

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ В ТКАНЯХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Евгений Лхамациренович ЧОЙНЗОНОВ^{1,2}, Людмила Викторовна СПИРИНА¹,
Ирина Викторовна КОНДАКОВА¹, Светлана Юрьевна ЧИЖЕВСКАЯ¹,
Дмитрий Александрович ШИШКИН¹, Денис Евгеньевич КУЛЬБАКИН¹

¹ НИИ онкологии СО РАМН
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Цель: изучить тотальную химотрипсинподобную активность протеасом и активность пулов протеасом в тканях плоскоклеточных карцином головы и шеи в зависимости от особенностей клинического течения заболевания с целью выявления показателей, значимых для прогноза выживаемости больных. Материал: 66 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом (T₂₋₃N₀₋₂). Методы. Активность протеасом исследовалась флуориметрическим методом. Разделение на пулы протеасом осуществляли методом высаливания. Проведен однофакторный анализ общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости с помощью теста Гехана-Вилкоксона и логрангового теста в зависимости от химотрипсинподобной активности протеасом. Результаты. Установлено, что высокая общая активность протеасом и высокая активность пула 26S-протеасом в опухолевой ткани являются признаком хорошего прогноза 2-летней общей выживаемости больных плоскоклеточным раком головы и шеи.

Ключевые слова: плоскоклеточные карциномы головы и шеи, прогноз заболевания, протеасомы.

Плоскоклеточный рак органов головы и шеи (ПКГШ) характеризуется бессимптомным течением, поздним обращением больных в специализированные учреждения, ранним возникновением метастазов и рецидивов, высокой смертностью уже на первом году после постановки диагноза [7, 11]. В значительной мере неудачи в лечении опухолей этой локализации связаны с неудовлетворительной оценкой прогноза течения заболевания и его исхода, основанного на использовании стандартных критериев, включающих клинические и морфологические характеристики опухолевого процесса.

Основной причиной летальности при ПКГШ являются местные рецидивы и метастазы в лим-

фатические узлы шеи. Распространенность опухолевого процесса – важный критерий прогноза и определения тактики лечения, однако далеко не всегда выявляется ее корреляция с эффективностью терапии и исходом заболевания [6]. Кроме того, известно, что около 25 % пациентов имеют скрытые метастазы в лимфатические узлы, которые не проявляются клинически, поэтому на ранних стадиях опухолевого процесса клинкоморфологические критерии часто малоинформативны. Для решения подобных практических задач возникает потребность в дополнительных молекулярных маркерах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и определять объективный прогноз развития

Чойнзонов Е.Л. – д.м.н., проф., академик РАН, директор, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Спирин Л.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

Кондакова И.В. – д.м.н., проф., зав. лабораторией биохимии опухолей, e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Чижевская С.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Шишкин Д.А. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@sibmail.com

Кульбакин Д.Е. – младший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

заболевания [2, 3]. В этой связи перспективным является изучение протеиназ, поскольку предполагается, что они играют важную роль в опухолевом росте [4, 5].

Эффективную регуляцию количества и функций многих белков в клетках осуществляют протеасомы, которые гидролизуют до 80 % внутриклеточных протеинов [8, 12]. Выделяют пулы 26S- и 20S-протеасом. Полный протеолиз происходит в 26S-протеасоме, в состав которой входят 20S-протеасома и один или два регуляторных субкомплекса 19S (PA700), которые распознают убиквитинированные белки, подлежащие протеолизу, разворачивают их и переносят внутрь 26S-протеасомы [8, 13, 17]. Имунные формы 26S-протеасом играют важную роль в продукции иммуногенных пептидов для их презентации главным комплексом гистосовместимости I класса [14]. Если же в роли регуляторной частицы выступает другой белковый комплекс, например, PA28, то такая ассоциация представляет собой активированную 20S-протеасому, которая деградирует малые, аномальные и короткоживущие белки [13, 17]. Ранее нами показано, что общая химотрипсинподобная активность протеасом и активность 26S и 20S пулов протеасом в тканях ПКГШ выше, чем в окружающей неизмененной ткани [9, 10]. Поражение регионарных лимфоузлов сопровождалось ростом активности протеасом. Возможно, химотрипсинподобная активность протеасом и активность пулов протеасом могут быть связаны с исходом заболевания у больных ПКГШ.

Целью работы явилось изучение активности протеасом в опухолевых тканях больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи для выявления показателей, значимых для прогноза общей, безметастатической и безрецидивной выживаемости.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 66 пациентов, средний возраст которых составил $57,1 \pm 1,7$ года, с морфологически верифицированным диагнозом плоскоклеточного рака области головы и шеи $T_{2-3}N_{0-2}M_0$. В группу вошли 25 больных раком гортани и гортаноглотки, 23 пациента с опухолями ротовой полости и 18 человек с раком языка, которые ввиду одинакового гистологического строения опухоли составили общую группу больных ПКГШ. Мужчины были представлены в 83 % случаев (55 человек), женщины – в 27 % (11 человек). Стадию заболевания $T_2N_0M_0$ имели 22 пациента, $T_3N_{0-2}M_0$ – 44. У 54,5 % больных (36 человек) была стадия $T_{2-3}N_0M_0$, у 30 % (20 человек) – $T_{2-3}N_1M_0$, у 15,5% (10 человек) –

$T_{2-3}N_2M_0$. Высокодифференцированный рак верифицирован у 15, умеренно дифференцированный – у 42, низкодифференцированный – у 9 больных.

Все пациенты получали комбинированное лечение, включающее 2 курса неoadъювантной химиотерапии с интервалом 3–4 недели по схеме паклитаксел 175 мг/м², карбоплатин АУС 6 мг/(мл × мин) и лучевую терапию. Больные раком гортани и гортаноглотки получали лучевую терапию в режиме мультифракционирования дозы по 1,3 Гр 2 раза в день с интервалами в 4 ч, с оценкой эффекта на суммарную очаговую дозу (СОД) 40 Гр по изоэффекту. Больным раком ротовой полости и раком языка проводили лучевую терапию на область первичного очага и зоны возможного регионарного метастазирования в стандартном режиме (5 раз в неделю, разовая очаговая доза 2,0 Гр) до СОД 40,0 Гр. Затем больным, у которых была достигнута полная регрессия, продолжали лучевую терапию до СОД 65 Гр. Пациентам, эффект лечения которых был оценен как частичная регрессия или стабилизация, выполнялось хирургическое вмешательство. При наличии регионарных метастазов выполняли фасциально-футлярное иссечение шейной клетчатки. В дальнейшем с целью обнаружения признаков прогрессирования заболевания больные проходили обследование в течение первого года через 3 месяца и далее через каждые 6 месяцев.

Период динамического наблюдения за больными составил от 3 до 47 месяцев, средний срок – $16,6 \pm 1,5$ мес. У 10 пациентов в период от 8 до 26 месяцев после лечения выявлены рецидивы. Метастазы в регионарные лимфоузлы диагностированы у 3 больных в срок от 4 до 7 месяцев после лечения. Летальные исходы имели место у 18,2 % пациентов (12 человек).

Материал исследования составили операционные образцы опухолевой и неизменной ткани, находящейся на расстоянии не менее 2 см от границы опухоли, которые после забора замораживались и хранились при -80 °С.

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000 g и 4 °С.

Фракционирование протеасом. Все процедуры проводили при 4 °С. Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в два этапа. Фракцию, обогащенную 26S-протеасомами, получали добавлением

сульфата аммония до 40 % насыщения, фракцию 20S-протеасом – добавлением сульфата аммония до 70 % насыщения [1].

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную активность общего, 26S- и 20S-пулов протеасом определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизмененных тканей, а также во фракциях протеасом, по гидролизу флуорогенного олигопептида N-сукцинил-Лей-Лей-Вал-Тир-7-амидо-4-метилкумарин (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, Sigma, США), утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеасом [14], на флуориметре «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь для определения активности 20S протеасом содержала 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ дитиотреитол, 30 мкМ Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA. Для определения активности 26S-протеасом в реакционную смесь дополнительно вводили 5 мМ хлорида магния и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37 °С в течение 20 мин и останавливали 1%-м додецилсульфатом натрия. Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, США). За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистическая обработка. Прогностическую значимость признаков в отношении общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости оценивали с использованием программы Survival Analysis Statistica 6.0. Кривые кумулятивной выживаемости строили по методу Каплан–Майера. Значимость различий в выживаемости между группами оценивали с помощью критерия Гехана–Вилкоксона и логрангового критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прогнозирование течения опухолевого процесса является важной задачей в практической онкологии. Склонность к раннему метастазированию данного вида рака во многом определяет его неблагоприятный прогноз. Нами проведен анализ прогностической значимости определения активности протеасом и активности пулов протеасом в тканях ПКГШ с помощью теста Гехана–Вилкоксона и логрангового критерия для оценки безрецидивной, безметастатической и общей выживаемости. В качестве порогового значения для разделения больных на подгруппы служили средние значения показателей. Показатели выживаемости оценивали с помощью построения кривых выживаемости по методу Каплана–Майера.

Для выявления информативных прогностических критериев проанализированы общая химотрипсинподобная активность протеасом и активность пулов протеасом. Как следует из табл. 1, наибольшую информативную ценность для общей выживаемости больных имели общая активность протеасом и активность 26S-пула протеасом. Следует отметить, что состав исследуемых групп больных в зависимости от порогового уровня показателей сопоставим по стадиям онкологического процесса. Имеющие различия в группах статистически не значимы, что позволило провести анализ выживаемости больных с учетом выбранного уровня показателей в ткани опухоли (табл. 2).

На основании проведенного анализа выявлена зависимость общей выживаемости от общей активности протеасом и активности 26S-пула протеасом. Так, общая выживаемость больных значительно выше у больных с общей активностью протеасом более 59,9×1000 Ед/мг белка и активностью 26S-пула протеасом более 20×1000 Ед/мг белка (рис. 1, 2). Зависимости безрецидивной и

Таблица 1

Однофакторный анализ прогностических параметров у больных ПКГШ

Активность протеасом, ×1000 Ед/мг белка		Выживаемость, <i>p</i>		
		безрецидивная	безметастатическая	общая
Общая активность	Менее 59,9	0,85	0,26	0,03
	Более 59,9			
Активность пула 26S	Менее 20,0	0,58	0,42	0,02
	Более 20,0			
Активность пула 20S	Менее 45,0	0,74	0,71	0,5
	Более 45,0			

Примечание. *p* – значимость различий; выделенным шрифтом обозначены значимые связи при *p* < 0,05.

Таблица 2

Распределение больных ПКГШ по стадиям онкологического процесса в зависимости от активности протеасом, кальпаинов, субъединичного состава протеасом

Активность протеасом, $\times 1000$ ед/мг белка		T ₂ , n (%)	T ₃ , n (%)	T ₂₋₃ N ₀ , n (%)	T ₂₋₃ N ₁₋₂ , n (%)
Общая активность	Менее 59,9	16 (47 %)	18 (53 %)	21 (61 %)	13 (39 %)
	Более 59,9	4 (13 %)	26 (87 %)	18 (60 %)	12 (40 %)
Активность пула 26S	Менее 20,0	11 (32 %)	23(68 %)	22 (65 %)	12 (34 %)
	Более 20,0	9 (30 %)	21 (70 %)	17 (57 %)	13 (43 %)
Активность пула 20S	Менее 45,0	13 (42 %)	18 (58 %)	18 (58 %)	13 (42 %)
	Более 45,0	7 (21 %)	26 (79 %)	21 (63 %)	12 (37 %)

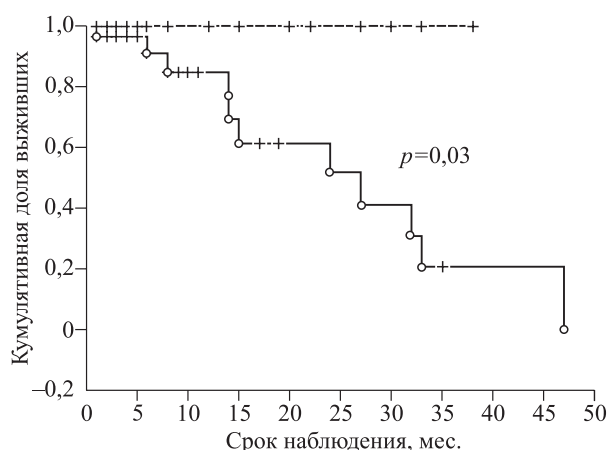


Рис. 1. Общая выживаемость больных ПКГШ при пороговом уровне общей активности протеасом менее $59,9 \times 1000$ ед/мг белка (сплошная линия) и более $59,9 \times 1000$ ед/мг белка (штриховая линия). Здесь и на рис. 2 кружками обозначены завершённые случаи, крестиками – цензурированные

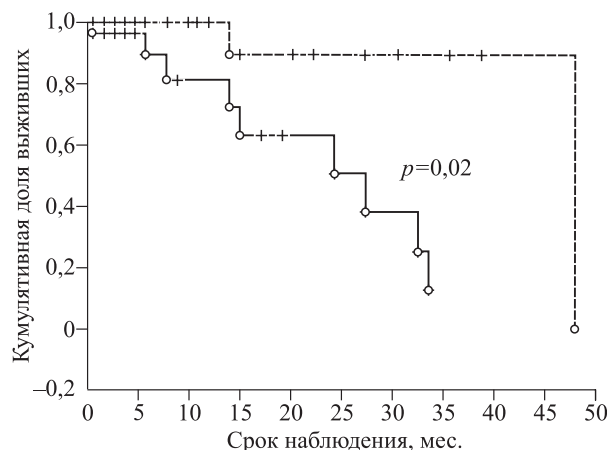


Рис. 2. Общая выживаемость больных ПКГШ при пороговом уровне активности 26S-протеасом менее $20,0 \times 1000$ ед/мг белка (сплошная линия) и более $20,0 \times 1000$ Ед/мг белка (штриховая линия)

безметастатической выживаемости от активности протеасом выявлено не было.

Таким образом, высокая общая активность и активность 26S-пула протеасом в опухолевой ткани связаны с повышением общей 2-летней выживаемости, что позволяет рассматривать эти показатели в качестве новых молекулярных критериев прогноза течения ПКГШ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Важность внутриклеточного специфического протеолиза в развитии злокачественных опухолей показана при новообразованиях различных локализаций [8, 9]. В ранее проведенных нами исследованиях выявлено участие протеасом на всех этапах опухолевого роста ПКГШ [12]. Отмечалось повышение активности 20S-протеасом с увеличением размеров опухоли и при наличии

лимфогенных метастазов. Следует отметить, что поражение регионарных лимфоузлов и рост опухоли были связаны с возрастанием активности 20S-протеасом, что может отражать тяжесть патологических изменений. Вероятно, накопление дефектных и аномальных белков и полипептидов в онкогенезе при активации неспецифического или частичного протеолиза в 20S-протеасомах служит толчком к прогрессированию заболевания.

Полученные в представленной работе данные показывают, что более агрессивный характер течения заболевания отмечается у больных ПКГШ с низкой общей активностью протеасом и активностью 26S-пула протеасом в ткани опухоли. Высокая общая активность протеасом при увеличении выживаемости больных, вероятно, связана с ростом активности специфического протеолиза при участии 26S-протеасом, контролирующих

основные процессы жизнедеятельности клетки, что позволяет, в свою очередь, сдерживать рост опухоли за счет увеличения деградации важных для опухолевого роста белков. Известно, что убиквитинзависимая протеасомная система принимает участие в разрушении многих регуляторных белков, в том числе молекул путей передачи сигналов от ростовых факторов и, частично, самих рецепторов ростовых факторов, а также белков-регуляторов клеточного цикла, таких как p27 и циклин E [15, 16]. Также многие белки, опосредующие программируемую клеточную гибель, являются субстратами для протеасом: опухолевый супрессор p53, ингибитор NF- κ B I κ B, белки семейства Bcl-2, белки, контролирующие активность каспаз (IAPs), и другие [18].

Вероятно, специфический внутриклеточный протеолиз играет важную роль в патогенезе ПКГШ, что определяет большую значимость показателей протеасомной системы для выживаемости больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате представленного исследования выявлены особенности активности протеасом в связи с течением заболевания, что определяет важный вклад внутриклеточного специфического протеолиза в развитие ПКГШ. Установлено, что высокая активность общего пула протеасом и 26S-пула протеасом являются признаком хорошего прогноза 2-летней общей выживаемости больных ПКГШ. Данный факт служит предпосылкой внедрения этих показателей в практическую онкологию в качестве дополнительных прогностических показателей течения заболевания, что позволит оптимизировать тактику ведения больных и сроки динамического наблюдения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А. и др.* Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению // Изв. РАН. Сер. биол. 2004. (2). 150–156.
2. *Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л.* Постгеномные технологии в прогнозе метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи // Рос. биотерапевт. журн. 2011. (3). 31–36.
3. *Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л.* Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи // Вопр. онкологии. 2012. 58. (1). 26–32.
4. *Клишио Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л.* Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // Сиб. онкол. журн. 2003. (2). 62–70.

5. *Кондакова И.В., Клишио Е.В., Савенкова О.В. и др.* Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 и их тканевые ингибиторы как факторы метастазирования злокачественных новообразований головы и шеи // Биомед. химия. 2008. 54. (5). 555–560.

6. *Любаев В.Л., Айдарбекова А.А.* Эффективность хирургических вмешательств при лечении регионарных метастазов у больных раком слизистой оболочки полости рта и ротоглотки // Сиб. онкол. журн. 2006. (2). 11–15.

7. *Пачес А.И.* Опухоли головы и шеи. М.: Медицина, 2000. 479 с.

8. *Спирина Л.В., Кондакова И.В.* Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе // Вопр. онкологии. 2008. 54. (6). 690–694.

9. *Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. и др.* Активность протеасом в тканях злокачественных опухолей различных локализаций // Сиб. онкол. журн. 2009. (5). 49–52.

10. *Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. и др.* Активность и субъединичный состав в плоскоклеточных карциномах головы и шеи // Бюл. эксперим. биол. мед. 2010. 149. 89–92.

11. *Чойнзонов Е.Л., Балацкая Л.Н., Кицманюк З.Д. и др.* Реабилитация больных опухолями головы и шеи. Томск: НТЛ, 2003. 296 с.

12. *Чойнзонов Е.Л., Спирина Л.В., Кондакова И.В. и др.* Роль внутриклеточных протеиназ в регуляции экспрессии транскрипционных факторов NF-1, NF- κ B и фактора роста сосудов при лимфогенном метастазировании плоскоклеточных карцином головы и шеи // Бюл. СО РАМН. 2012. (6). 15–21.

13. *Шарова Н.П., Астахова Т.М., Карпова Я.Д. и др.* Множественные формы протеасом как объекты для разработки новых противоопухолевых лекарств // Онкохирургия. 2011. 3. (2). 37–42.

14. *Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E. et al.* 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // J. Biol. Chem. 1999. 274. 21963–21972.

15. *Glasgow E., Mishra L.* Transforming growth factor-beta signaling and ubiquitinators in cancer // Endocr. Relat. Cancer. 2008. 15. 59–72.

16. *Kudo Y., Takata T., Ogawa I. et al.* p27Kip1 Accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells // Clin. Cancer Res. 2000. 6. 916–923.

17. *Mani A., Gelmann E.P.* The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer // J. Clin. Oncol. 2005. 23. (21). 4776–4789.

18. *Tu Y., Chen C., Pan J. et al.* The ubiquitin proteasome pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2012. 5. (8). 726–738.

PROGNOSTIC VALUE OF PROTEASOME ACTIVITY DETERMINATION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF HEAD AND NECK

Evgeny Lkhamatsyrenovich CHOYNZONOV^{1,2}, Lyudmila Viktorovna SPIRINA¹,
Irina Viktorovna KONDAKOVA¹, Svetlana Yurevna CHIZHEVSKAYA¹,
Dmitri Aleksandrovich SHISHKIN¹, Denis Evgenevich KULBAKIN¹

¹ Institute for Oncology of SB RAMS
634050, Tomsk, Kooperativny str., 5

² Siberian State Medical University of Minzdrav of Rissia
634050, Tomsk, Moskovski trakt, 2

The aim of the study was to investigate the prognostic value of chymotrypsine-like proteasome activity in head and neck carcinomas. Material: 66 patients with head and neck cancer (T₂₋₃N₀₋₂). Methods: Proteasome and calpain activity was determined using specific fluorogenic substrate. Salt fractionation with ammonium sulfate was performed for proteasome pool division. The univariate analysis of overall, recurrence-free and metastasis-free survival according to the Gehan-Wilcoxon and log-rank tests has been conducted. Results. The connection between the total proteasome activity rate, 26S proteasome activity and overall survival was revealed. It has been determined that the high total proteasome activity and 26S proteasome activity were the factors of 2-years good prognosis for the patients with epidermoid carcinoma of head and neck.

Key words: squamous cell carcinoma of head and neck, prognosis, proteasome activity.

Choyznzonov E.L. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, director,
e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Spirina L.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of laboratory of tumor biology,
e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

Kondakova I.V. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of tumor biochemistry,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Chizhevskaya S.Yu. – candidate of medical sciences, senior researcher of head and neck cancer department,
e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Shishkin D.A. – candidate of medical sciences, senior researcher of head and neck cancer department,
e-mail: nii@ibmail.com

Kulbakin D.Yu. – junior researcher of head and neck cancer department, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru