

УДК 616.31-006.6-02:616.98:612.017.1

**НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ РАКА
ОРГАНОВ ПОЛОСТИ РТА****Светицкий П.В., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Зыкова Т.А.,
Нистратов Г.П., Аединова И.В., Волкова В.Л., Баужадзе М.В.,
Ульянова Е.П., Богомолова О.А., Загора Г.И.***ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: svetitskiy.p@gmail.com*

Проведенные исследования показали, что у больных раком органов полости рта с регионарными метастазами и рецидивами выявление ВЭБ-ассоциированного рака составило 70,8%, в то время как у больных без метастазов – 45,8%. При ВПЧ-ассоциированном раке органов полости рта большая доля приходилась на группу без метастазов (33,3%), в отличие от других двух групп (25 и 1,4%), таким образом, инфицирование вирусами группы герпеса ткани опухоли можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, а наличие вируса папилломы человека дает благоприятный прогноз течения заболевания. Анализ тканевого цитокинового состава между больными раком органов полости рта без регионарных метастазов, с регионарными метастазами и при рецидивах показал различия их уровня между тканью опухоли и перитуморальной области с преобладанием содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 в опухолевой ткани. Проведенные иммуногистохимические исследования выявили наличие сосудов крупного диаметра с утолщенной стенкой у групп больных с регионарными метастазами и рецидивами, что является неблагоприятным прогностическим фактором.

Ключевые слова: рак органов полости рта, регионарные метастазы, рецидивы, вирус папилломы человека, вирус Эпштейна – Барр, цитокины, микрососудистая инвазия

SOME FACTORS OF PROGNOSIS OF CANCER OF THE MOUTH**Svetitskiy P.V., Novikova I.A., Zlatnik E.Y., Zyкова T.A., Nistratov G.P.,
Aedinova I.V., Volkova V.L., Bauzhadze M.V., Ulyanova E.P.,
Bogomolova O.A., Zakora G.I.***Rostov Research Oncologic Institute of Ministry of Health the Russian Federation, Rostov-on-Don,
e-mail: svetitskiy.p@gmail.com*

Studies have shown that patients with cancer of the oral cavity with regional metastases and recurrence detection of EBV-associated cancers was 70,8%, whereas in patients without metastases (45,8%). When HPV-associated cancers of the oral cavity opposite accounted for a large proportion of the group without metastases (33,3%), unlike the other two groups (25% and 1,4%), therefore, the herpes group virus infection of the tumor tissue can be treated as an unfavorable prognostic sign, and the presence of human papillomavirus gives a favorable prognosis of the disease. Analysis of tissue cytokine composition between patients with cancer of the oral cavity without regional metastases, with regional metastases and recurrences showed differences in their levels between tumor tissue and peritumoral area dominated by pro-inflammatory cytokines IL content-1β, IL-6, IL-8 in tumor tissue. Immunohistochemical studies revealed the presence of large diameter vessels with thickened wall of the groups of patients with regional metastases and recurrence, which is a negative prognostic factor.

Keywords: cancer of the oral cavity, regional metastases, recurrence, human papilloma virus, Epstein-Barr virus, cytokines, microvascular invasion

Заболеваемость и смертность раком органов полости рта (РОПР) в последние годы имеет тенденцию к росту во всем мире и в структуре онкопатологии, составляя 2,3%. Ежегодно у 90 тысяч человек в мире впервые диагностируются опухоли данной локализации [9].

Стандартизированный показатель заболеваемости в Европе равен 1,6 на 100 тысяч населения, а в мире этот показатель составляет 1,15 [7, 9].

В России в структуре онкологической заболеваемости населения в 2013 году рак слизистой оболочки полости рта составляет около 5,5% [4]. Среди опухолей головы

и шеи данная патология занимает второе место, после рака гортани [6].

Рост данной патологии связывается с курением, употреблением крепких алкогольных напитков, плохой гигиеной полости рта, неполноценным питанием, неудовлетворительными результатами лечения предраковых заболеваний [5].

Рак орофарингеальной зоны среди причин летальности стоит на 4-м месте, после рака легкого, желудка и колоректальной зоны [6].

Несмотря на появление различных современных методик лечения, смертность от рака органов полости рта в Российской

Федерации у мужчин занимает 7 место, у женщин – 16-е и в 2007 году составила 8,1 и 1,1 на 100 тысяч населения [6], эти данные указывают на необходимость продолжения изучения онкогенеза с других сторон.

В последние годы появилось много исследований, посвященных связи онкопатологии и вирусных инфекций, изучающих так называемый вирус-ассоциированный онкогенез. Было доказано, что более чем в 15% этиологическими агентами новообразований являются вирусы [10].

Из всех вирусов наибольший интерес исследователей вызывают вирус Эпштейна – Барр (ВЭБ) и вирус папилломы человека (ВПЧ), им посвящено большое количество научных работ [3].

По данным зарубежных авторов, доказательств связи вируса Эпштейна – Барр и развития новообразований являются: моноклональность ДНК ВЭБ в опухолевых клетках, высокий уровень свободной вирусной ДНК в плазме крови пациентов, наличие корреляции между титром антивирусных антител, уровнем свободной вирусной ДНК в плазме пациента и тяжестью заболевания, также повышенный титр антивирусных антител часто предшествует появлению новообразования и остается высоким на момент постановки диагноза [8].

Перерождение же папилломы в злокачественное новообразование прямо пропорционально связи между онкогенным белком и опухолевым супрессорным белком, например Е6 связывается с р53, Е7 с Rb. Папилломавирусы – единственная группа вирусов, для которых доказано, что они индуцируют образование опухолей у человека в естественных условиях. Онкопротеин Е6 экспрессирует телемеразу, ответственную за активацию пролиферации клеток. Онкобелок Е7 в сочетании с метаболизированием эстрадиола и как следствие образования 16а-гидроксистерона (16а-ОНЕ1), активирующего экспрессию гена Е7, является патогенетической основой вирус-индуцированного онкогенеза. Все это обеспечивает пролиферацию опухолевых клеток и подавляет иммунный ответ [2]. Наличие Е7 (Е6) в цервикальных пробах свидетельствует о процессе малигнизации эпителиальных клеток. Так, для выявления онкопротеина Е7 были созданы тест-системы, для ИФА [2].

Оценка локального уровня некоторых цитокинов при данных процессах представляет отдельный интерес, поскольку воспалительный процесс вызывает их гиперпродукцию иммунокомпетентны-

ми клетками, и некоторые из них могут быть факторами роста и распространения опухоли [1].

Исследование микрососудистой инвазии опухолевых клеток в эндотелиальный слой сосудов вызывает интерес как предиктор высокой стадии, степени и распространенности опухоли и, как следствие, возможность ее использования с прогностической целью для оценки течения и прогноза заболевания.

Таким образом, с учетом мониторинга совокупности факторов, ассоциированных с онкогенезом, представляется целесообразным уточнение их прогностической значимости для оценки прогрессирования процесса при раке органов полости рта.

Цель исследования – оценить роль вирусов Эпштейна – Барр и папилломы человека, микрососудистой инвазии и локального уровня цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , ИЛ1RA, ИНФ- α , ИНФ- γ , ФНО- α) на течение РОПР.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были 72 больных РОПР, которые были разделены на 3 группы по 24 человека, первая группа с наличием регионарных метастазов, вторая – без метастазов, третья – с рецидивами, проходивших лечение в отделении опухолей головы и шеи ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ в 2004–2012 гг.

Мужчин было 56, женщин – 16. Возраст больных составлял 34–73 года. По распространенности процесса: со II стадией (T2N0M0) было 13 человек, III – 30 (T2N1M0 – 4, T3N0M0 – 18, T3N1M0 – 8), IV – 29 (T3N2M0 – 4, T4N0M0 – 15, T4N1M0 – 10).

У 59 (81,9%) больных опухолевым процессом был поражен язык, у 13 (18,1%) – слизистая дна полости рта. На языке опухоль располагалась чаще на боковой поверхности (52,8%).

У всех больных был плоскоклеточный рак. Высокая степень дифференцировки (G1) имела место у 22 больных, средняя степень (G2) – 35 и низкая степень (G3) – 15.

Материалом для исследования служили фиксированные в формалине и парафине (FFPE ткани) интраоперационно взятые образцы ткани опухоли и перитуморальной зоны.

Из FFPE ткани экстракцию вирусной ДНК проводили в ручном режиме методом сорбции на колонках с использованием набора реагентов «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» (QIAGEN, Германия).

Из гомогената ткани опухоли, взятой интраоперационно, ДНК вируса выделяли методом сорбции на магнитных частицах в автоматическом режиме на приборе MagNa Pure Compact с использованием набора реагентов MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I-Large Volume на приборе MagNa Pure Compact (Roche, Швейцария). Амплификацию с последующей детекцией ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на термоциклере RotorGene 6000 (QIAGEN, Германия).

Выявление ДНК вируса ВЭБ, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ) и вируса папилломы человека (ВПЧ) проводили методом мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» на термоциклере Rotor Gene 6000 (QIAGEN, Германия).

Для определения ДНК, генотипа (ВПЧ) и концентрации вируса в образцах использовали наборы реагентов производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Методом ELISA определяли локальные уровни интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , ИЛ1RA, ИНФ- α , ИНФ- γ , ФНО- α) в гомогенатах фрагментов ткани опухоли и пограничной с опухолью макроскопически неизменной ткани, взятые интраоперационно. Рассчитывали удельное содержание цитокинов (пг/мл на 1 г белка).

Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-Link Thermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65°C, восстановление антигена в течение 20 минут при температуре 97°C и дальнейшее охлаждение до 65°C. Затем стекла промывались в течение 1–3 минут TBS-буфером (Dako) и помещались в автостейнер Thermo Scientific для окрашивания в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку экспрессии маркеров изучали как минимум на 10 случайно выбранных полях с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением x10, x20, x40.

Для оценки ангиогенеза в опухолях применяли окрашивание микрососудов антителом CD34. Коли-

чество сосудов определяли в каждом поле зрения препарата при использовании объектива x40.

Для оценки пролиферативной активности опухоли подсчитывали количество ki-67-положительных опухолевых клеток, приходящихся на 200–300 опухолевых клеток, использовали антиген ki-67. Также определяли нормальный и мутантный тип p53.

Статистическая обработка осуществлялась программой Statistica 6,0.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные молекулярно-биологических исследований показали, что уровень инфицирования ткани опухоли вирусами папилломы человека составил 20,8%, в том числе низкого онкогенного риска 5,4%, высокого 15,3%. Чаще других были выявлены 16 тип (11,1%) и 11 тип ВПЧ (4,2%). Частота инфицирования пациентов в зависимости от группы представлена на рис. 1.

Установлена зависимость частоты метастазирования и рецидивирования опухоли от группы вируса. ВПЧ низкого и высокого онкогенного риска чаще были обнаружены в образцах без метастазов.

Частота инфицирования ткани опухоли вирусами группы герпеса составила 68,1%, в т.ч. вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ 1 типа) 5,5%, цитомегаловируса (ЦМВ) 11,1%, вируса Эпштейна – Барр (ВЭБ) 62,5%, вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6 типа) 16,7%. На рис. 2 представлено распределение инфицированности вирусами группы герпеса в зависимости от группы больных.

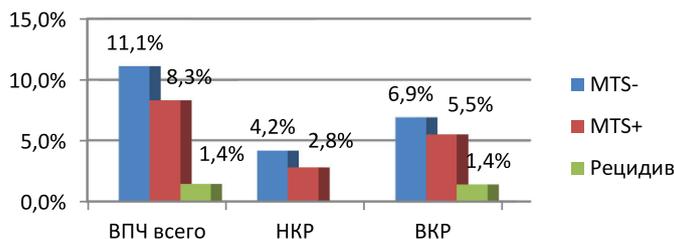


Рис. 1. Частота инфицирования FFPE ткани у пациентов с метастазами, без метастазов, с рецидивами

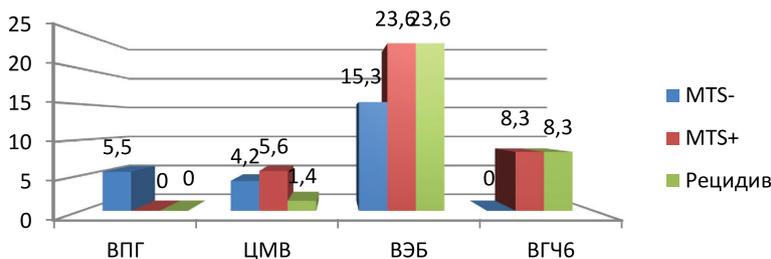


Рис. 2. Частота инфицирования ткани опухоли вирусами группы герпеса у пациентов с метастазами, без метастазов и с рецидивами

С увеличением распространенности опухолевого процесса было отмечено увеличение частоты инфицирования ткани опухоли вирусами группы герпеса. В большей степени это положение характерно для ВЭБ, ВГЧ 6 типа. Так, суммарная частота инфицирования всеми представителями этой группы для стадии T2 составила 70,6%, T3 – 80%, T4 – 84%. Для цитомегаловируса эти показатели составили 5,9; 12,5 и 16%, для вируса Эпштейна – Барр – 64,7; 80 и 80%, для вируса герпеса 6 типа 11,7; 16,7 и 20% соответственно.

При анализе клинических данных в сопоставлении с полученными лабораторными было установлено, что у больных с регионарными метастазами ВЭБ встречался в 17 случаях (70,8%) от общего числа больных данной группы), в то время как ВПЧ – в одном (25%). У больных без метастазов ВЭБ был выявлен в 11 случаях (45,8%), в то время как ВПЧ – у 8 (33,3%). Для больных с рецидивами ВЭБ составил – 17 случаев (70,8%), а ВПЧ – 1 (1,4%). Таким образом, у больных с метастазами и рецидивами выявление ВЭБ-ассоциированного рака было выше (70,8%), чем у больных без метастазов (45,8%), в то время как ВПЧ-позитивные больные встречались чаще в группе без метастазов (33,3%), в отличие от других групп (25 и 1,4%).

При изучении локальных уровней цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , ИЛ1RA, ИНФ- α , ИНФ- γ , ФНО- α) отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) более высокое содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 в группе больных без регионарных метастазов; у больных с регионарными метастазами наблюдались сходные различия, статистически значимые по ИЛ-1 β и ИЛ-8. При рецидивах подобная разница отмечена только по уровню ИЛ-6. Следует отметить, что при рецидивах в тканевых образцах перифокальной зоны и опухоли утрачиваются различия по ИЛ-1 β и ИЛ-8, выраженные в двух других группах, что говорит о приближении иммунологических характеристик визуально не малигнизированной ткани к опухолевой и может косвенно свидетельствовать об утрате ею свойств, ограничивающих пролиферативный потенциал опухоли.

В ткани опухоли не найдено статистически достоверных различий цитокинового состава в зависимости от наличия рецидива или метастазов; в перифокальной зоне обнаружено 2 различия: при рецидивах опухоли выше, чем при первичной оказались уровни ФНО- α и ИЛ-1 β . Однако, с учетом наличия во многих случаях воспаления, роль цитокинов представляется неспецифической для опухолевого

процесса, и вклад найденных различий в развитие рецидивирования или метастазирования остается неясным.

При оценке внутриопухолевой микросудистой плотности с использованием CD34 выявлено в каждой из исследуемых групп преобладание мелких тонкостенных сосудов. В группе с метастазами и рецидивами также отмечено наличие сосудов и более крупного диаметра с утолщенной стенкой.

Среднее количество сосудов в 1 поле зрения: в группе без метастазов составило $6,4 \pm 0,7$; в группе с метастазами $8,8 \pm 0,9^*$; в группе с рецидивами $9,7 \pm 0,8^*$ (* – отличия показателей статистически достоверны по отношению к группе без метастазов ($P \leq 0,05$)).

Проведение иммуногистохимического исследования выявило наличие достоверных различий экспрессии опухолевыми клетками Ki-67 и P53

	Группа без метастазов	Группа с метастазами	Группа с рецидивами
Ki-67	$24,3 \pm 2,6$	$46,7 \pm 4,1^*$	$27,5 \pm 2,9^{\circ}$
P53	$21,2 \pm 3,9$	$60,1 \pm 3,7^*$	$33,5 \pm 3,6^{\circ}$

Примечания:

* – отличия показателей статистически достоверны по отношению к группе без метастазов ($P \leq 0,05$);

$^{\circ}$ – отличия показателей статистически достоверны по отношению к группе с метастазами ($P \leq 0,05$).

Нами также отмечено снижение частоты встречаемости положительных случаев по p53 в группе рецидивов, что может свидетельствовать не только о присутствии в клетках функционального («дикого типа») p53, но и о наличии мутантного p53 с «нулевым» фенотипом (отсутствием транскрипции белка) – так называемые ложноотрицательные случаи.

Заключение

1. Инфицированность вирусами папилломы человека ткани опухоли можно рассматривать как благоприятный прогностический признак в отношении развития метастазов у больных с раком органов полости рта (в группе без метастазов (33,3%), в отличие от других групп (25 и 1,4%)). Инфицирование вирусами группы герпеса ткани опухоли можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак (выявление ВЭБ-ассоциированного рака – 70,8% у больных с метастазами и рецидивами, у больных без метастазов 45,8%).

2. Различия тканевого цитокинового состава между больными раком языка и полости рта без регионарных метастазов, с регионарными метастазами и при рецидивах статистически не значимы. При этом показаны различия их уровня между тканью опухоли и перитуморальной области с преобладанием содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 в опухолевой ткани. Вероятно, избыток провоспалительных цитокинов, у которых описаны ростостимулирующие свойства, наблюдается за счет их продукции опухолевыми клетками, а также присутствующими в очаге активированными макрофагами, что способствует росту и распространению опухоли.

3. Преобладание сосудов крупного диаметра с утолщенной стенкой может коррелировать с наличием или возможным развитием метастазов и рецидивов, таким образом, иметь неблагоприятный прогностический характер.

Перечень сокращений:

- ВГЧ – вирус герпеса человека,
- ВПГ 1 типа – вирус простого герпеса 1 типа,
- ВГЧ 6 типа – вирус герпеса человека 6 типа,
- ВПЧ – вирус папилломы человека,
- ВПЧ 16 типа – вирус папилломы человека 16 типа,
- ВПЧ ВКР – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска,
- ВПЧ НКР – вирусы папиллом человека низкого канцерогенного риска,
- ВЭБ – вирус Эпштейна – Барр,
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота,
- ИЛ-2 – Интерлейкин-2,
- ИЛ-6 – Интерлейкин-6,
- ИЛ-8 – Интерлейкин-8,
- ИЛ-10 – Интерлейкин-10,
- ИЛ-1 β – Интерлейкин – 1 β ,
- ИЛ1RA – Интерлейкин 1RA,
- ИНФ- α – Интерферон- α ,
- ИНФ- γ – Интерферон- γ ,
- ИФА – Иммуноферментный анализ,
- ПЦР – полимеразная цепная реакция,
- РОПР – рак органов полости рта,
- ЦМВ – цитомегаловирус,
- ФНО- α – Фактор некроза опухоли – α .

Список литературы

1. Бережная Н.М., Чехун В.М. Иммунология злокачественного роста. – Киев: Наукова Думка, 2005. – 791 с.
2. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга. 2006. – 76 с.
3. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. – К.: Феникс, 2009. – 248 с.

4. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). – М., 2015. – С. 250.

5. Пачес А.И. Опухоли головы и шеи // Медицина. – М., 2001.

6. Чиссов В.И. и соавторы. Основные показатели состояния специализированной онкологической помощи населению России в 2009 году. – М., 2010. – С. 168.

7. Ang K.K. Fractionation Effects in Clinical Practice // Textbook of Radiation oncology. – Philadelphia: W.B. Saunders company. – 2005. – P. 26–41.

8. Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, and Koichi Yamanishi // Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. – Cambridge: Cambridge University Press, 2007. – 1432 P. 929–932.

9. Holmes J.D., Martin R.A., Gutta R. Characteristics of head and neck cancer patients referred to an oral and maxillofacial surgeon in the United States for management // J Oral Maxillofac Surg. – 2010 Mar. – № 68(3). – P. 555–61.

10. zur Hausen H. Viruses in human cancer // European Journal of Cancer. – 1999. – Vol. 35. – P. 1878–1885.

References

1. Berezhnaya N.M., Chehun V.M. *Immunologiya zlokachestvennogo rosta Kiev: Naukova Dumka, 2005*, pp. 791.
2. Dmitriev G.A., Bitkina O.A. *Papillomovirusnaya infektsiya – Moskva: Meditsinskaya kniga, 2006*, pp. 76.
3. Kazmirchuk V.E., Maltsev D.V. *Klinika, diagnostika i lechenie herpesvirusnyh infektsiy – Kiev: Feniks, 2009*, pp. 248.
4. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. *Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2013 godu (zabolevaemost i smertnost) – Moskva, 2015*, pp. 250.
5. Pachec A.I. *Opuholi golovy i shei – Meditsina, Moskva, 2001*.
6. Chissov V.I. I soavtory. *Osnovnye pokazateli sostoyaniya spetsializirovannoy onkologicheskoy pomoschi naseleniu Rossii v 2009 godu – Moskva, 2010*, pp. 168.
7. Ang K.K. *Fractionation Effects in Clinical Practice – Textbook of Radiation oncology. Philadelphia: W.B. Saunders company, 2005*, pp. 26–41.
8. Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, and Koichi Yamanishi. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis – Cambridge: Cambridge University Press, 2007*, 1432, pp. 929–932.
9. Holmes JD, Martin RA, Gutta R. *Characteristics of head and neck cancer patients referred to an oral and maxillofacial surgeon in the United States for management. – J Oral Maxillofac Surg, 2010*, no. 68(3):555, pp. 61.
10. zur Hausen H. *Viruses in human cancer – European Journal of Cancer, 1999*, Vol. 35, pp. 1878–1885.

Рецензенты:

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии, Ростовский государственный медицинский университет, г. Ростов-на-Дону;

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изыскания новых противоопухолевых средств и изучение механизма их действия, ФГБУ РНИОИ МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 02.03.2015.