного обращения больных раком кожи красной каймы губ, слизистой оболочки полости рта и челюстно-лицевой области. // Consilium medicum. Дерматология. – 2012. – №3. – С.33-39.
12. Гельфанд И.М., Романов И.С., Удинцов Д.Б. Тактика лечения ранних стадий рака слизистой оболочки полости рта. // Опухоли головы и шеи. Приложение. Спецвыпуск: Материалы II Конгресса Российского общества специалистов по опухолям головы и шеи с международным участием «Открывая новые горизонты в лечении опухолей головы и шеи». Москва: ООО Российское общество специалистов по опухолям головы и шеи. – 2016. – Т. 6. № 1. – С. 12-13.
13. Герштейн Е.С., Бацев А.Ф., Матякин Е.Г, Кушлинский Н.Е. активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор раi-1 в опухолях больных раком слизистой оболочки полости рта: взаимосвязь с основными клиничко-морфологическими факторами. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – №3. – С.323-326.
14. Дибиров Р.К., Яременко А.И., Кутукова С.И., Манихас Г.М. Молекулярно-генетические факторы прогноза выживаемости пациентов, страдающих раком слизистой оболочки полости рта. // Институт стоматологии. – 2013. – №2. – С.46-48.
15. Иванов В.М., Иванова О.В., Шейкин М.В. Роль внутрикостного введения антибиотиков при лечении местнораспространённого рака слизистой оболочки полости рта. // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – №7. – С.30-33.
16. Иванов В.М., Матякин Г.Г., Иванова О.В., Шейкин М.В., Романцов М.Г. Сопроводительная терапия местно-распространенного рака слизистой полости рта. // Вопросы онкологии. – 2012. – №6. – С.749-753.

17. Ивина А.А., Бабиченко И.И., Рабинович О.Ф., Тогонидзе А.А. Белки Ki-67 и клаудин-1 при гиперплазии, плоскоклеточной внутриэпителиальной неоплазии и плоскоклеточном раке слизистой оболочки рта. // Стоматология. -2014. -№1. -С.31-33.
18. Игнатова А.В., Мудунов А.М., Нариманов М.Н. Прогностическое значение биомаркеров при плоскоклеточном раке полости рта. Обзор литературы. Опухоли головы и шеи. Москва: ООО Российское общество специалистов по опухолям головы и шеи. 2014. № 4. С. 28-33.
19. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. 2015. - 236 с.
20. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. -2016. -236 с.
21. Кирова Ю.И. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1альфа в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. // Патол. физиология и эксперим. терапия. –2012. –№3. –С.51-55.
22. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Роль матриксных металлопротеиназ в развитии и прогнозе плоскоклеточных карцином головы и шеи // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 6. – С. 48-53.
23. Коваль И.В. История изучения, этиология и патогенез гломусных опухолей основания черепа. // Журнал вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. –2012. –№5. -С.70-73.
24. Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Клишо Е.В., Шишкин Д.А. Уровень матриксной металлопротеиназы ммп-9 и ее эндогенного тканевого

- ингибитора тимп-1 в сыворотке крови у больных с плоскоклеточными карциномами головы и шеи. // Российский онкологический журнал. - 2008. -№2. -С.16-19.
25. Кочурова Е.В., Николенко В.Н., Александров М.Т. Комплексная диагностика и стоматологическая реабилитация пациентов с новообразованиями челюстно-лицевой области на основе анализа биомаркеров ротовой жидкости // Scientific Review Proceedings of the international scientific conference. -2015. -С. 506-517.
26. Кропотов М.А., Соболевский В.А., Удинцов Д.Б., Доброхотова В.З. Место консервативной терапии в лечении рака слизистой оболочки щеки. // Современная онкология. –2010. –№3. -С.76-79.
27. Кулаков А.А., Робустова Т.Г., Неробеев А.И. Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия. Национальное руководство. // М. ГЭОТАР-Медиа. –2015.
28. Кутукова С.И., Манихас г.М., Яременко А.И. и др. Прогностическая роль лабораторных и иммуногистохимических маркеров в рецидивировании плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта. // Опухоли головы и шеи. Москва: ООО Российское общество специалистов по опухолям головы и шеи. -2014. -№ 3. -С. 47-50.
29. Левина А.А. и др. Регуляция гомеостаза кислорода. Фактор-индуцированный гипоксией (HIF) и его значение в гомеостазе кислорода. // Педиатрия. –2009. –Т.87. –№4. – С.92-98.
30. Лукиных Л.М., Жданова М.Л., Тиунова Н.В. Предраковые заболевания слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ. // Учебное пособие. -2015.
31. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. // Патол. физиол. и эксперим. терапия. –2011. –№1. –С.3-19.

32. Любаев В.Л., Ткачев С.И., Алиева С.Б., Айдарбекова А.А., Бржезовский В.Ж. Тактические подходы к лечению регионарных метастазов у больных раком гортани, гортаноглотки, слизистой оболочки полости рта и ротоглотки. // Современная онкология. -2006. - №3. -С.21-26.
33. Матякин Е.Г, Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Дворова Е.К., Бацев А.Ф. Активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор раi-1 в опухолях больных раком слизистой оболочки полости рта: взаимосвязь с основными клинико-морфологическими факторами. // Российский биотерапевтический журнал. -2009. -№4. - С.29-32.
34. Матякин Е.Г, Иванов В.М., Иванова О.В., Шейкин М.В. Хирургическая реабилитация больных местнораспространенным раком слизистой оболочки полости рта. // Инфекции в хирургии. –2013. -№4. -С.40-43.
35. Машкиллейсон А.Л. Предрак красной каймы губ и слизистой оболочки рта. // –М.: Медицина. -1970.
36. Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. Протеиназы семейства кальпаинов. Структура и функции. // Онтогенез. -2010. -Т.41. -№5. - С.381-389.
37. Немцова Е.Р., Эделева Н.В., Осипова Н.А. и др. «Лапрот» - новый препарат детоксицирующего, противовоспалительного и иммуномодулирующего действия. // Рос. онколог. журнал. –2006. –№4. –С.29-33.
38. Неробеев А.И., Робустова Т.Г, Кулаков А.А. Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия. Национальное руководство. // М., ГЭОТАР-Медиа. –2010.
39. Новиков В.Е., Левченкова О.С. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия. // Эксперим. и клинич фармакология. –2013. –Т.76. – №5. –С.37-47.

- 40.Новиков В.Е., Пожилова Е.В., Левченкова О.С. Перспективы применения ингибиторов фактора адаптации гипоксии в медицинской практике // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. --2015. –Т.13. -№3. –С.9-17.
- 41.Пачес А.И. Опухоли головы и шеи. Клиническое руководство. // Издательский дом "Практическая медицина". -2013.
- 42.Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. // Казань. -2004. -С.452.
- 43.Портниченко В.И. и др. Фазовые изменения энергетического метаболизма. // Фізіол. журн. –2012. –Т.58. –№4. –С.3-20.
- 44.Серебровская Т.В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания (обзор). // Украинский пульмонологический журнал. -2005. -№3. -С.77-81.
- 45.Скил Роланд Т. Противоопухолевая химиотерапия. // Руководство, пер. с англ. М., ГЭОТАР-Медиа. –2011.
46. Скородумова Л.О., Мураев А.А., Володина Е.В., Иванов С.Ю., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Молекулярные маркеры риска злокачественной трансформации лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. // Вопросы онкологии. –2012. –Т.58. -№3. –С.327-332.
47. Собин Л.Х., Господарович М.К., Виттекинд К. ТНМ Классификация злокачественных опухолей. Москва: Логосфера. 2011. С. 25 -27.
48. Соловьев М.М. Рак слизистой оболочки полости рта и языка (резервы улучшения результатов лечения). // Практическая онкология. - 2003. -Т.4. -№1. -С.42.
- 49.Спирин А.С., Кобяков Г.Л., Черкаев В.А., Назаров В.В., Кадашева А.Б., Ветлова Е.Р., Гордон К.В. Эпидемиология, диагностика, клиническая симптоматика и классификация первичных злокачественных опухолей, поражающих основание черепа. // Журнал вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. –2016. –№3. -С.106-113.

50. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Шарова Н.П., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А. Активность и субъединичный состав протеасом в плоскоклеточных карциномах головы и шеи. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2010. -№1. -С.89-92.
51. Спирина Л.В., Чойнзонов Е.Л., Кондакова И.В., Шишкин Д.А., Чижевская С.Ю. Экспрессия транскрипционных факторов nf-kb и hif-1 в плоскоклеточных карц\*иномах головы и шеи: связь с прогнозом заболевания. // Вопросы онкологии. -2013. -№5. -С.575-579.
52. Спицына В.И., Гончарова Е.И. Клинические аспекты предрака слизистой оболочки рта и красной каймы губ, повышение эффективности диагностики и лечения. // Российский стоматологический журнал. -2008. -№4. -С.10-14.
53. Сувырина М.Б., Артамонова Е.В., Галеева К.А. Пропедевтика терапевтической стоматологии. Учебно-методическое пособие для студентов 1 курса стоматологического факультета. В 2-х частях, Ч.1. // ГБОУ ВПО ДВГМУ. -2016.
54. Сувырина М.Б., Широкова Ю.А., Ткаченко В.В. Клиническая стоматология. Учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов 5 курса стоматологического факультета. ГБОУ ВПО ДВГМУ. -2015.
55. Харченко В.П. Малоинвазивные вмешательства под УЗИ контролем в клинике внутренних болезней. -Смоленск. -2005. -С.192.
56. Черемисин В.М., Сперанская А.А. Компьютерно-томографическая диагностика новообразований глотки, челюстно-лицевой области и гортани, 2-е изд. // «ЭЛБИ-СПБ». -2009.
57. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Бойко А.В. и др. Антибактериальный, антиоксидантный, иммуномодулирующий и антиканцерогенный препарат и способ его применения. Патент № 2165769, М., 2001.

58. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). - М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России. 2012. - С. 4-25.
59. Чойнзонов Е.А., Писарева Л.Ф., Одинцова И.Н., Жуйкова Л.Д. Рак полости рта и глотки в регионе Сибири и Дальнего Востока Вестник оториноларингологии. // –2015. -№6. -С.38-42.
60. Чойнзонов Е.Л., Клишо Е.В., Кондакова И.В., Шишкин Д.А., Чижевская С.Ю. Связь уровня матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в сыворотке крови с эффективностью лучевой терапии больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. -2012. -№6. - С.51-57.
61. Шабанов П.Д. и др. Метаболические корректоры гипоксии. // – 2010. –С.916.
62. Юркевич Н.В. Геронтостоматология и заболевания слизистой оболочки полости рта. Учебно-методическое пособие для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной работы студентов стоматологического факультета. // ГБОУ ВПО ДВГМУ. –2015.
63. Янова Н.А., Тиунова Н.В. Клинико-эпидемиологическая оценка предраковых заболеваний слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ в крупном промышленном городе на примере Нижнего Новгорода. // Клиническая стоматология. -2009. -№3. -С.32-34.
64. Asay R.R., Felizzola C.R. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. // Oral. Oncol. –2006. –Vol.42. –N5. –P.475–480.
65. Ahn M.J., D'Cruz A., Vermorken J.B., Chen J.P. et al. Clinical recommendations for defining platinum unsuitable head and neck cancer patient populations on chemoradiotherapy: a literature review. // Oral Oncol. –2016. –Vol.53. –P.10–6.

66. Almeida F.T., Pachêco-Pereira C., Porporatti A.L., Flores-Mir C. Oral manifestations in patients with familial adenomatous polyposis: A systematic review and meta-analysis. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* –2016. – Vol.31. –N3. –P.527–540.
67. Benaissa M., Peyrat J.P., Hornez L., Mariller C., Mazurier J., Pierce A. Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer. // *Int. J. Cancer.* –2005. –Vol.114. –P.299–306.
68. Bock J.M., Sinclair L.L., Bedford N.S., Jackson R.E., Lee J.H., Trask D.K. Modulation of cellular invasion by VEGF-C expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. // *Arch otolaryngol head neck surg.* — 2008. —Vol.134. —P.355-362.
69. Bortoluzzi M.C., Yurgel L.S., Dekker N.P. et al. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. // *Oral. Surg.* – 2004. –Vol.98. –P.698–704.
70. Bradley G., Odell E.W., Raphael S. et al. Abnormal DNA content in oral epithelial dysplasia is associated with increased risk of progression to carcinoma. // *Br. J. Cancer.* –2010. –Vol.103. –P.1432–1442.
71. Breiteneder Gelef S. et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries. // *Am. J. Pathol.* —1999. — Vol.154. —P.385–394.
72. Brennan P.A., Mackenzie N., Quintero M. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in oral cancer. // *J. Oral. pathol. med.* —2005. —Vol.34. —P.385-389.
73. Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. // *Top Companion Anim. Med.* –2012. –Vol.27. –P.46–52.
74. Brown J.S., Barry C., Ho M., Shaw R.A. New classification for mandibular defects after oncological resection. // *Lancet Oncol.* –2016. –Vol.17. –N1. – P.23-30.
75. Cao H., Mu Y., Li X., Wang Y., Chen S., Liu J.P. A systematic review of randomized controlled trials on oral chinese herbal medicine for prostate cancer. // *PLoS One.* 2016. –Vol.4. –N11. –P.8.

76. Chaitanya N.C., Allam N.S., Gandhi Babu D.B., Waghray S., Badam R.K., Lavanya R. Systematic meta-analysis on association of human papilloma virus and oral cancer. // *J. Cancer Res. Ther.* –2016. –Vol.12. 2. –P.969-974.
77. Chen Y.K., Hsue S.S., Lin L.M. Expression of p63 protein and mRNA in oral epithelial dysplasia. // *J. Oral. pathol. med.* –2005. –Vol.34. –N4. –P.232-9.
78. Cheng Y-S.L., Rees T., Wrigh J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection // *Clinical and translational medicine.* –2014. –Vol.3. –P.3-13.
79. Choby G.W., Albergotti W.G., Byrd J.K., Egloff A.M., Johnson J.T. Factors contributing to recurrence of oral cavity and laryngeal tumors and estimation of tumor age. // *Laryngoscope.* –2014. –Vol.124. –N10. –P.2297-2304.
80. Choi H.R., Batsakis J.G., Zhan F. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. // *Hum. Pathol.* –2002. –Vol.33. –N2. –P.158-64.
81. Clark C.M., Furniss M., Mackay-Wiggan J.M. Basal cell carcinoma: an evidence-based treatment update. // *Am. J. Clin. Dermatol.* –2014. –Vol.15. –N3. –P.197-216.
82. Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. // *J. Cell. Biochem.* –1999. –Vol.74. –P.486–498.
83. De Lima P.O., Jorge C.C., Oliveira D.T., Pereira M.C. Hypoxic condition and prognosis in oral squamous cell carcinoma. // *Anticancer research.* —2014. —Vol.34. —P.605-612.
84. De Sousa F.A., Paradella T.C., Carvalho Y.R. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. // *Annals of diagnostic pathology.* —2009. —Vol.13. –N5. —P.308-312.

85. De Vicente J.C., Fresno M.F., Villalain L. et al. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. // *Oral. oncol.* –2005. –Vol.41. –N6. –P.568-79.
86. Denko N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. // *Nat. rev. cancer.* –2008. –Vol.8. –P.705-713.
87. Ebrahimi M., Boldrup L. Expression of novel p53 isoforms in oral lichen planus. // *Oral. oncol.* —2008. —Vol.44. –N2. —P.156-161.
88. Ebrahimi M., Boldrup L., Wahlin Y.B. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus. // *Oral. oncol.* —2008. —Vol.44. –N7. —P.634-638.
89. Eckert A.W., Kappler M., Schubert J., Taubert H. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. // *Oral. maxillofac. surg.* –2012. –Vol.16. –P.189-196.
90. Eckert A.W., Lautner M.H., Schutze A., Bolte K. et al. Co-expression of HIF1 $\alpha$  and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. // *J. oral. pathol. med.* –2010. –Vol.39. –P.313-317.
91. Eckert A.W., Lautner M.H., Schutze A., Taubert H. et al. Co-expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. // *Histopathology.* –2011. –Vol.58. –P.1136-1147.
92. Edge S.B. American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual (7th edn.) New York: Springer. –2010.
93. Epstein J.B., Zhang L., Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. // *J. Can. dent. assoc.* –2002. –Vol.68. –N10. –P.617-21.
94. Fillies T., Werkmeister R., Van Diest P.J., Brandt B. et al. HIF1- $\alpha$  overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. // *BMC Cancer.* –2005. –Vol.5. –P.84.
95. Flamme I., Frohlich T., Von Reutern M., Kappel A., Damert A., Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is

- closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. // *Mech Dev.* —1997. —Vol.63. —N1. —P.51–60.
96. Floriano P.N., Christodoulides N., Miller C.S. et al. Use of saliva-based nanobiochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. // *Clin. chem.* -2009. —Vol.55. —N8. -P.1530–1538.
97. Freeman R.S., Barone M.C. Targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as a therapeutic strategy for CNS disorders. // *Curr. drug targets CNS & neurol. disord.* —2005. —Vol.4. —P.85-92.
98. Fujita K., Matsuda E., Sekine K., Iigo M., Tsuda H. Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. // *Cancer Lett.* —2004. —Vol.213. —P.21–29.
99. Fujita K., Matsuda E., Sekine K., Iigo M., Tsuda H. Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. // *Carcinogenesis.* —2004. —Vol.25. —P.1961–1963.
100. Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. // *Lancet.* —2014. —Vol.384. —P.980-1004.
101. Gogarty D.S., Shuman A., O'Sullivan E.M., Sheahan P., Kinsella J., Timon C., O'Neill J.P. Conceiving a national head and neck cancer screening programme. // *J. Laryngol. Otol.* —2016. —Vol.130. —N1. —P.8-14.
102. Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al. The calpain system. // *Physiol. Rev.* -2003. -Vol.83. -P.731-801.
103. Gu Y.Z., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. // *Annu. rev. pharmacol. toxicol.* —2000. —Vol.40. —P.519–561.
104. Guerra E.N., Rêgo DF, Elias ST, Coletta RD, Mezzomo LA, Gozal D, De Luca Canto G. Diagnostic accuracy of serum biomarkers for head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* —2016. —Vol.101. —P.93-118.

105. Guicciardi M.E., Gores G.J. Calpains can do it alone. Implication for cancer therapy. // *Cancer biology and therapy*. -2003. -Vol.2. -P.153-154.
106. Gupta B., Johnson N.W. Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in South Asia and the Pacific. // *PLoS One*. -2014. -Vol.9. -N11. -P.24-27.
107. Haniffa A.M., Saitoh M., Abiko Y. et al. Expression pattern of p63 in oral epithelial lesions and submucous fibrosis associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. // *Med. mol. morphol.* -2007. -Vol.40. -N4. -P.203-207.
108. Heckman C.A., Holopainen T., Wirzenius M. et al. The tyrosine kinase inhibitor cediranib blocks ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 activity and lymphangiogenesis. // *Cancer Res.* -2008. -Vol.68. -P.4754-4762.
109. Hewitson K.S., McNeill L.A., Riordan M.V., Tian Y.M. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. // *J. Biol. chem.* -2002. -Vol.277. -P.26351-26355.
110. Hiwasa T., Nakata M., Ohno S. et al. Regulation of transformed state by calpastatin via PKCepsilon in NIH3T3 mouse fibroblasts. // *Biochem. biophys. commun.* -2002. -Vol.290. -P.510-517.
111. Huang C., Sun Z., Sun Y., Chen X. et al. Association of increased ligand cyclophilin A and receptor CD147 with hypoxia, angiogenesis, metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. // *Histopathology*. -2012. -Vol.60. -P.793-803.
112. Iigo M., Shimamura M., Matsuda E., Fujita K., Nomoto H., Satoh J. et al. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. // *Cytokine*. -2004. -Vol.25. -P.36-44.

113. Irani S. Distant metastasis from oral cancer: A review and molecular biologic aspects. // *J. Int. soc. prev. community dent.* –2016. –Vol.6. –N4. –P.265-71.
114. Islam M.N., Kornberg L., Veenker E. et al. Anatomic site based ploidy analysis of oral premalignant lesions. // *Head neck pathol.* –2010. –Vol.4. –N1. –P.10-4.
115. Jang J.S., Choi Y.H. Proteolytic degradation of the retinoblastoma family protein p107: a putative cooperative role of calpain and proteasome. // *Int. J. Mol. Med.* –2009. –Vol.4. –N5. –P.487-492.
116. Javaid M.A., Ahmed A.S., Durand R., Tran S.D. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. // *J. Oral. biol. craniofac. res.* –2016. –Vol.6. –N1. –P.66-75.
117. Javed F., Warnakulasuriya S. Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence. // *Crit. rev. oncol. hematol.* –2016. –Vol.97. –P.197-205.
118. Jiang J., Tang Y.L., Liang X.H. A new vision of hypoxia promoting cancer progression. // *Cancer biol. ther.* –2011. –Vol.11. –P.714-723.
119. Jiang W.W., Fujii H., Shirai T. et al. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. // *Cancer.* –2001. –Vol.92. –P.2349–2356.
120. Jordan R.C., Macabeo-Ong M., Shiboski C.H. et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer. // *Clin. cancer res.* –2004. –Vol.10. –N19. –P.6460-6465.
121. Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. // *EMBO J.* –2006. –Vol.15. –P.290–298.

122. Kang F.W., Gao Y., Que L., Sun J., Wang Z.L. Hypoxiainducible factor-1 $\alpha$  overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. // *Exp. ther. med.* –2013. –Vol.5. –P.112-118.
123. Katayama A., Bandoh N., Kishibe K. et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. // *Clin. cancer res.* –2004. – Vol.10. –N2. –P.634-640.
124. Kawaguchi H., El-Naggar A.K., Papadimitrakopoulou V. et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. // *J. Clin. oncol.* –2008. –Vol.26. –N3. –P.354-360.
125. Khan Z., Tiwari R.P., Mulherkar R. et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. // *Head neck.* –2009. –Vol.31. –N8. –P.1039-1048.
126. Khan Z., Tönnies J., Müller S. Smokeless tobacco and oral cancer in South Asia: a systematic review with meta-analysis. // *J. cancer epidemiol.* – 2014. –Vol.11. –P.394–396.
127. Kim S.Y., Nam S.Y., Choi S.H., Cho K.J., Roh J.L. Prognostic value of lymph node density in node-positive patients with oral squamous cell carcinoma. // *Ann. Surg. Oncol.* –2011. –Vol.18. –P. 2310-2317.
128. Kimple A.J., Welch C.M., Zevallos J.P., Patel S.N. Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma – An Overview // *OHDM.* -2014. -Vol.13. -N.3. – P.877-882.
129. Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. Cancer. // *Chemother. Pharmacol.* —1999. —Vol.43. —P.42-51.
130. Koster M.I., Dai D., Roop D.R. Conflicting roles for p63 in skin development and carcinogenesis. // *Cell Cycle.* –2007. –Vol.6. –N3. –P.269-273.
131. Lando D., Gorman J.J, Whitelaw M.L, Peet D.J. Oxygen\_dependent regulation of hypoxia\_inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. // *Eur. J. Biochem.* —2003. —Vol.270. –N5. —P.781–790.

132. Larsen-Reindorf R., Owusu-Afriyie O., Acheampong A.O., et al. International journal of otolaryngology and head & neck surgery. –2014. – Vol.3. –P.271-278.
133. Liang X.H., Zheng M., Jiang J.A., Zhu G.Q., Yang J., Tang Y.L. Hypoxia - inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in atients with tongue squamous cell carcinoma. // Oral. oncol. –2011. –Vol.47. –P.92-97.
134. Liehara K.T., Lien J.C., Chung C.H., Kuo S.C., Huang T.F. Bp5250 inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and HIF-1 $\alpha$  expression on endothelial cells. // Arch. pharmacol. –2012. –Vol.385. –P.39-49.
135. Lin P.Y., Yu C.H., Wang J.T., Chen H.H., Cheng S.J., Kuo M.Y., Chiang C.P. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. // J. Oral. pathol. med. –2008. –Vol.37. –P.18-25.
136. Lo Muzio L., Pannone G., Leonardi R. et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. // J. Dent. res. – 2003. –Vol.82. –N11. –P.923-928.
137. Lo Muzio L., Pannone G., Staibano S. et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. // Br. J. Cancer. –2003. –Vol.89. –N12. – P.2244-2248.
138. Lukyanova L.D., Sukoyan G.V., Kirova Y.I. Role of proinflammatory factors, nitric oxide, and some parameters of lipid metabolism in the development of immediate adaptation to hypoxia and HIF-1 $\alpha$  accumulation. // Bull. exp. biol. med. –2013. –Vol.154. –N5. –P.597-601.
139. Lynch C.C., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases in tumor–host cell communication // Differentiation. —2002. —Vol.70. —P.561-573.
140. Maraki D., Becker J., Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. // J. Oral. pathol. med. –2004. –Vol.33. – N7. –P.398-404.

141. Markopoulos A.K., Evangelia Z. Michailidou E.Z., Tzimagiorgis G. Salivary markers for oral cancer detection. // *The open dentistry journal*. — 2010. —Vol.4. —P.172-178
142. Maruyama W., Shirakawa K., Matsui H. et al. Classical NF- $\kappa$ B pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells. // *Biochem. biophys. res. commun.* —2016. —Vol.23. —N3. —P.1466-1471.
143. Masson N., Ratcliffe P.J. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. // *J. Cell Sci.* —2003. — Vol.116 —P.3041–3049.
144. Mc Daniel D.K., Eden K., Ringel V.M., Allen I.C. Emerging roles for noncanonical nf- $\kappa$ b signaling in the modulation of inflammatory bowel disease pathobiology. // *Inflamm. bowel dis.* —2016. —Vol.22. —N9. —P.65-79.
145. Ministerio da Saude, Instituto Nacional de Cancer: Cancer da cavidade oral. // In: *Estimativa: Incidencia de Cancer no Brasil*. Rio de Janeiro. Instituto Nacional de Cancer. -2012. -P.40-41.
146. Mirabile A, Airoidi M., Ripamonti C. et al. Pain management in head and neck cancer patients undergoing chemo-radiotherapy: Clinical practical recommendations. // *Crit. rev. oncol. hematol.* —2016. —Vol.99. —P.100-106.
147. Mohamed K.M., Le A., Duong H., Wu Y., Zhang Q., Messadi D.V. Correlation between VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression in human oral squamous cell carcinoma. // *Exp. mol. pathol.* —2004. —Vol.76. —P.143-152.
148. Moll U.M., Slade N. P63 and p73: roles in development and tumor formation. // *Mol. cancer res.* —2004. —Vol.2. —P.371-386.
149. Moreno-Luna R., Abrante A., Esteban F. et al. Calpain 10 gene and laryngeal cancer: a survival analysis. // *Head Neck*. -2011. -Vol.33. —N1. - P.72-76.
150. Munck-Wikland E., Heselmeyer K., Lindholm J. et al. Stromelysin-3 mRNA expression in dysplasias and invasive epithelial cancer of the larynx. // *Int. J. Oncol.* —1998. —Vol.12. —N4. —P.859-864.

151. Murti P.R. P53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. // *J. oral pathology & medicine*. —1998. —Vol.27. —N5. —P.191-196.
152. Myllyharju J., Koivunen P. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases: common and specific roles. // *Biol. Chem.* —2013. —Vol. 394. —N4. —P.435-448.
153. Naganuma K. Hatta M., Tetsuro Ikebe T., Yamazaki J. Epigenetic alterations of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma. // *BMC Cancer*. —2014. —Vol.14. —P.988-995.
154. Naganuma K., Hatta M., Ikebe T., Yamazaki J. Epigenetic alterations of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma. // *BMC Cancer*. —2014. —Vol.14. —P.988.
155. Panella T.J., Liu Y.H., Huang A.T., Teng C.T. Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells and breast cancer. // *Cancer Res.* —1991. —Vol.51. —P.3037–3043.
156. Parkinson E.K., James E.L., Prime S.S. Senescence-derived extracellular molecules as modulators of oral cancer development: a mini-review. // *Gerontology*. —2016. —Vol.62. —N4. —P.417-424.
157. Paudyal P., Flohr F.D., Llewellyn C.D. A systematic review of patient acceptance of screening for oral cancer outside of dental care settings. // *Oral Oncol.* —2014. —Vol.50. —N10. —P.956-962.
158. Pektas Z.O., Keskin A., Günhan O., Karslıoğlu Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. // *J. Oral. maxillofac. surg.* —2006. —Vol.64. —N4. —P.628-635.

159. Perez-Sayans M., Suárez-Peñaranda J.M., Pilar G.D., Barros-Angueira F. Hypoxia-inducible factors in OSCC. // *Cancer letters*. – 2011. – Vol. 313, N1. - P.1-8.
160. Reicharth J., Welter C., Mitschele T. et al. Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN 1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin. // *J. Pathol.* -2003. -Vol.199. –N4. -P.509-516.
161. Rissanen T.T., Markkanen J.E., Gruchala M. et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. // *Circ. Res.* –2003. -Vol.92. -P.1098–1106.
162. Rock K.L., Goldberg A.L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. // *Ann. rev. immunol.* -2009. -Vol.17. -P.739-779.
163. Rosin M.P., Cheng X., Poh C. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. // *Clin. cancer res.* – 2000. –Vol.6. –P.357–362.
164. Ryu M.H., Park H.M., Chung J., Lee C.H., Park H.R. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mediates oral squamous cell carcinoma invasion via up-regulation of  $\alpha$ 5 integrin and fibronectin. // *Biochem. biophys. res. commun.* –2010. –Vol.393. –P.11-15.
165. Sahin K., Pala R., Tuzcu M., Ozdemir O., Orhan C., Sahin N., Juturu V. Curcumin prevents muscle damage by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways and improves performance: an in vivo model. // *J. Inflamm. Res.* – 2016. –Vol.29. –N9. –P.147-54.
166. Saintigny P., El-Nagggar A.K., Papadimitrakopoulou V. et al.  $\Delta$ N p63 overexpression, alone and in combination with other biomarkers, predicts the development of oral cancer in patients with leukoplakia. // *Clinical cancer research.* –2009. –Vol.15. –N19. –P.6284-6291.

167. Santos M., Mercante A.M., Louro I.D., Goncalves A.J., de Carvalho M.B., da Silva E.H., da Silva A.M. HIF1 $\alpha$  expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. // PLoS One. – 2012. –Vol.7. –P.18.
168. Semenza G.L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. // Drug. discov. today. –2007. –Vol.12. –N19-20. –P.853-859.
169. Semenza G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors and disease pathophysiology. // Ann. rev. pathol. –2013. –Vol.7. –P.7.
170. Sendoel A. et al. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. // Nature. –2010. –Vol. 465. –P.577-583.
171. Shang Z.J., Li J.R., Li Z.B. Up-regulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. // J. Oral. maxillofac. surg. –2007. –Vol.65. –P.17-21.
172. Shang Z.J., Li Z.B., Li J.R. VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: In vitro and in vivo studies. // Int. J. Oral. maxillofac. surg. –2006. –Vol.35. –P.533-538.
173. Shimamura M., Yamamoto Y., Ashino H., Oikawa T., Hazato T., Tsuda H. et al. Bovine lactoferrin inhibits tumorinduced angiogenesis. // Int. J. Cancer. –2004. –Vol.111. –P.111–116.
174. Shridhar K., Walia G.K., Aggarwal A., Gulati S., Geetha A.V., Prabhakaran D., Dhillon P.K., Rajaraman P. DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. // Oral Oncol. –2016. –Vol.53. –P.1-9.
175. Siebert P.D., Huang B.C. Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. // Proc. nat. acad. sci. –1997. –Vol.94. –P.2198–2203.

176. Soengas M.S., Alarcon R.M., Yoshida H., Giaccia A.J., Hakem R., Mak T.W., Lowe S.W. APAF1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. // *Science*. –1999. –Vol.284. –P.156-159.
177. Su Y., Cui Z., Li Z., Block E.R. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. // *The FASEB Journal*. -2006. -Vol.20. -P.1443-1451.
178. Sutinen M., Kainulainen T., Hurskainen T. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. // *Br. J. Cancer*. –1998. –Vol.77. –P.2239-2245.
179. Taipale J., Makinen T., Arighi E., et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3. // *Curr. top. microbiol. immunol.* -2009. –Vol.237. -P.85–96.
180. Tanaka C., Uzawa K., Shibahara T. et al. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis. // *J. dent. res.* –2003. –Vol.82. –N8. –P.607-11.
181. Teng C., Gladwell W., Raphiou I., Liu E. Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells. // *Biometals*. –2004. –Vol.17. –P.317–323
182. Torres-Rendon A., Stewart R., Craig G.T. et al. DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. // *Oral. Oncol.* –2009. –Vol.45. –N6. –P.468-473.
183. Uchida T., Rossignol F., Matthay M.A, Mounier R., Couette S., Clottes E., Clerici C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. // *J. Biol. chem.* –2004. –Vol.279. –N15. –P.14871–14878.

184. Vajaria B.N., Patel K.R., Begum R., Patel P.S. Sialylation: an avenue to target cancer cells. // *Pathol. oncol. res.* –2016. –Vol.22. –N3. –P.443-447.
185. Van Uden P., Kenneth N. S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. // *J. Biochem.* –2008. –Vol. 412. –N3. –P.477–484.
186. Vlahakis N.E., Young B.A., Atakilit A., Sheppard D. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9 beta1. // *J. Biol. chem.* –2005. –Vol.280. –P.4544–4552.
187. Wang G.L., Semenza G.L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. // *Blood.* —1993. —Vol.82. —P.3610–3615.
188. Weber A., Bellmann U., Bootz F. et al. Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. // *Int. J. Cancer.* –2002. –Vol.99. –N1. –P.22-8.
189. Weinberg R.A. *The biology of cancer.* // Garland science. -2014. –P.231.
190. Westfall M.D., Pietenpol J.A. P63: molecular complexity in development and cancer. // *Carcinogenesis.* –2004. –Vol.25. –N6. –P.857-864.
191. Whitehurst B., Flister M.J., Bagaitkar J. et al. Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model. // *Int. J. Cancer.* –2007. –Vol.121. –P.2181–2191.
192. Xiao C.C., Zhan K.Y., White-Gilbertson S.J., Day T.A. Predictors of nodal metastasis in parotid malignancies: a national cancer data base study of 22 653 patients. // *Otolaryngol. head neck surg.* –2016. –Vol.154. –N1. –P.121-130.

193. Xiao Y., Monitto C.L., Minhas K.M., Sidransky D. Lactoferrin down-regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells. // *Clin. cancer res.* –2004. –Vol.10. –P.8683–8686.
194. Xie L., Zhou X., Huang W., Chen J., Yu J., Li Z. Facial lymph node involvement as a prognostic factor for patient survival in oral cavity squamous cell carcinoma. // *Tumour Biol.* –2016. –Vol.37. –N3. –P.3489-3496.
195. Yang N., Tian G., Zhu M., Li C., Bu W., Chen J., Hou X., Liu Y., Wang G., Jia X., Di L., Dong Z., Feng L. Protective effects of organic acid component from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. against LPS-induced inflammation: Regulating the TLR4/IKK/NF- $\kappa$ B signal pathway. // *J. Ethnopharmacol.* –2016. –Vol.41. –N16. –P.581-585.
196. Ye H., Yu T., Temam S., Ziober B. et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. // *BMC Genomics.* –2008. –Vol.9. –P.69-80.
197. Zandi E., Karin M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I $\kappa$ B kinase complex. // *Mol. Biol.* –1999. –Vol.19. –P.4547-4551.
198. Zhan K.Y., Nicolli E.A., Khaja S.F., Day T.A. Lymphoepithelial carcinoma of the major salivary glands: Predictors of survival in a non-endemic region. // *Oral Oncol.* –2016. –Vol.52. –P.24-29.
199. Zhang L., Cheung K.J., Lam W.L. et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. // *Cancer.* –2001. –Vol.91. –P.2148–2155.
200. Zhang L., Rosin M.P. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? // *J. Oral. pathol. med.* –2001. –Vol.30. –N9. –P.513–520.