

Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов, О.С. Васильева

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРОТЕАЗ У БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМИ КАРЦИНОМАМИ ГОЛОВЫ И ШЕИ

ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск
Институт имени И. Стефана, Любляна, Словения

В представленном обзоре рассматриваются опухолеассоциированные протеазы в качестве факторов прогноза общей и безрецидивной выживаемости больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. Анализируется прогностическая значимость трех групп протеаз: системы активации плазминогена, матриксных металлопротеиназ и катепсинов. Особое внимание уделено матриксным металлопротеиназам как наиболее перспективным прогностическим факторам. Современные данные, полученные на экспериментальном и клиническом материале, свидетельствуют о широких перспективах использования опухолеассоциированных протеаз для прогноза выживаемости, метастазирования, а также ответа на химиотерапию у больных опухолями головы и шеи.

Ключевые слова: плоскоклеточные карциномы головы и шеи, система активации плазминогена, матриксные металлопротеиназы, катепсины

В настоящее время плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПКГШ) удерживают ведущие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности. Для успешного лечения злокачественных новообразований этой локализации необходим дифференцированный подход в определении лечебной тактики, а в каждом конкретном случае индивидуальная программа [1]. Выбор метода лечения обычно зависит от клинико-морфологических параметров опухоли: локализации и объема опухолевого очага, наличия метастазов в лимфатических узлах и степени гистологической дифференцировки ткани. Однако на ранних стадиях опухолевого процесса эти прогностические факторы часто не эффективны. Известно, что приблизительно 25% пациентов имеют скрытые метастазы в лимфатические узлы [29]. Особые проблемы возникают с лечением именно таких пациентов, у которых клинически не определяются метастазы: должны ли они получать весь объем лечения. Для решения подобных практических задач возникает потребность в дополнительных прогностических факторах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и давать объективный прогноз развития болезни.

В процессе канцерогенеза малигнизированная ткань начинает производить так называемые «маркеры опухолевой прогрессии» — продукты, не свойственные нормальным клеткам, но необходимые для реализации тех или иных свойств опухоли [38]. Согласно современным представлениям о механизмах метастазирования для инвазивного роста, интра- и экстравазации опухолевыми клетками необходимо преодолевать барьеры в виде базаль-

ных мембран, экстраклеточного матрикса и тканевых структур. Для этого (самостоятельно или с помощью стимуляции клеток окружающей стромы) малигнизированные клетки вырабатывают ряд протеолитических ферментов, каждый из которых в настоящее время претендует на роль фактора прогноза опухолевой прогрессии. Кроме того, учитывая ко-канцерогенный эффект ряда протеаз, их способность активировать факторы роста и поддерживать жизнеспособность опухолевых клеток, эти протеазы могут быть полезны для прогноза опухолевых рецидивов [38]. Представляется важным изучение и эндогенных ингибиторов протеаз, так как именно нарушение тонкого баланса протеаза/ингибитор приводит к активации протеолиза. Поэтому определение экспрессии протеаз и их ингибиторов, позволяющих получить представление о реальном состоянии опухолевой прогрессии и сделать достоверный прогноз возникновения метастазов и рецидивов, могло бы помочь с выбором тактики оперативного вмешательства у больных с опухолями головы и шеи.

Протеазы, которые чаще всего обнаруживаются в опухолях и играют наиболее важную роль в распространенности опухолевого процесса и метастазировании, можно разделить на три группы: система активации плазминогена, матриксные металлопротеиназы и катепсины.

Система активации плазминогена

В ткани опухоли происходит выработка компонентов системы активации плазминогена, которая состоит из плазмина, активатора плазминогена урокиназного типа (u-PA), рецептора u-PA (u-PAR) и ингибиторов u-PA (PAI-1, PAI-2). Актива-

тор плазминогена урокиназного типа вырабатывается как неактивный проэнзим, после связывания со своим специфическим мембранным рецептором он активируется и становится способным катализировать превращение плазминогена в плазмин. В свою очередь, плазмин может самостоятельно деградировать ряд компонентов экстраклеточного матрикса (ЭКМ), но главное, активирует проматаллопротеазы, которые способны к гидролизу всех компонентов ЭКМ. Таким способом начинается протеолитический каскад в опухолевой ткани, и поэтому u-PA считается ключевой молекулой, запускающей весь процесс протеолиза в опухоли [5, 15].

Надежды, связанные с большой информативной ценностью определения компонентов системы активации плазминогена в опухолях и крови онкологических больных, в значительной степени оправдались. В 1988 году Duffy M.J. et al. сообщили, что у больных раком молочной железы с высокой активностью u-PA в первичном очаге метастазы развиваются гораздо быстрее, чем у больных с низкой активностью фермента. Эти первоначальные результаты были многократно подтверждены. Для рака молочной железы в настоящее время u-PA является самым мощным фактором прогноза, независимым от таких традиционных прогностических факторов для этой болезни, как размер и гистологический тип опухоли, наличие лимфогенных метастазов. По статистической значимости u-PA превосходит другие биологические маркеры (рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, p53), является самым объективным прогностическим фактором выживаемости в группе больных без лимфогенных метастазов [15]. Высокие уровни u-PA также коррелировали с неблагоприятным прогнозом у пациентов с раком желудка, раком прямой кишки, раком мочевого пузыря, яичника, простаты [5, 15]. Вместе с тем недостаточно исследована прогностическая роль компонентов системы активации плазминогена в опухолях головы и шеи.

В 1995 году Bialkowska A. et al. измерили концентрации t-PA, u-PA и PAI-1 в крови 20 пациентов с раком гортани и обнаружили, что у 40% больных в крови была увеличена активность PAI-1 по сравнению с этим показателем крови у здоровых людей [7]. Повышенные концентрации PAI-1 были обнаружены и в тканях ПКГШ, а также в метастазах лимфатических узлов [73]. Yasuda T. et al. в 1997 году исследовали корреляцию между иммуногистологической экспрессией u-PA, t-PA, PAI-1 и клинической характеристикой ПКГШ и обнаружили значительную корреляцию между PAI-1 экспрессией и опухолевым размером [70].

В полости рта, исключая язык, уровни экспрессии мРНК PAI-1 и u-PA были выше в опухолях,

чем в нормальных тканях. В опухолях языка была обнаружена повышенная экспрессия мРНК этих показателей при наличии метастазов [46]. Данные по раку гортани достаточно противоречивы. Так, Leto G. et al. в 2001 году обнаружил значительное повышение уровня экспрессии u-PA в опухоли у пациентов с местно-распространенным раком гортани III/IV стадии по сравнению со смежной слизистой оболочкой. Хотя повышенные уровни экспрессии u-PA в опухолях не показали никакой корреляции с клинико-морфологическими параметрами, такой показатель, как отношение уровня экспрессии u-PA в опухолях к уровню экспрессии u-PA в нормальной ткани (Т/Н) был выше в более агрессивных опухолях (с метастазами в лимфатических узлах, в плохо и умеренно дифференцированных, в опухолях IV стадии, в опухолях подглоточной щели). Эти данные говорят о значительных изменениях регуляции u-PA в более агрессивных и распространенных формах рака. Однако исследователям не удалось выявить значимость определения u-PA для прогноза развития рака гортани III/IV стадии [37]. Кроме того, не было обнаружено статистически значимых различий этих показателей в опухолях гортани по сравнению с нормальными тканями [46].

Для эффективной инвазии u-PA должен быть связан с его клеточным поверхностным рецептором (u-PAR). Schmidt M. et al. в 2000 году показали увеличенную экспрессию урокиназного рецептора в плоскоклеточных опухолях головы и шеи по сравнению со смежной слизистой оболочкой [53]. Растворимая форма урокиназного рецептора (su-PAR) в высоких концентрациях была обнаружена в плазме пациентов с ПКГШ по сравнению с плазмой здоровых людей. После резекции рака у большинства пациентов наблюдалось уменьшение уровней su-PAR [51]. Однако ни уровни экспрессии u-PAR в первичных опухолях, ни уровни рецептора в плазме не показали никакой связи с клинико-морфологическими параметрами опухоли, поэтому исследователи пришли к выводу, что несмотря на усиление экспрессии урокиназного рецептора при опухолевом росте, это не является прогностическим маркером метастатического поведения первичных ПКГШ [51, 53].

Несмотря на большое количество исследований, демонстрирующих участие компонентов системы активации плазминогена в развитии ПКГШ, работ, изучающих прогностическое значение этих показателей в крови и ткани опухолей у этих пациентов, очень мало.

Strojan P. et al., проведя в 2001 году однофакторный анализ выживаемости, показал, что риск рецидива и онкологическая смертность были значительно выше у пациентов с высокими уровнями

Таблица 1

Связь металлопротеаз и их эндогенных ингибиторов с клинико-морфологическими параметрами роста плоскоклеточных карцином головы и шеи и прогнозом исхода заболевания

| Изучаемые показатели | Объект исследования | n | Метод исследования | Значимые показатели | Корреляция с клинико-морфологическими критериями | Прогностическая значимость | Ссылки |
|--|---------------------|------|-------------------------------|-----------------------|--|------------------------------|--------|
| ММР-1, -2, -3, -7, -9, -10, -11, -13, -14 и TIMP-1, -2 | ткань | 54 | ПЦР, Western blot, зимография | ↑ ММР-1, -9, и TIMP-1 | Т модель инфильтрации N | | 21 |
| | | | | ↑ ММР-9 | | | |
| | | | | ↑ ММР-9, -2, -7, -11 | | | |
| ММР-2, -3, -8, -9, -13 и TIMP-1 | сыворотка | 73 | | ↑ ММР-8 | T, N, и UICC-стадия | | 26 |
| ММР-2, -13, -14 | ткань | 35 | Western blot | ↑ ММР-13 | гистотип, уровень локальной инвазии | | 41 |
| ММР-2 | ткань | 21 | | ↑ ММР-2 | N | | 24 |
| ММР-2, -9 | ткань | 30 | зимография, ИГХ | ↑ ММР-2 | N | | 65 |
| ММР-2 | ткань | 46 | ИГХ | ↑ ММР-2 | N | | 27 |
| ММР-2, -9 | ткань, сыворотка | 73 | ИГХ, ELIAS | ↑ ММР-2 | N | | 25 |
| ММР-2 | ткань | 50 | ИГХ | ↑ ММР-2 | N, гистотип | | 49 |
| ММР-2, -9, TIMP-1 | ткань | 145 | ИГХ | ↑ ММР-2 | T | | 51 |
| ММР-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13, TIMP-1, -2 | ткань | н.у. | зимография | ↑ ММР-2, -14 | N | | 52 |
| ММР-2, -14, TIMP-2 | ткань | 51 | ИГХ | ↑ ММР-2, -14, TIMP-2 | N, M | | 56 |
| ММР-2, -9 | ткань | 23 | зимография | ↑ ММР-2 | N | | 58 |
| ММР-2, TIMP-2 | ткань | 40 | ИГХ | ↑ ММР-2 | N | ↓ Общая выживаемость | 77 |
| ММР-2, -9 | ткань | 57 | зимография | ↑ ММР-2, -9 | степень инвазии | | 64 |
| | | | | ↑ TIMP-1 | | | |
| ММР-2, -9 | ткань | 30 | зимография, ИГХ | ↑ ММР-2, -9 | N, сосудистая инвазия | | 65 |
| ММР-2, -9, TIMP-1, -2 | ткань | 106 | ИГХ | ↑ ММР-2 | | ↓ Общая выживаемость | 78 |
| | | | | ↑ TIMP-2 | | | |
| ММР-2, -9 | ткань | 44 | зимография | ↑ ММР-2, -9 | н.о. | ↓ Безрецидивная выживаемость | 40 |
| ММР-9 | сыворотка | 86 | | ↑ ММР-9 | T | | 20 |
| ММР-1, -2, -9 | ткань | 43 | ИГХ | ↑ ММР-9 | ангиогенез | | 29 |
| ММР-9 | ткань | 52 | ИГХ | ↑ ММР-9 | ангиогенез | ↓ Общая выживаемость | 31 |
| ММР-14 | ткань | 46 | ИГХ | ↑ ММР-14 | N, степень инвазии | | 66 |
| ММР-14 | ткань | | ИГХ | ↑ ММР-14 | N | | 19 |

и-РА в опухоли, чем у пациентов с низкими опухолевыми уровнями и-РА. Кроме того, высокие серологические уровни и-РА положительно коррелировали с частотой рецидива, но не со смертностью. Исследователи сделали вывод, что опухолевые и серологические уровни и-РА могут иметь потенциальную прогностическую значимость у пациентов с ПКГШ. Однако они считают, что необходимо исследовать более гомогенные и объемные группы пациентов [61].

Значение системы активации плазминогена для клинического прогноза, роста и метастазирования ПКГШ все еще спорно. Многие исследователи считают, что опухолевой прогрессии способствует не повышенная активность и-РА, а, скорее, дифференциальная экспрессия и-РА, и-РАР, РАИ-1, а также их молекулярные и функциональные взаимодействия с матриксными металлопротеазами, интегринами и факторами роста, которые приводят к временным и пространственным реорганизациям системы и избирательному разложению внеклеточных матриксных протеинов при инвазивном перемещении опухолевых клеток [5]. Поэтому вопрос исследования компонентов системы активации плазминогена как прогностических маркеров роста ПКГШ остается в настоящее время открытым.

Металлопротеиназы

Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют основную роль в гидролизе экстраклеточного матрикса благодаря своей способности разлагать практически все его компоненты: коллагены всех типов, эластин, протеогликаны, ламинин и т.д. Кроме того, исследования последних лет позволили открыть новые функции ММП в опухолевой прогрессии: участие в выходе депонированных факторов роста, расщепление некоторых биоактивных молекул с образованием веществ с новыми биологическими свойствами, участие в канцерогенезе ряда опухолей, мощный ангиогенный эффект, участие в поддержании жизнеспособности опухолевых клеток [2, 4, 10, 12, 16, 20, 32, 58]. Все перечисленные свойства ММП делают их ключевыми маркерами опухолевой прогрессии (Таблица 1).

Матриксные металлопротеиназы условно делятся на несколько групп согласно своему строению и субстратной специфичности [2]. В данном обзоре будут рассмотрены основные группы ММП, широко исследуемые при опухолевом росте.

Коллагеназы. Группа коллагеназ состоит из ММП-1 (коллагеназа-1), ММП-8 (коллагеназа-2), ММП-13 (коллагеназа-3), ферменты этой группы способны к гидролизу всех фибриллярных коллагенов [68].

Повышенную экспрессию ММП-1 наблюдали как в экспериментальных клеточных линиях

ПКГШ [74], так и у больных с опухолями данной локализации [18, 39, 69]. Однако, несмотря на то, что была обнаружена значительная корреляция опухолевых уровней ММП-1 с Т-стадией [44], работ по исследованию прогностической значимости ММП-1 мы не обнаружили.

ММП-8 считается одной из наиболее активных коллагеназ, способных инициировать разложение коллагена I типа. Ткань ПКГШ экспрессирует ММП-8 при росте *in vivo* и *in vitro* [56], причем в гистологических образцах ММП-8 в основном распределена по поверхности инвазивного рака [40]. Значительная корреляция была обнаружена между серологической концентрацией ММП-8 и Т- и N-стадиями ПКГШ, поэтому ряд исследователей считают сывороточный уровень ММП-8 потенциальным опухолевым маркером [33].

Экспрессия ММП-13 была обнаружена как в высокоинвазивных клеточных линиях ПКГШ, так и в ткани опухолей [25]. В большинстве карцином ММП-13 была обнаружена в инвазивном фронте в опухолевых и стромальных клетках, причем в здоровой слизистой оболочке экспрессия ММП-13 не была обнаружена [25]. Уровень экспрессии ММП-13 в ткани рака гортани значительно коррелировал с более дифференцированными опухолями и с распространенной локальной инвазией [11]. Экспрессия ММП-13 клетками ПКГШ *in vitro* и *in vivo* указывает на существенную роль ММП-13 в их высокой инвазивной способности [17, 25, 68].

Высокий уровень экспрессии коллагеназ в ПКГШ, его корреляция с клинико-морфологическими параметрами опухоли позволяет считать эти ферменты потенциальными маркерами опухолевой прогрессии, однако исследований по выявлению прогностической значимости этих протеаз в настоящее время недостаточно.

Желатиназы. Желатиназы гидролизуют нефибриллярный коллаген IV типа, образующий базальные мембраны; считается, что именно эти протеазы инициируют инвазивные процессы [2]. Группа желатиназ состоит из ММП-2 (желатиназа А) и ММП-9 (желатиназа В) [68].

Повышенную экспрессию ММП-2 в ткани ПКГШ по сравнению со здоровой слизистой наблюдали многие исследователи [6, 9, 13, 28, 44, 65, 68, 69]. Эти результаты позволяют считать продукцию этого фермента опухолью индикатором степени злокачественного развития ПКГШ.

В гистологических препаратах этих опухолей ММП-2 обнаруживали, в основном, в инвазивном фронте рака [35, 45]. Другие исследователи утверждают, что наиболее выраженную экспрессию ММП-2 наблюдали в клетках стромы около продвигающихся краев опухоли [13]. Основными

продуцентами ММП-2 при опухолевом росте могут быть опухолевые клетки [66] или фибробласты окружающей ткани [24, 64], однако их роль в этом процессе точно не определена.

Интересное исследование было проведено в 2000 году Tokumaru Y. et al. Клеточная линия НЕР-2 (производная от человеческой ПКГШ) не секретирует ни профермент, ни активную форму ММП-2 *in vitro*, однако совместная инкубация НЕР-2 клеток с человеческими фибробластами привела к продукции не только про-ММП-2, но также и активной ММП-2. Причем в НЕР-2 клетках была обнаружена и более сильная, чем в фибробластах, экспрессия матриксной металлопротеиназы мембранного типа 1 (MT1-ММП, ММП-14), которая является специфичным активатором ММП-2. Исследователи сделали вывод, что про-ММП-2 продуцируется стромальными фибробластами, окружающими опухоль, и активизируется MT1-ММП раковых клеток. Эти результаты предлагают MT1-ММП-зависимую активацию про-ММП-2 как важный этап в процессе метастазирования опухолевых клеток ПКГШ [56, 65]. Таким образом, перичеселлюлярная MT1-ММП-зависимая активация ММП-2 была неизменно связана с инвазивным потенциалом раковой клетки и часто прогнозировала снижение сроков жизни больных опухолями головы и шеи [22].

В 1996 году Kawata R. et al. обнаружили, что содержание ММП-2 в опухолевой ткани у пациентов с метастазами в лимфатических узлах было выше, чем у пациентов без метастазов. Эти результаты подтвердили важную роль ММП-2 в опухолевой инвазии и метастазировании, так что ММП-2 стали рассматривать как потенциальный биохимический маркер метастазирования и прогноза развития опухолей головы и шеи [27]. В последующем и другие исследователи выявили корреляцию различной степени между уровнем экспрессии ММП-2 и лимфогенными метастазами [9, 14, 28, 30, 31, 35, 44, 56, 65, 69, 72] (Таблица 1). Ряд исследователей демонстрировали корреляцию между лимфатической или сосудистой инвазией и активацией ММП-2 при раке глотки [30], ММП-2 может также играть важную роль в лимфатическом распространении некоторых опухолей гортани [9]. Высоко инвазивные случаи ПКГШ показали увеличенные уровни ММП-2 [23, 69]. Экспрессия ММП-2 была в значительной степени связана и с отдаленными метастатическими поражениями [72]. Однако в некоторых работах указано на отсутствие какой-либо корреляции между экспрессией ММП-2 и клинико-морфологическими параметрами [21, 31, 35], а исследование серологических уровней ММП-2 не выявило различий этого показателя у больных с ПКГШ и

здоровых людей [50]. Возможно, эти противоречия связаны с использованием различных методов исследований ММП и разной трактовкой результатов, связанной с недостаточно объемными выборками материала у разных исследователей.

Следует отметить, что к настоящему времени уже накопилось некоторое количество работ по оценке прогностической значимости определения ММП-2 у больных с ПКГШ, позволяющих считать ММП-2 маркером плохого прогноза [72]. Общая выживаемость пациентов с раком гортани с высоким опухолевым уровнем экспрессии ММП-2 было значительно короче, чем у пациентов с низким уровнем экспрессии ММП-2 в опухоли. Эти результаты говорят о том, что опухолевый уровень экспрессии ММП-2 может иметь прогностическую значимость при раке гортани [14]. Характеристики инвазивного фронта отражают прогноз развития опухоли лучше, чем другие части опухоли. В случае ММП-2-позитивного инвазивного фронта наблюдалось сокращение времени общей выживаемости. Многомерный статистический анализ показал корреляцию экспрессии ММП-2 со временем общей выживаемости в дополнение к узловому статусу и стадии опухолевого роста. Ondruschka C. et al. заключают, что экспрессия ММП-2 в инвазивном фронте является маркером низкой выживаемости и, вероятно, связана с ранними рецидивами у пациентов без метастазов в лимфатических узлах [45]. Пациенты с ПКГШ с высокой активностью ММП-2 имели более короткое время безрецидивной выживаемости после лечения, чем пациенты с опухолями, показывающими низкую активность ММП-2. Эти результаты демонстрируют полезность измерения содержания ММП-2 в опухолевых образцах для предсказания времени безрецидивной выживаемости у больных ПКГШ [71].

Была отмечена также связь между клиническим ответом на неоадьювантную химиотерапию у больных с ПКГШ и низкой активностью ММП-2. Таким образом, ММП-2 может стать полезным и объективным инструментом для оценки ответа на химиотерапию и агрессивности карцином полости рта [6].

Уровни ММП-9 у больных с ПКГШ были значительно выше в опухолях, чем в образцах нормальной слизистой оболочки [9, 30, 39, 52, 68, 69], кроме того, серологическая концентрация ММП-9 была значительно выше у этих пациентов, чем у здоровых людей [47, 50]. Учитывая то, что инвазивные свойства клеточных линий, производных от человеческих ПКГШ, могут быть существенно снижены с помощью антител против ММП-9 [43], важная роль ММП-9 в инвазии опухолей головы и шеи не оставляет сомнений.

У больных с ПКГШ были выявлены значительные корреляции между уровнями ММП-9 и рядом клинико-морфологических параметров опухоли: Т-стадий [44, 50]; моделью инфильтративного роста опухолей [44]; с наличием метастазов в лимфатических узлах [44]. Кроме того, высоко инвазивные случаи показали увеличенную экспрессию ММП-9 в гистологических препаратах [23], также была обнаружена корреляция между сосудистой инвазией и активацией ММП-9 [30]. Однако встречается несколько работ, в которых авторы не нашли связи активности ММП-9 с клинико-морфологическими параметрами опухолей [28, 47, 52].

Таким образом, несмотря на противоречивые данные, можно заключить, что ММП-9 играет важную роль в опухолевой инвазии и метастазировании. Кроме того, исследования последних лет обнаружили важную роль ММП-9 в процессах опухолевого ангиогенеза. Так, ПКГШ с повышенной экспрессией ММП-9 характеризовались более высокой плотностью микрососудов [18, 49]. Была также выявлена значительная связь между уровнем экспрессии ММП-9 и уровнем экспрессии сосудистого фактора роста VEGF [49], рецептора эпидермального фактора роста EGFR [43] и экспрессией гена рецепторов факторов роста HER2/neu [69], что согласуется с теорией о функции ММП-9 как регулятора опухолевого ангиогенеза, поддерживающего эндотелиальную клеточную инвазию ПКГШ.

У пациентов с ПКГШ с высокой активностью ММП-9 наблюдалось сокращение времени безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентами с низкой активностью ММП-9 в опухолях [71]. Эти результаты говорят о том, что измерение активности ММП-9 в опухолевых образцах может быть полезно для прогноза сроков безрецидивной выживаемости пациентов с этими опухолями. Отмечена также связь между клиническим ответом на адъювантную химиотерапию и низкой активностью ММП-9 [6].

Сравнивая прогностическую значимость определения ММП-2 и ММП-9 у больных, большинство исследователей, изучающих роль желатиназ в развитии ПКГШ, считают, что ММП-9 может играть более важную роль, чем ММП-2, в качестве полезного маркера для динамического клинического наблюдения пациентов с данной локализацией опухолевого процесса [21, 50]. Обращает на себя внимание и возможность применять определение желатиназ для контроля ответа на химиотерапию.

Стромелизины. Группа стромелизинов состоит из ММП-3 (стромелизин-1), ММП-10 (стромелизин-2) и ММП-11 (стромелизин-3) [68]. Уров-

ни экспрессии ММП-3, ММП-10, ММП-11 были значительно выше в ПКГШ по сравнению с образцами нормальной слизистой оболочки [8, 44]. Экспрессия ММП-3 коррелировала со стадией опухолевого роста, инвазивностью [41] и с наличием метастазов в региональных лимфатических узлах [34]. Уровни экспрессии ММП-11 слабо коррелировали с присутствием метастазов в лимфатических узлах [44].

Прогностическая значимость стромелизинов в развитии ПКГШ в настоящее время не известна и требует, учитывая их потенциальную связь с развитием инвазии и метастазов, подробного изучения.

Матрилизин. Матрилизин (ММП-7) — самая короткая металлопротеиназа, уровни ее экспрессии были значительно выше в ПКГШ по сравнению с образцами нормальной слизистой оболочки [8, 44]. Продукция ММП-7 связана с метастатическим потенциалом ПКГШ, однако требуется дальнейшая работа, чтобы установить точную роль ММП-7 в развитии опухолей этой локализации [68].

Мембранный тип ММП. Мембранные ММП локализованы на поверхности опухолевых клеток и отличаются от других ММП тем, что имеют трансмембранный домен. В настоящее время известно 4 представителя этой группы, но наиболее изучен один — ММП-14 (MT1-ММП) [68]. MT1-ММП была преимущественно обнаружена в опухолевых тканях ПКГШ, в то время как образцы нормальных тканей ее практически не содержали [24, 56]. Хотя другие представители группы мембранных металлопротеаз определялись, приблизительно, в 30% случаев ПКГШ, их уровни экспрессии были значительно ниже по сравнению с таковым MT1-ММП [56]. MT1-ММП определяется в основном в малигнизированных клетках инвазивного края ПКГШ [54], ряд исследователей находили MT1-ММП и в клетках рака, и смежных клетках стромы [24, 56]. MT1-ММП может локально гидролизовать компоненты тканевых барьеров. Одним из главных субстратов является коллаген I типа — основной компонент экстраклеточного матрикса. Хотя MT1-ММП не может разлагать коллаген IV типа в базальной мембране, она связывает и активизирует про-ММП-2, одну из коллагеназ IV типа [24, 54, 65, 72]. Однако разложение экстраклеточного матрикса — это не единственная функция MT1-ММП. Этот фермент также регулирует взаимодействие клеток с ЭКМ, расщепляя клеточные адгезивные молекулы, что, в конечном счете, способствует клеточному перемещению [54].

Koyama H. et al. (2000) показали, что экспрессия MT1-ММП была достоверно выше у пациентов с

ПКГШ с локальной инвазией и метастазами в лимфатические узлы, кроме того, уровень экспрессии МТ1-ММП значительно коррелировал со степенью инвазии [42]. Значимую связь уровня экспрессии МТ1-ММП с наличием метастазов в лимфатических узлах наблюдали и другие исследователи [24, 56]. Кроме того, экспрессия МТ1-ММП коррелировала не только с локальными, но и отдаленными метастатическими поражениями и плохим прогнозом у пациентов с опухолями языка [72].

Эти наблюдения позволяют считать МТ1-ММП одним из определяющих факторов метастазирования ПКГШ в лимфатические узлы. Сочетанная экспрессия МТ1-ММП и ММП-2 позволяет оценить прогрессию этих опухолей, следовательно, МТ1-ММП, объединенный с другими маркерами, может использоваться, чтобы прогнозировать метастатический потенциал опухолей головы и шеи [42, 56].

Эндогенные ингибиторы ММП. Рассматривая роль металлопротеаз в опухолевой прогрессии нельзя не уделить внимание их эндогенным ингибиторам, которые также принимают участие в развитии ПКГШ. На сегодняшний день известны 4 представителя семейства тканевых ингибиторов металлопротеаз: TIMP-1, -2, -3, и -4 [68]. Наиболее изучены TIMP-1 и TIMP-2.

TIMP-1 был идентифицирован во всех изучаемых опухолевых и смежных тканях ПКГШ [8, 13, 39]. Уровни TIMP-1 были значительно выше в опухолях по сравнению с образцами нормальной слизистой оболочки [44]. Экспрессия TIMP-1 была выше в гортанном раке, чем в фарингеальном [69]. Уровни TIMP-1 в гистологических опухолевых препаратах были выше в неметастатических опухолях, чем в метастатических. Случаи с высокими уровнями металлопротеаз и низким уровнем TIMP-1 имели высокий метастатический потенциал. Учитывая эти наблюдения, авторы работы рекомендуют измерение активности металлопротеаз вместе с TIMP-1 в гистологических препаратах биопсии, что может быть полезно в предсказании поведения и прогноза ПКГШ [23].

TIMP-2 были идентифицированы во всех изучаемых опухолях ПКГШ и смежных с ними тканях [8]. Другие исследователи находили TIMP-2 только в клетках рака [56]. Экспрессия TIMP-2 коррелировала с местной инвазией ПКГШ [45]. Тканевый ингибитор TIMP-2 был идентифицирован как ингибитор ММП-2 и МТ1-ММП. Однако в дальнейшем было обнаружено, что TIMP-2 необходим для клеточной активации ММП-2, и, таким образом, вклад TIMP-2 в опухолевую инвазию остался спорным. Показано, что экспрессия ММП-2, МТ1-ММП и TIMP-2 была значительно связана с регионарными и отдаленными метастаза-

ми и плохим прогнозом у пациентов с опухолями языка. Исследователи считают, что увеличенная экспрессия TIMP-2, так же, как ММП-2 и МТ1-ММП, является важным прогностическим фактором у пациентов с плоскоклеточными карциномами языка [72]. Однако в других работах не обнаружено статистически значимого различия в экспрессии TIMP-2 между группами пациентов с ПКГШ с метастазами и без метастазов. Анализ выживаемости также не показал значительного различия между временем жизни этих пациентов в группах с высоким и низким уровнями экспрессии TIMP-2 [14]. Учитывая, что работ по изучению роли TIMP-2 в развитии ПКГШ мало, и они носят противоречивый характер, прогностическая значимость определения этого ингибитора требует дальнейшего изучения.

Подводя итог обсуждению роли металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в прогнозе развития ПКГШ, хочется заметить, что в работах были использованы разные методы исследований: иммуногистохимия, субстратная зимография, ELISA-анализ, Вестерн-блоттинг, RT-PCR, что не могло не отразиться на разнице в полученных результатах, так как трудно сравнить данные и делать объективные выводы на материале, полученном различными методами. Кроме того, выборки больных с опухолями данной локализации обычно небольшие и не всегда достаточны для полноценного математического анализа.

Катепсины

Биологическая активность опухолевых клеток связана с продукцией некоторых катепсинов. Катепсины представляют собой лизосомальные протеазы, которые при опухолевой трансформации клеток обнаруживаются в секретированной и поверхностно-ассоциированной форме и включаются в протеолитический каскад. Кроме того, катепсины способны к непосредственному гидролизу многих компонентов межклеточного матрикса и других субстратов [33].

Катепсины В, Н, L, и D были обнаружены в каждом случае ПКГШ, и их уровни в опухолевой ткани значительно превосходили уровни катепсинов в здоровых тканях [26, 57, 62, 67]. Катепсин D является ферментом, который может активировать процессы пролиферации и инвазии опухолевых клеток. В раке гортани катепсин D был определен в 30-50% опухолевых клеток, минимальное количество катепсина D было обнаружено в слюнных железах и протоках, большое количество было в макрофагах, расположенных вокруг и среди опухолевых клеток [26, 36, 48, 55]. Повышенная концентрация катепсина D была измерена в опухоли [59, 73] и в нормальной ткани гортани по сравнению с тканью полости рта или глотки [59]. Кроме

того, более высокие концентрации катепсина D были обнаружены в метастазах лимфатических узлов по сравнению с соответствующей нормальной тканью [73].

Высокая концентрация катепсина D в ПКГШ коррелировала со многими клинико-морфологическими параметрами опухоли: гистологическим типом опухоли (повышенная экспрессия катепсина D наблюдалась в плохо дифференцированных опухолях) [59, 67]; с T- [26, 57] и N-статусами; моделью и/или стадией инвазии [26]. Серологическая концентрация катепсина D была выше в крови у больных до или после лечения по сравнению со здоровыми донорами и зависела от стадии опухолевого процесса. Имелась тенденция к снижению концентрации катепсина D у пациентов с ПКГШ после лечения с увеличением времени безрецидивного выживания [59].

Прогноз развития ПКГШ связан с присутствием метастазов в шейных лимфатических узлах. Опухоли с высоким уровнем экспрессии катепсина D были связаны с наличием метастазов в лимфатических узлах [19, 67]. При сравнении прогностической значимости содержания катепсина D с такими клинико-морфологическими параметрами, как стадия опухолевого процесса и гистологический тип опухоли, оказалось, что этот показатель почти вдвое более информативен для прогноза метастазов в лимфатических узлах. Таким образом, катепсин D является потенциальным независимым показателем лимфогенного метастазирования ПКГШ и заслуживает тщательного изучения [19].

Изучение прогностической значимости определения катепсина D выявило его важность для определения сроков безрецидивной выживаемости. Так, у пациентов с метастазами в лимфатических узлах и катепсин-D-позитивными опухолями (выявляемыми иммуногистохимическим окрашиванием) был выше риск возникновения рецидивов [36]. Другие исследователи показали, что во всех группах пациентов с карциномами гортани с иммуногистохимическим определением катепсина D выше среднего показателя наблюдалось значительно более короткое время жизни, причем такой критерий, как иммуногистохимическое определение катепсина D, оказался независимым прогностическим параметром в карциномах гортани в пределах 5-летнего периода со времени операции [55]. Однако встречаются единичные работы, авторы которых отрицают какую-либо связь концентраций катепсина D со сроком жизни [57]. Определяя прогностическую значимость катепсина D для разных подгрупп пациентов с ПКГШ, ряд авторов делают вывод об отсутствии необходимости определения катепсина D для прогноза у

пациентов с местнораспространенным раком гортани с III/IV стадией [37].

Концентрации катепсина B также оказались значительно выше в ПКГШ по сравнению с нормальными тканями [62]. Повышенный уровень катепсина B в ПКГШ был связан с запущенной стадией опухоли, низкой гистологической дифференцировкой опухоли [67] и моделью и/или стадией инвазии [26]. Однако изучение прогностической значимости определения катепсина B у больных с ПКГШ не выявило корреляции концентрации катепсина с общей и безрецидивной выживаемостью [57, 62], поэтому вопрос о значимости определения катепсина B для прогнозов у данных пациентов остается открытым.

Активность лизосомального катепсина H обнаружена в плазме и сыворотке крови больных с ПКГШ до и после комбинированного лечения и не выявлена в плазме здоровых людей [3, 60]. Сывороточные концентрации катепсина H были связаны обратно пропорционально с гистологическим типом опухоли. Имелась тенденция к лучшему прогнозу в анализе безрецидивного и общего выживания у больных с увеличенной концентрацией катепсина H в сыворотке до операции [60]. Сывороточные концентрации катепсина H снижались после операции, причем у больных с отсутствием признаков метастазирования, удаление основного очага опухоли сопровождалось достоверным снижением активности катепсина H в плазме [3]. Эти результаты обеспечивают косвенное доказательство специфичной роли катепсина H в процессах инвазии и метастазировании ПКГШ. Кроме того, его сывороточные концентрации могли бы также иметь прогностическое значение для этих больных.

Роль катепсина L в прогрессии ПКГШ изучена в меньшей степени и представлена единичными работами. Более высокие уровни катепсина L были найдены в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Опухолевый уровень катепсина L коррелировал со стадией опухолевого процесса и наличием метастазов в лимфоузлах [62].

В ряде исследований выявляется роль эндогенных ингибиторов катепсинов стефинов A и B в прогрессии ПКГШ. Концентрация стефина A [62, 63] и B [57] была значительно выше в опухоли по сравнению с нормальной слизистой оболочкой. Высокие концентрации стефинов A и B коррелировали с более запущенной стадией [57, 62] и наличием метастазов в лимфоузлах. Риск рецидива и онкологическая смертность были значительно выше у пациентов с низкими концентрациями этих ингибиторов в опухоли по сравнению с группой пациентов с высоким уровнем стефинов в опухоли. В одномерном анализе выживания стандартизированные значения стефинов коррелиро-

вали обратно пропорционально с интенсивностью рецидива и смертностью [57]. Многомерный регрессионный анализ показал, что уровень стефина А явился самым сильным независимым прогностическим фактором для определения времени безрецидивной и общей выживаемости. Кроме того, стефин А явился надежным прогностификатором риска рецидива и смертности [62]. Дальнейшие исследования выявили полезность этих маркеров для решения о выборе объема лечения в подгруппах больных с ПКГШ с клинически определяемыми метастазами в лимфоузлах и без метастазов: была обнаружена значительная разность внутриопухолевых концентраций стефинов между этими группами пациентов. Благодаря способности дифференцировать N0 и N+ стадии болезни стефина А и В могут быть полезными маркерами при решении вопроса о размере хирургического вмешательства [63]. При одномерном анализе выживаемости высокие уровни стефинов являются прогностически значимыми. В мультивариантном анализе доказано независимое прогностическое значение уровней стефина А для прогноза выживаемости у пациентов с данной локализацией опухолевого процесса [62, 63].

Таким образом, определение опухолеассоциированных протеаз может иметь большое прогностическое значение у больных ПКГШ. В настоящее время доказана уместность определения этих протеаз в следующих случаях:

1. Для прогноза общей выживаемости у больных ПКГШ существенную помощь может оказать определение опухолевых уровней экспрессии ММП-2, u-PA, катепсинов D и H, стефинов А и В, причем такие маркеры, как катепсин D и стефин А, оказались независимыми критериями прогноза пятилетней выживаемости.

2. Прогноз безрецидивной выживаемости можно осуществить по оценке уровней сывороточных и опухолевых концентраций u-PA, опухолевых концентраций ММП-9, катепсина H, стефинов А и В. Низкие уровни продукции стефина А в опухоли — независимый критерий прогноза повышения срока безрецидивной выживаемости. Прогноз рецидивов возможно оценить, исследуя уровень опухолевой экспрессии ММП-2.

3. Прогноз метастазирования опухолей головы и шеи позволяет оценить независимый показатель — уровень экспрессии катепсина D.

4. В подгруппе пациентов с клинически неопределяемыми метастазами риск раннего рецидива помогает обнаружить внутриопухолевое содержание ММП-2 и катепсина D, а риск развития метастазов наиболее велик при высоких уровнях стефинов А и В.

5. Обнаружена важность определения уровней

ММП-2 и ММП-9 для прогноза ответа на химиотерапию у больных ПКГШ.

Prognostic significance of proteases in head and neck squamous cell carcinoma patients

E.V. Klisho, I.V. Kondakova, E.L. Choinzonov, O.S. Vasiljeva

Tumor-associated proteases as a prognostic factor of overall and recurrence-free survivals in head and neck squamous cell carcinoma patients have been reviewed. Prognostic significance of 3 groups of proteases: plasminogen activation systems, matrix metalloproteinases and cathepsins was analyzed. A special attention was paid to matrix metalloproteinases as the most perspective prognostic factors. The current data obtained from experimental and clinical studies show new prospects for using the tumor-associated proteases in the prognosis of survival, lymph node metastasis and response to neo-adjuvant chemotherapy.

Литература

1. Кицманюк З.Д., Чойнзонов Е.Л., Мусабаева Л.И., Новиков В.А. // Сибирский онкологический журнал. — 2003. — № 2. — С. 3-11.
2. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. // Сибирский онкологический журнал. — 2003. — № 2. — С. 62-71.
3. Попова А.Н., Жлоба А.А., Соловьев М.М. // Вопросы онкологии. — 2001. — Т. 47. — № 5. — С. 590-594.
4. Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Дилакян Э.А. и др. // Вопросы медицинской химии. — 2001. — Т. 47. — № 1. — С. 72-79.
5. Andreassen P.A., Kjoller L., Christensen L., Duffy M.J. // Int. J. Cancer. — 1997. — Vol. 72 (1). — P. 1-22.
6. Arenas-Huertero F.J., Herrera-Goepfert R., Delgado-Chavez R. et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. — 1999. — Vol. 18 (3). — P. 279-284.
7. Bialkowska A., Kotschy M., Betlejewski S., Burduk D. // Otolaryngol. Pol. — 1995. — Vol. 49 (20). — P. 84-87.
8. Birkedal-Hansen B., Pavelic Z.P., Gluckman J.L. et al. // Oral. Dis. — 2000. — Vol. 6 (6). — P. 376-382.
9. Bogusiewicz M., Stryjecka-Zimmer M., Szymanski M. et al. // Otolaryngol. Head. Neck. Surg. — 2003. — Vol. 128 (1). — P. 132-136.
10. Brysk M.M., Lei G., Adler-Storthz K et al. // Laryngoscope. — 1998. — Vol. 108 (8) — Pt 1. — P. 1234-1237.
11. Cazorla M., Hernandez L., Nadal A. et al. // J. Pathol. — 1998. — Vol. 186 (2). — P. 144-150.
12. Chang C., Werb Z. et al. // Trends Cell Biol. — 2001. — Vol. 11 (11). — P. 37-43.
13. Charous S.J., Stricklin G.P., Nanney L.B. et al. // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. — 1997. — Vol. 106 (4). — P. 271-278.
14. Danilewicz M., Sikorska B., Wagrowska-Danilewicz M. // Med. Sci. Monit. — 2003. — Vol. 9 (3). — P. 42-47.
15. Duffy M.J. // Biochem. Soc. Trans. — 2001. — Vol. 30. — P. 207-210.
16. Egeblad M., Werb Z. // Nat. Rev. Cancer. — 2002. — Vol. 2 (3). — P. 161-174.
17. Falkenberg S., Rathcke I., Lippert B.M. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 1999. — Vol. 10. — P. 125-122.

18. Franchi A., Santucci M., Masini E. et al. // Cancer. — 2002. — Vol. 1. — № 95 (9). — P. 1902-1910.
19. Gandour-Edwards R., Trock B., Donald P.J. // Head. Neck. — 1999. — Vol. 21 (8). — P. 718-722.
20. Heissig B., Hattori K., Friedrich M. // Curr. Opin. Hematol. — 2003. — Vol. 10 (2). — P. 136-141.
21. Hong S.D., Hong S.P., Lee J.I., Lim C.Y. // Oral. Oncol. — 2000. — Vol. 36 (2). — P. 207-213.
22. Hornebeck W., Emonard H., Monboisse J.C., Bellon G. // Semin. Cancer. Biol. — 2002. — Vol. 12 (3). — P. 231-241.
23. Ikebe T., Shinohara M., Takeuchi H. et al. // Clin. Exp. Metastasis. — 1999. — Vol. 17 (4). — P. 315-323.
24. Imanishi Y., Fujii M., Tokumaru Y. et al. // Hum. Pathol. — 2000. — Vol. 31 (8). — P. 895-904.
25. Johansson N., Airola K., Grenman R. et al. // Am. J. Pathol. — 1997. — Vol. 151 (2). — P. 499-508.
26. Kawasaki G., Kato Y., Mizuno A. // Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod. — 2002. Vol. 93 (4). — P. 446-454.
27. Kawata R., Shinomiya T., Yasuda N. et al. // Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. — 1996. — Vol. 99 (2). — P. 299-305.
28. Kawata R., Shimada T., Maruyama S. // Acta. Otolaryngol. — 2002. — Vol. 122 (1). — P. 101-106.
29. Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. // Cancer. Chemother. Pharmacol. — 1999. — Vol. 43. — P. 42-51.
30. Koyama H., Iwata H., Kuwabara Y. et al. // Eur. J. Cancer. — 2000. — Vol. 36 (16). — P. 2164-2170.
31. Krecicki T., Zalesska-Krecicka M., Jelen M. // Clin. Otolaryngol. — 2001. — Vol. 26 (6). — P. 469-472.
32. Krepela E. // Neoplasma. — 2001. — Vol. 48. — P. 332-349.
33. Kuropkat C., Plehn S., Herz U. // Anticancer. Res. — 2002. — Vol. 22 (4). — P. 2221-2227.
34. Kusakawa J., Harada H., Shima I. et al. // Eur. J. Cancer. B Oral. Oncol. — 1996. — Vol. 32. — P. 217-221.
35. Kusakawa J., Sasaguri Y., Shima I. et al. // Am. J. Clin. Pathol. — 1993. — Vol. 99 (1). — P. 18-23.
36. Lazaris A.C., Lendari I., Kavantzis N. et al. // Pathol. Int. — 2000. — Vol. 50 (9). — P. 717-724.
37. Leto G., Tumminello F.M., Gebbia N. // Int. J. Biol. Markers. — 2001. — Vol. 16 (4). — P. 245-249.
38. Lynch C.C., Matrisian L.M. // Differentiation. — 2002. — Vol. 70. — P. 561-573.
39. Magary S.P., Ryan M.W., Tarnuzzer R.W., Kornberg L. // Otolaryngol. Head. Neck. Surg. — 2000. — Vol. 122 (5). — P. 712-716.
40. Moilanen M., Pirila E., Grenman R. et al. // J. Pathol. — 2002. — Vol. 197 (1). — P. 72-81.
41. Muller D., Wolf C., Abecassis J. // Cancer. Res. — 1993. — Vol. 53. — P. 165-169.
42. Myoung H., Kim M.J., Hong S.D. et al. // Cancer Lett. — 2002. — Vol. 28. — № 185 (2). — P. 201-209.
43. O-Charoenrat P., Rhys-Evans P., Modjtahedi H. et al. // Int. J. Cancer. — 2000. — Vol. 86 (3). — P. 307-317.
44. O-Charoenrat P., Rhys-Evans P.H., Eccles S.A. // Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. — 2001. — Vol. 127 (7). — P. 813-820.
45. Ondruschka C., Buhtz P., Motsch C. et al. // Pathol. Res. Pract. — 2002. — Vol. 198 (8). — P. 509-515.
46. Pasini F.S., Brentani M.M., Kowalski L.P., Federico M.H. // Head. Neck. — 2001. — Vol. 23 (9). — P. 725-732.
47. Ranuncolo S.M., Matos E., Loria D. // Cancer. — 2002. — Vol. 94 (5). — P. 1483-1491.
48. Resta L., Fiorella R., Di Nicola V. // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. — 1995. — Vol. 71 (9-10). — P. 257-261.
49. Riedel F., Gotte K., Schwalb J. // Int. J. Oncol. — 2000. — Vol. 17 (6). — P. 1099-1105.
50. Riedel F., Gotte K., Schwalb J. // Anticancer Res. — 2000. — Vol. 20 (5A). — P. 3045-3049.
51. Schmidt M., Hoppe F. // Acta. Otolaryngol. — 1999. — Vol. 119 (8). — P. 949-953.
52. Schmidt M., Polednik C., Hoppe F. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 1999. Vol. 256(7). P. 346-50.
53. Schmidt M., Schler G., Gruensfelder P. // Head. Neck. — 2000. — Vol. 22 (5). — P. 498-504.
54. Seiki M. // Cancer Lett. — 2003. — Vol. 8. — № 194 (1). — P. 1-11.
55. Seiwert S., Stambuk N., Konjevoda P. et al. // J. Chem. Inf. Comput. Sci. — 2000. — Vol. 40 (3). — P. 545-549.
56. Shimada T., Nakamura H., Yamashita K. et al. // Clin. Exp. Metastasis. — 2000. — Vol. 18 (2). — P. 179-188.
57. Smid L., Strojjan P., Budihna M. et al. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. — 1997. — Vol. 254 (Suppl 1). — P. 150-153.
58. Sternlicht M.D., Werb Z. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. — 2001. — Vol. 17. — P. 463-516.
59. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. // Cancer Lett. — 1998. — Vol. 14. — № 130 (1-2). — P. 49-56.
60. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. // Radial. Oncol. — 1999. — Vol. 33 (2). — P. 143-151.
61. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. // Anticancer Res. — 2000. — Vol. 20 (5C). — P. 3975-3981.
62. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. // Clinical Cancer Research. — 2000. — Vol. 6. — P. 1052-1062.
63. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. // Radial. Oncol. — 2002. — Vol. 36 (2). — P. 145-1451.
64. Sutinen M., Kainulainen T., Hurskainen T. // Br. J. Cancer. — 1998. — Vol. 77. — P. 2239-2245.
65. Tokumaru Y., Fujii M., Otani Y. et al. // Cancer Lett. — 2000. — Vol. 13. — № 150 (1). — P. 15-21.
66. Tsai C.H., Hsieh Y.S., Yang S.F. et al. // Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod. — 2003. — Vol. 95 (6). — P. 710-716.
67. Vigneswaran N., Zhao W., Dassanayake A. et al. // Hum. Pathol. — 2000. — Vol. 31 (8). — P. 931-937.
68. Werner J.A., Rathcke I.O., Mandic R. // Clin. Exp. Metastasis. — 2002. — Vol. 19 (4). — P. 275-282.
69. Xu Y.P., Zhao X.Q., Sommer K., Moubayed P. // J. Zhejiang. Univ. Sci. — 2003. — Vol. 4 (4). — P. 491-501.
70. Yasuda T., Sakata Y., Kitamura K. // Head Neck. — 1997. — Vol. 19 (7). — P. 611-616.
71. Yorioka C.W., Coletta R.D., Alves F. // Int. J. Oncol. — 2002. — Vol. 20 (1). — P. 189-194.
72. Yoshizaki T., Maruyama Y., Sato H., Furukawa M. // Int. J. Cancer. — 2001. — Vol. 95 (1). — P. 44-50.
73. Zeillinger R., Eder S., Schneeberger C. et al. // Anti-cancer Res. — 1996. — Vol. 16 (1). — P. 449-453.
74. Ziober B.L., Turner M.A., Palefsky J.M. // Oral. Oncol. — 2000. — Vol. 36 (4). — P. 365-372.