Литература

1. Берштейн, Л. М. Рак щитовидной железы: эпидемиология, эндокринология, факторы и механизмы канцерогенеза / Л. М. Берштейн // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 1–8.
2. Валдина, Е. А. Заболевания щитовидной железы / Е. А. Валдина. – СПб.: Питер, 2005. – 368 с.
3. Заривчацкий, М. Ф. Основы хирургической эндокринологии: руководство для врачей / М. Ф. Заривчацкий, О. П. Богатырев, С. А. Блинов [и др.]. – Пермь: ГБОУ ВПО «ПГМУ им. ак. Е. А. Вагнера» Минздрава России, 2014. – 314 с.
4. Левински, А. Узловой зоб, подозрительный на злокачественность / А. Левински, З. Адамчевски // *Thyroid International*. – 2013. – № 1. – С. 1–18.

References

1. Bernstein L. M. *Prakticheskaya onkologiya*. – *Practical Oncology*. 2007;8(1):1-8.
2. Valdina E. A. *Thyroid disease. Manual*. St. Petersburg: Peter; 2005. 368 p.
3. Zarivchatsky M. F., Bogatyrev O. P., Blinov S. A., Denisov S. A., Kolevator A. P., Teplykh N. S. *Warm Fundamentals of Surgical Endocrinology: a guide for physicians*. Perm; 2014. 314 p.
4. Lewinski A., Adamchewski Z. *Thyroid International*. 2013;(1):1-18.

5. Мерабишвили, В. М. Онкологическая служба в Санкт-Петербурге и районах города в 2005 г. / В. М. Мерабишвили. – Санкт-Петербург, 2006. – 123 с.
6. Рак щитовидной железы. «ГЕОТАР-Медиа» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://tomograph.dp.ua/pdf/oncology-books/Рак%20щитовидной%20железы.pdf>
7. Чиссов, В. И. Злокачественные новообразования в России в 2000 году / В. И. Чиссов, В. В. Старинский. – М.: МНИОИ им. П. А. Герцена, 2002. – 264 с.
8. Schlumberger, M. J. Papillary and follicular thyroid carcinoma / M. J. Schlumberger // *New Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 338, № 5. – P. 297–306.

5. Merabishvili V. M. *Oncology Service in St. Petersburg and parts of the city in 2005*. St. Petersburg; 2006. 123 p.
6. Thyroid Cancer. «GEOTAR Media». URL: <http://tomograph.dp.ua/pdf/oncology-books/Рак%20щитовидной%20железы.pdf>
7. Chissov V. I., Starinskiy V. V. *Malignancies in Russia in 2000*. M.: «MNIIOI them. P. A. Gertse»; 2002. 264 p.
8. Schlumberger M. J. *New Engl. J. Med.* 1998;338(5):297-306.

Сведения об авторах:

Варганов Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, доцент кафедры факультетской хирургии; тел.: 89226851883; e-mail: varganov_mikhail@mail.ru

Проничев Вячеслав Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии; тел.: 89128501967; e-mail: asu@rkb1.udm.ru

Леднева Анна Викторовна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры факультетской хирургии; тел.: 89127616151; e-mail: AnnaVLed@ya.ru

Костарева Елена Юрьевна, кандидат медицинских наук, врач-цитолог; тел.: 8(3412)468661; e-mail: 1rkb@udmnet.ru

Загребина Надежда Ивановна, врач ультразвуковой диагностики; тел.: 8(3412)468661; e-mail: 1rkb@udmnet.ru

Суханов Сергей Аркадьевич, врач-патологоанатом; тел.: 8(3412)646653; e-mail: info@onco18.ru

Головизнина Елена Владимировна, врач ультразвуковой диагностики; тел.: 8(3412)468661; e-mail: 1rkb@udmnet.ru

Порываева Екатерина Леонидовна, аспирант кафедры факультетской хирургии; врач-хирург; тел.: 89127628636; e-mail: asu@rkb1.udm.ru

© Коллектив авторов, 2016

УДК 616.311-006.6-018:612.015

DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11122>

ISSN 2073-8137

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ТКАНЯХ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

О. И. Кит¹, Е. Ф. Комарова¹, В. И. Кононенко², В. В. Позднякова¹,
А. Ю. Максимов¹, А. А. Демидова²

¹ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
Ростов-на-Дону, Россия

² Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTORS IN TISSUES OF ORAL MUCOSA CANCER

Kit O. I.¹, Komarova E. F.¹, Kononenko V. I.², Pozdnyakova V. V.¹,
Maksimov A. Yu.¹, Demidova A. A.²

¹ Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

² Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

В исследовании выполнялось изучение экспрессии HIF-1 α и ядерных факторов транскрипции семейства NF- κ B p50 и p65 в ткани опухоли больных раком слизистой оболочки полости рта (СОПР). Методом ИФА в опухолевой ткани 41 больного раком СОПР (T1-4N0-2M0-1) оценивали уровень гипоксия-индуци-

белкового фактора-1 α (HIF-1 α) и ядерных факторов транскрипции семейства NF-kB (p50 и p65 форм). Контролем служила гистологически неизменная ткань слизистой оболочки рта. В опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной содержание HIF-1 α возросло в 2,2 раза ($p < 0,05$), NF-kB p50 – в 3 раза ($p < 0,05$), NF-kB p65 – в 6 раз ($p < 0,05$). Корреляционная связь между содержанием HIF-1 α и NF-kB p50 в опухолевой ткани 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 $p = 0,0001$). Корреляционная связь между HIF-1 α и NF-kB p65 была менее тесной. Таким образом, в опухолевой ткани рака слизистой оболочки полости рта установлена статистически значимая положительная корреляционная связь между активацией фактора HIF-1 α и транскрипционных факторов NF-kB p50 и NF-kB p65, сопряженная с распространённостью опухолевого процесса.

Ключевые слова: рак слизистой оболочки полости рта, HIF-1, NF-kB

In the study the expression of HIF-1 α and nuclear transcription factors of the NF-kB family, p50 and p65 in tumor tissue of patients with oral mucosa cancer (OMC) were examined. Levels of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and nuclear transcription factors of the NF-kB family (p50 and p65) were studied by ELISA in tumor tissue of 41 OMC (T1-4N0-2M0-1) patients. Histologically unchanged tissue of oral mucosa served as the control. Tumor tissue showed increased levels of HIF-1 α – by 2.2 times ($p < 0.05$), NF-kB p50 – by 3 times ($p < 0.05$) and NF-kB p65 – by 6 times ($p < 0.05$), in comparison with the histologically unchanged tissue. Correlation between HIF-1 α and NF-kB p50 in tumor tissue was the strongest in patients with poorly differentiated G3 tumors ($R = 0.56$, $p < 0.0001$) and in patients with lymph node lesions ($R = 0.53$, $p = 0.0001$). Correlation between HIF-1 α and NF-kB p65 was not so strong.

In conclusions, tumor tissue of oral mucosa cancer showed statistically significant positive correlation between the activation of HIF-1 α and NF-kB p50 and NF-kB p65, which was connected with the tumor grade.

Keywords: oral mucosa cancer, HIF-1, NF-kB

При формировании раковой опухоли изменяется баланс между потребностью в кислороде и его доставкой. Гипоксия, с одной стороны, ограничивает рост опухоли, с другой – через стимуляцию факторов ангиогенеза ведет к росту новых сосудов и метастазированию опухолевых клеток, а с третьей – стимулирует транскрипционные факторы, способствуя быстрому делению клеток, в том числе опухолевых [3]. Индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор 1-альфа (HIF-1 α) считается ведущим транскрипционным регулятором генов млекопитающих, активируется в физиологически важных местах регуляции кислородных путей, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, включает гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз [7, 9–11]. В экспериментальных исследованиях показано, что у эмбрионов крыс с «нокаутом» гена HIF-1 α не наблюдается апоптотического ответа [6].

Условием для стимуляции посредством гипоксия-индуцибельного фактора других транскрипционных молекул, способствующих делению опухолевых клеток, является проникновение фактора в ядро. В настоящее время выявлено взаимовлияние транскрипционных факторов HIF-1 α и NF-kB даже в условиях нормоксии [12]. Ядерный транскрипционный фактор карра-В (nuclear factor карра-В, NF-kB) связан с процессами апоптоза и контролем пролиферации клеток [8]. В настоящее время показано, что регуляция NF-kB сигнального пути нарушена во многих опухолях человека, в том числе и при раке слизистой оболочки полости рта (СОПР) [4]. Содержание в ткани опухоли рака СОПР NF-kB сопряжено с вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов [5].

Целью исследования было изучение экспрессии HIF-1 α и ядерных факторов транскрипции семейства NF-kB p50 и p65 в ткани опухоли больных раком СОПР.

Материал и методы. В исследование были включены 41 больной раком слизистой оболочки полости рта T1-4N0-2M0-1 стадии процесса. Средний возраст больных составил $50,5 \pm 4,4$ лет. Изолированное поражение тканей языка, переход процесса с языка на дно полости рта, очаги поражения в ретромолярной области и рак дна полости рта были установлены соответственно у 32,3; 19,4; 23,3 и 19,4 % больных. Были выявлены единичные случаи локализации на слизистой щеки и твердого неба.

Диагностика рака основывалась на результатах гистологического исследования в соответствии с отраслевыми стандартами и алгоритмами объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований в онкологии. Проведение данной работы было одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ. В каждом конкретном случае было получено добровольное информированное согласие больных на исследование материалов для проведения научных исследований.

Были изучены ткани опухоли, взятые во время оперативного вмешательства, а также образцы гистологически неизменной ткани, взятые от удаленных от видимого края опухоли участков (контроль). Исследуемые ткани были заморожены для дальнейшего хранения при температуре -70°C .

Методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли уровень экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α (HIF-1 α ; USCN Life Science, Китай) и ядерных факторов транскрипции семейства карра-В (NF-kBp50 и NF-kBp65, Caymanchem, США) в 10 % цитозольных фракциях, приготовленных на 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА.

Данные обрабатывались при помощи пакета статистических программ «STATISTICA 10.0». Взаимосвязь изученных факторов выявляли с помощью корреляционного анализа по Спирмену. При этом соблюдались общие рекомендации для медицинских исследований.

Результаты и обсуждение. Содержание изученных транскрипционных факторов в ткани опухоли и гистологически неизменной ткани больных раком СОПР представлено в таблице 1.

Таблица 1

Тканевая экспрессия транскрипционных факторов в ткани опухоли больных раком слизистой оболочки ротовой полости

Уровень экспрессии УЕ/мг белка	Исследуемая ткань	M±s	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
HIF-1α	ОП	11,5±4,2 ¹	10,9	8,5	13,3
	НТ	5,2±2,5	5,1	3,7	2,5
NF-kB p50	ОП	10,7±3,4 ¹	10,2	7,8	15,2
	НТ	3,6±1,6	3,8	2,4	5,3
NF-kB p65	ОП	12,1±3,8 ¹	12,5	8,7	16,1
	НТ	2,0±0,9	2,2	1,1	3,2
Коэффициент NF-kB p65/p50	ОП	1,17±0,15 ¹	1,12	0,92	1,28
	НТ	0,61±0,06	0,57	0,45	0,73

Примечание: ¹ – различия достоверны по сравнению с гистологически неизменной тканью ($p \leq 0,05$). ОП – ткань опухоли, НТ – гистологически неизменная ткань.

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

Анализ результатов оценки корреляционной связи между содержанием HIF-1α и NF-kB p50 в опухолевой ткани больных раком СОПР выявил следующие особенности (табл. 2): при Т3-4 установлена достоверная прямая связь ($R=0,34$ при $p=0,04$) между параметрами. В то время как у пациентов при Т1-2 статистически значимая связь отсутствовала ($R=0,11$ при $p=0,35$).

Таблица 2

Корреляционная связь содержания HIF-1α и NF-kB p50 в ткани опухоли больных раком СОПР с различным клиническим статусом

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

Корреляционная связь между содержанием HIF-1α и NF-kB p50 в опухолевой ткани была более тесной 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 [4], что объясняет его низкую активность. Наличие статистической взаимосвязи между HIF-1α и NF-kB p50 свидетельствовало о совместной активации двух транскрипционных факторов при развитии и прогрессии рака СОПР.

Таким образом, результаты анализа показателей у больных с различным клиническим статусом показали, что взаимосвязь между изучаемыми факторами усиливалась при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток.

Структура корреляционной связи между HIF-1α и NF-kB p65 в ткани опухоли больных раком СОПР повторяла характеристики связи между HIF-1α и NF-kB p50 (табл. 3).

Таблица 3

Корреляционная связь содержания HIF-1α и NF-kB p65 в ткани опухоли больных раком СОПР с различным клиническим статусом

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

Однако связь между HIF-1α и NF-kB p65 была менее тесной, чем между HIF-1α и NF-kB p50 при Т3-4 ($R=0,31$ при $p=0,03$ против $R=0,34$ при $p=0,04$), N1-2 ($R=0,40$ при $p=0,002$ против $R=0,52$ при $p=0,0001$), G3 ($R=0,47$ при $p < 0,0001$ против $R=0,56$ при $p < 0,0001$).

Полученные результаты свидетельствуют, что в ткани опухоли рака слизистой оболочки полости рта активность изученных транскрипционных факторов повышалась по сравнению с контрольными показателями. Обнаружено повышение индекса NF-kB p65/ NF-kB p50 в опухолевой ткани рака СОПР, что говорит о преобладании ядерного транскрипционного фактора каппа-В формы p65. Известно, что в неизменной ткани ядерный фактор транскрипции NF-kB находится в цитоплазме в неактивном состоянии в ассоциации с ингибитором [2], что объясняет его низкую активность. Повышение активности факторов, а также коэффициента NF-kB p65/p50 в опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной тканью указывает на преобладание активированных форм NF-kB. Опережающее накопление NF-kB p65 по сравнению с NF-kB p50 свидетельствует о повышении транскрипционной активности фактора NF-kB, который прямо или опосредованно модулирует экспрессию генов, контролирующих клеточное деление, апоптоз, неоангиогенез и инвазию – основополагающие процессы канцерогенеза [1].

Установлена наиболее тесная положительная корреляционная связь между содержанием HIF-1α и NF-kB p50 в опухолевой ткани у больных с низкой степенью дифференцировки G3 и при опухолевом поражении лимфоузлов. У пациентов с этими же характеристиками заболевания корреляционная связь между HIF-1α и NF-kB p65 была менее выраженной, но достоверной, что вероятно объясняется несоответствием между градиентом роста HIF-1α, NF-kB p50 и NF-kB p65 по мере развития и прогрессии рака СОПР. Наличие статистической взаимосвязи между HIF-1α и NF-kB p50 свидетельствовало о совместной взаимосвязанной активации двух транскрипционных факторов при развитии и прогрессии рака СОПР.

Заключение. Таким образом, в опухолевой ткани рака слизистой оболочки полости рта установлена статистически значимая положительная

корреляционная связь между активацией фактора HIF-1 α и транскрипционных факторов NF-kB p50 и NF-kB p65, сопряженная с распространенностью опухолевого процесса, что позволяет говорить о взаимовлиянии транскрипционных факторов, пред-

полагать модифицирующее влияние гипоксия-индуцибельного фактора на активацию ядерных факторов транскрипции семейства NF-kB, а также значимость этих факторов в патогенезе рака слизистой оболочки полости рта.

Литература

1. Герштейн, Е. С. Ключевые компоненты NF-kB-сигнального пути в опухолях больных раком молочной железы / Е. С. Герштейн, А. М. Щербаков, Е. В. Ошкина // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2014. – Т.19, № 3. – С. 950–956.
2. Клаан, Н. К. Ядерный фактор каппа В (NF-kB) в качестве мишени для действия природных противоопухолевых соединений / Н. К. Клаан, Т. А. Пронина, Л. П. Акиншина, В. В. Решетникова // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – № 1. – С. 3–8.
3. Лимфангиогенез и метастазирование опухолей / А. А. Фильченков // Онкологія (укр.). – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 94–103.
4. Спирина, Л. В. Активность и субъединичный состав протеасом в плоскоклеточных карциномах головы и шеи / Л. В. Спирина, И. В. Кондакова, Е. Л. Чойнзон / [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 1. – С. 89–92.
5. Спирина, Л. В. Экспрессия транскрипционных факторов NF-kB и HIF-1 в плоскоклеточных карциномах головы и шеи: связь с прогнозом заболевания / Л. В. Спирина, Е. Л. Чойнзон, И. В. Кондакова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2013. – № 5. – С. 575–579.

6. Carmeliet, P. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis / P. Carmeliet, Y. Dor, J.-M. Herbert [et al.] // Nature. – 1998. – № 394. – P. 485–490.
7. De Lima, P. O. Hypoxic condition and prognosis in oral squamous cell carcinoma / P. O. De Lima, C. C. Jorge, D. T. Oliveira, M. C. Pereira // Anticancer research. – 2014. – Vol. 34. – P. 605–612.
8. Hoffmann, A. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling / A. Hoffmann, D. Baltimore // Immunol. Rev. – 2006. – Vol. 210. – P. 171–186.
9. Kang, F. W. Hypoxia-inducible factor-1 α overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma / F. W. Kang, Y. Gao, L. Que [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2013. – Vol. 5. – P. 112–118.
10. Perez-Sayans, M. Hypoxia-inducible factors in OSCC / M. Perez-Sayans, J. M. Suárez-Peñaranda, G. D. Pilar, F. Barros-Angueira // Cancer letters. – 2011. – Vol. 313, № 1. – P. 1–8.
11. Semenza, G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology / G. L. Semenza // Ann. Rev. Pathol. – 2013. – Vol. 7. – P. 7.
12. Uden, P. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha by NF-kappaB / P. Uden, N. S. Kenneth, S. Rocha // Biochem. J. – 2008. – Vol. 412, № 3. – P. 477–484.

References

1. Gershtein E. S., Shherbakov A. M., Oshkina E. V. *Vestnik Tambovskogo universiteta. – Journal Tambov University Reports.* 2014;19(3):950-956.
2. Klaan N. K., Pronina T. A., Akin'shina L. P., Reshetnikova V. V. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal. – Russian journal of Biotherapy.* 2014;1:3-8.
3. Fil'chenkov A. A. *Onkologija. – Oncology.* 2009;11(2):94-103.
4. Spirina L. V., Kondakova I. V., Chojnzonov E. L., Sharova N. P., Chizhevskaja S. Ju., Shishkin D. A. *Bjulleten' 'jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010;1:89-92.
5. Spirina L. V., Chojnzonov E. L., Kondakova I. V., Shishkin D. A., Chizhevskaja S. Ju. *Voprosy onkologii. – Problems of oncology.* 2013;5:575-579.

6. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.-M. *Nature.* 1998;394:485-490.
7. De Lima P. O., Jorge C. C., Oliveira D. T., Pereira M. C. *Anticancer research.* 2014;34:605-612.
8. Hoffmann A., Baltimore D. *Immunol. Rev.* 2006;210:171-186.
9. Kang F. W., Gao Y., Que L., Sun J., Wang Z. L. *Exp. ther. med.* 2013;5:112-118.
10. Perez-Sayans M., Suárez-Peñaranda J. M., Pilar G. D., Barros-Angueira F. *Cancer letters.* 2011;313(1):1-8.
11. Semenza G. L. *Ann. rev. pathol.* 2013;7:7.
12. Uden P., Kenneth N. S., Rocha S. *Biochem. J.* 2008;412(3):477-484.

Сведения об авторах:

Кит Олег Иванович, доктор медицинских наук, профессор, директор;
тел.: (8633)003005; e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Комарова Екатерина Федоровна, доктор биологических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник;
тел.: 89287777523; e-mail: katitako@gmail.com

Кононенко Владимир Иванович, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой стоматологии № 3;
тел.: 89185541831; e-mail: 941831@mail.ru

Позднякова Виктория Вадимовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник
отдела опухолей мягких тканей и костей;
тел.: 89034046277; e-mail: vvpdoc@gmail.com

Максимов Алексей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор,
заместитель директора по перспективным научным разработкам;
тел.: 89198874902; e-mail: maksimovau@rnioi.ru

Демидова Александра Александровна, кандидат медицинских наук,
доцент кафедры медицинской и биологической физики;
тел.: 89081764900; e-mail: alald@inbox.ru