Онкомаркеры и белки теплового шока при хроническом гипертрофическом ларингите как вероятные предикторы малигнизации эпителиоцитов гортани

И.И. Нажмудинов[1], М.З. Саидов[2]

[1]Федеральный научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА России; Россия, 123182 Москва, Волоколамское шоссе, 30, корп. 2
[2]ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 367000 Республика Дагестан, г. Махачкала, пл. Ленина, 1.

Контакты: *Марат Зиявдинович Саидов marat2002@pochta.ru,*

Цель: *изучение продукции сывороточных онкомаркеров раково-эмбрионального антигена (РЭА), эпителиально-клеточных карцином цитокератина 19 (Cyfra 21-1) и плоскоклеточной карциномы (SCC) и белков теплового шока (БТШ) – БТШ27, БТШ70 и БТШ90, отражающих степень клеточного стресса эпителиоцитов гортани при хроническом гипертрофическом ларингите как вероятных предикторов малигнизации эпителиоцитов гортани.*
Материал и методы. *В работу были включены 36 больных с диагнозом хронического гипертрофического ларингита (ХГЛ). Изучалась продукция онкомаркеров – РЭА, Cyfra 21-1 и SCC при хроническом гипертрофическом ларингите методом иммуноферментного анализа. Вариации сывороточного уровня изученных онкомаркеров исследовались в зависимости от пика продукции БТШ, отражающих степень клеточного стресса эпителиоцитов гортани, которому подвергаются эти клетки при ХГЛ. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica (версия 6,0), а также Biostat 4.03.*
Результаты. *Показано, что при ХГЛ наиболее информативной в отношении прогноза является оценка количественного уровня онкомаркеров РЭА, SCC и Cyfra 21-1 в сыворотке крови на фоне максимальной продукции белков клеточного стресса (БТШ27, БТШ70 и БТШ90). Уровень сывороточного РЭА был достоверно повышен в сравнении с контролем. При ХГЛ на пике продукции всех стресс-белков (БТШ27, БТШ70 и БТШ90) концентрационный диапазон РЭА составил 2–3 нг/мл, SCC – 1–2 нг/мл и Cyfra 21-1 – 0–1,2 нг/мл.*
Заключение. *Концентрационный диапазон РЭА от 2 до 3 нг/мл, SCC – от 1 до 2 нг/мл и Cyfra 21-1 – от 0 до 1,2 нг/мл на пике продукции белков клеточного стресса (БТШ27, БТШ70 и БТШ90) является прогностически значимым в отношении малигнизации эпителиоцитов гортани, что может быть учтено в клинической практике.*

Ключевые слова: *хронический гипертрофический ларингит, онкомаркеры, раково-эмбриональные антигены, антиген плоскоклеточной карциномы, Cyfra 21-1, белки теплового шока, малигнизация*

DOI: 10.17650/2222-1468-2017-7-2-81-91

Tumor markers and heat shock proteins of chronic hyperpiastic laryngitis as a likely predictor of malignisation in larynx epitheliocytes

I.I. Nazmudinov[1], M.Z. Saidov[2]

[1]Research and Clinical Center of Otorhinolaryngology, Russian Federal Medico-Biological Agency; 30/2 Volokolamskoe shosse, Moscow 123182, Russia;
[2]Dagestan state medical University, Ministry of Health of Russia, 1 Lenin square, Makhachkala, Republic of Dagestan 367000, Russia

Objective: *in paper direct results of investigation the products of tumor makers – CEA (carcino-embryonic antigen), CYFRA 21-1 and SCC and heat shock proteins hsp27, hsp70, hsp90. reflacting the possibility of malignization epithelial cells in chronic hyperpiastic laryngitis.*
Materials and methods. *There were investigated 36 patients with chronic hyperplastic laryngitis. It was investigated the production of CEA (carcino-embryonic antigen), CYFRA 21-1, SCC and heat shock proteins hsp27, hsp70 in immune-enzyme method. The variation of serum concentration oncomarkers was investigated in dependent on the maximum production of heat shock proteins reflactihg the value of cell stress in chronic hyperplastic laryngitis. Statistics analysis was convey in programs Statistica (version 6,0) and "Biostat 4.03".*
Results. *It was shown more prognostic informative in chronic hyperplastic laryngitis the level of CEA, CYFRA 21-1 and SCC on the background of maximum production of heat shock proteins hsp27, hsp70, hsp90. The serum level of CEA was higher in comparison with control. On the maximum of production hsp27, hsp70, hsp90 the concentration of CEA was 2–3 ng/ml, Cyfra 21-1 – 0–1,2 ng/ml and SCC 1–2 ng/ml.*
Conclusions. *Variation of serum oncomarkers level of CEA – 2–3 ng/ml, CYFRA 21-1 – 0–1,2 ng/ml and SCC – 1–2 ng/ml are the prognostic value in the possibility of malignization epithelial cells in chronic hyperpiastic laryngitis. This results is important in clinical practice.*

Key words: *chronic hyperpiastic laryngitis, tumor makers, carcino-embryonic antigen, CYFRA 21-1, squamous cell carcinoma, heat shock proteins, malignisation*

Введение

Предраковые заболевания гортани относятся к той категории болезней головы и шеи, которые объединяют в себе фундаментальные аспекты молекулярно-генетических процессов с потенциальной возможностью малигнизации эпителиоцитов гортани, достаточно широкой распространенностью и большой практической значимостью. Отсутствие прогностических критериев вероятности озлокачествления клеток гортани, обладающих приемлемыми для практической работы врача значениями чувствительности и специфичности, добавляют актуальности этой проблеме. Индукция опухолевого роста связана с обязательными предопухолевыми изменениями в слизистой оболочке гортани, представленными дисплазиями (гиперплазиями) эпителия различной степени, и сопровождается повышенной продукцией различных онкомаркеров, в частности, раково-эмбрионального антигена (РЭА), маркера эпителиально-клеточных карцином – цитокератина 19 (Cyfra 21-1) ассоциированного с опухолью антигена плоскоклеточной карциномы (SCC) [1–4]. Кроме этого, процесс малигнизации эпителиоцитов гортани имеет патогенетическую связь с явлением «клеточного стресса», отражением которого является уровень продукции белков теплового шока (БТШ) различной молекулярной массы [5–7].

В настоящее время нет возможностей определить «точку отсчета» молекулярно-генетических событий, индуцирующих малигнизацию эпителиоцитов и способствующих формированию рака *in situ* и дальнейшему инвазивному росту. Не всегда патоморфологическая картина совпадает с мнением клиницистов о степени тяжести заболевания и возможности малигнизации эпителиоцитов гортани. Многочисленные попытки исследователей в ведущих лабораториях мира определить наиболее информативные показатели вероятных патогенетических механизмов, сопряженных с прогрессированием патологического процесса и малигнизацией эпителиоцитов, приносили преходящий успех. Общепринятые в настоящее время критерии вероятности малигнизации, основанные на оценке степени дисплазии/гиперплазии эпителиоцитов гортани при предраковых заболеваниях этого органа, безусловно, являются наиболее обоснованными и апробированными в клинической практике [8, 9]. Однако и в этом случае нередко отсутствие однозначной интерпретации патоморфологических результатов со стороны практикующих врачей и врачей-патологоанатомов. Именно поэтому понятен интерес исследователей к гуморальным показателям сыворотки крови в отношении отработки возможностей решения фундаментальной проблемы – прогноза малигнизации эпителиоцитов гортани при предраковых заболеваниях гортани. Хронический гипертрофический ларингит (ХГЛ) относят к предраковым заболеваниям гортани и изучение прогностически важных, с точки зрения вероятности малигнизации эпителиоцитов гортани, показателей является крайне актуальной задачей с практической и научной точки зрения.

Цель настоящего **исследования** – изучение патоморфологии и иммуногистохимических (ИГХ) данных экспрессии цитокератинов в операционном материале, а также сывороточных уровней онкомаркеров и БТШ как вероятных предикторов малигнизации эпителиоцитов гортани при хроническом гипертрофическом ларингите.

Пациенты и методы

В открытое проспективное контролируемое сравнительное исследование вошли результаты обследования, лечения и наблюдения 36 больных с ХГЛ, из них 25 мужчин (средний возраст 42,3 ± 8,5 года) и 11 женщин (средний возраст 52,0 ± 6,8 года). В группе сравнения обследованы 17 пациентов с раком гортани, из них 12 мужчин (средний возраст 61,0 ± 5,4 года) и 5 женщин (средний возраст 63,0 ± 7,8 года). Все пациенты наблюдались в отделении хирургии гортани Федерального научно-клинического центра оториноларингологии ФМБА России. Контрольную группу составили 14 практически здоровых людей в возрасте 40 ± 9 лет.

Помимо общепринятых методов исследования соматического состояния и состояния ЛОР-органов для детального осмотра полости носа, носо- и гортаноглотки применялся метод фиброскопии. Непрямую эндоларингоскопию проводили с помощью эндоскопа фирмы Karl Storz (Германия) с обзором 70° и 90°. Для лечения гиперкератоза был разработан способ хирургического лечения с применением CO_2-лазера, заключающийся в иссечении участка дисплазии с максимальным сохранением слизистой оболочки гортани. При гиперкератозах I и II степени проводилась операция хордэктомии 1-го типа с применением CO_2-лазера и операция хордэктомии 2-го типа при гиперкератозах III степени.

Операционный и биопсийный материал направлялся на патоморфологическое исследование в отделение патологической анатомии ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы». Материал обрабатывался, фиксировался, заливался в парафин и резался в соответствии со стандартными методиками, принятыми в работе патологоанатомических лабораторий. Препараты окрашивались гематоксилин-эозином и изучались под световым микроскопом. Описание патоморфологической картины проводилось с использованием принципов классификации дисплазий эпителия гортани Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

ИГХ-исследования проводились в строгом соответствии с рекомендациями компаний – производите-

лей реагентов. В работе использовались следующие моноклональные антитела (МКАТ) к цитокератинам:

– к цитокератину 19 (Cyfra 21-1): Santa Cruz, SC-6278, мышиные, изотип IgG1;

– пан-цитокератину (C11): Santa Cruz, клон SC-8018, мышиные, изотип IgG1;

– кератину 16: Neo Markers, CA, клон MS-620-P, мышиные;

– кератину 6: Neo Markers, CA, клон MS-766-P, мышиные.

В качестве тест-системы для визуализации результатов ИГХ-исследований использовалась EnVision + Dual Link System-HRP (DAB) (Dako, Дания).

Наиболее демонстративные препараты, включая окрашенные гематоксилин-эозином, сканировались в световом микроскопе Leica DMLB (Швейцария) со встроенной видеокамерой по программе «Leica QWin Colour (GB) for Image Analysis». Видеоизображения переносились на флеш-карту и воспроизводились в тексте работы.

При исследовании количества онкомаркеров и БТШ в сыворотке крови использовали следующие наборы твердофазного иммуноферментного анализа:

– на РЭА: Immulite 2000 (Siemens, Германия),

– на Cyfra 21-1: наборы DRG Insruments (Германия),

– на SCC: наборы Abbott (Германия),

– на БТШ27, БТШ70 и БТШ90: наборы ADI-EKS-500, ADI-EKS-715 и ADI-EKS-895 (Enzo Life Sciences, Catalog Number, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Statistica (версия 6,0), а также Biostat 4.03. База данных создавалась с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2007. Непрерывные переменные в исследуемых выборках представлены в виде медианы (Me) с 25-м; 75-м процентилями. Для определения достоверности различий между двумя сравниваемыми выборками использовался Т-критерий Манна–Уитни, при множественных сравнениях – критерии Крускала-Уоллиса и Данна, для построения диаграмм – возможности сводных таблиц (Microsoft Excel 2007). При определении достоверности отличий (p) критическим приняли уровень статистической значимости не более 0,05.

Результаты и обсуждение

Типичная патоморфология биоптатов слизистой оболочки гортани при ХГЛ у обследованных нами пациентов сводилась к следующим изменениям. В большинстве случаев определялось утолщение (гиперплазия) многослойного плоского эпителия (часто с образованием сосочковых выростов) на всем протяжении за счет шиповатого и рогового слоев, на некоторых участках отмечалось разрыхление рогового слоя с появлением в клетках палочковидных ядер, исчезновение зернистого слоя (явления паракератоза). Роговой слой был значительно утолщен (явления гиперкератоза), встречались случаи его незначительного разрыхления (рис. 1).

Определялись фокусы акантоза – остроконечные тяжи многослойного плоского эпителия, клетки эпителия в этом участке, погруженные в собственную пластинку слизистой оболочки, – с крупными гиперхромными ядрами, митозами, нарушением полярности. Подобные изменения относили к дисплазии I степени (по классификации ВОЗ). Встречались случаи истончения (атрофии) многослойного плоского эпителия. В собственной пластинке слизистой оболочки определялась воспалительная инфильтрация с наличием лимфоцитов, плазматических клеток и моноцитов, очагами склероза, явлениями слабого отека, расширенными сосудами (рис. 2). В обследованной нами группе больных ХГЛ дисплазия I степени определялась в 35 % случаев.

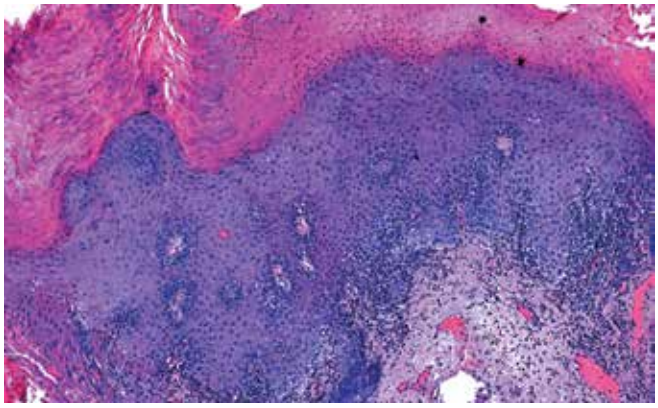

Рис. 1. *Слизистая оболочка гортани при хроническом гипертрофическом ларингите; окрашивание гематоксилин-эозином; ×100*

Fig. 1. *Laryngeal mucosa in chronic hypertrophic laryngitis; hematoxylin and eosin staining; × 100*

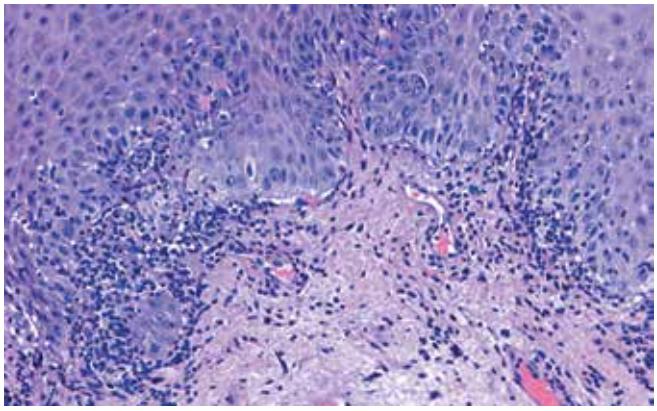

Рис. 2. *Дисплазия слизистой оболочки гортани I степени при хроническом гипертрофическом ларингите; окрашивание гематоксилин-эозином; ×400*

Fig. 2. *Grade I laryngeal dysplasia in chronic hypertrophic laryngitis; hematoxylin and eosin staining; × 400*

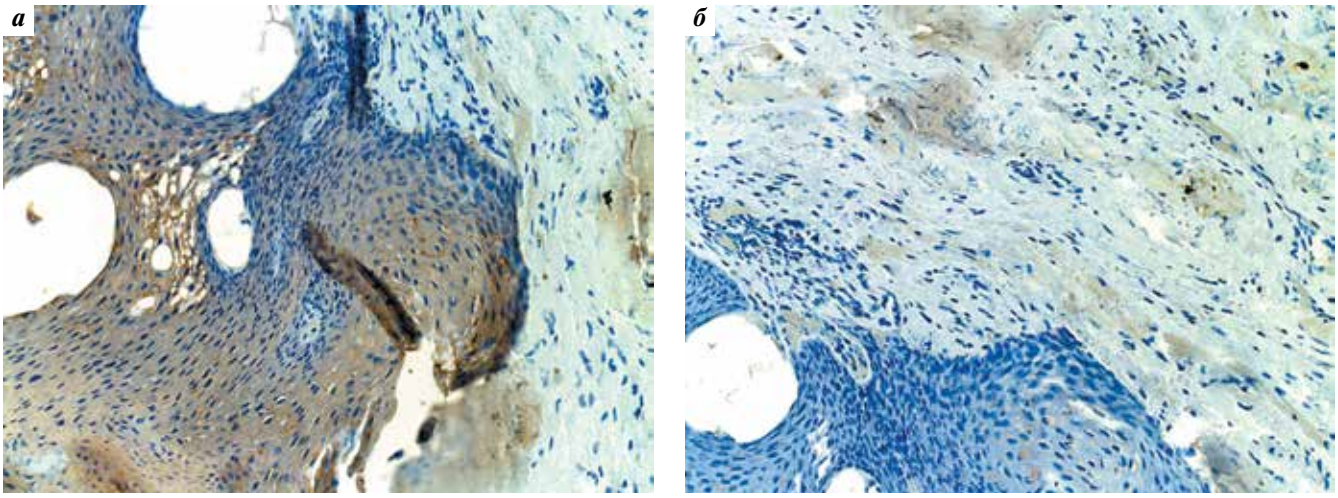

Рис. 3. *Положительная реакция на хромоген DAB (3,3'-диаминобензидин) при хроническом гипертрофическом ларингите: а – на цитокератин 6, б – на цитокератин 19 (Cyfra 21-1); ×200*

Fig. 3. *Positive DAB (3,3' – diaminobenzidine) chromogen reaction in chronic hypertrophic laryngitis: a – for cytokeratin 6, б – for cytokeratin 19 (Cyfra 21-1); ×200*

Важно было изучить экспрессию цитокератинов *in situ*, поскольку известно значение этого семейства белков как маркеров степени дисплазии слизистой оболочки гортани. Кроме этого, весьма интересно было оценить корреляцию экспрессии цитокератинов *in situ* с уровнем онкомаркера Cyfra 21-1 в сыворотке крови больных ХГЛ. Результаты ИГХ-исследований экспрессии цитокератинов *in situ* свидетельствуют о том, что слабоположительная реакция эпителия слизистой оболочки определялась по отношению к цитокератину 19 (Cyfra 21-1) и кератину 16. Экспрессия кератина 6 практически отсутствовала. Примечательно, что уровень сывороточного Cyfra 21-1 у обследованных больных ХГЛ определял тенденцию к снижению этого показателя по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Отметим, что реакция была незначительной, занимала небольшие участки эпителия, в некоторых случаях граница между ними была размыта. На рис. 3 видна незначительная экспрессия цитокератина 11 в области многослойного плоского неороговевающего эпителия. Слабая экспрессия Cyfra 21-1 тестировалась преимущественно в подлежащей строме, представленной плотной соединительной тканью (рис. 3*б*).

На фоне представленных патоморфологических и ИГХ-изменений слизистой оболочки гортани при ХГЛ крайне интересно было изучить сывороточные уровни онкомаркеров и БТШ.

Из всех известных и хорошо охарактеризованных онкомаркеров мы остановились на наиболее информативных – это РЭА, антиген SCC и фрагмент цитокератина 19 Cyfra 21-1. Из группы БТШ были исследованы БТШ27, БТШ70 и БТШ90.

Результаты изучения уровня РЭА, Cyfra 2-1 и SCC в сыворотке крови у больных групп ХГЛ и раком гортани (в качестве группы сравнения) представлены в табл. 1. Видно, что у больных ХГЛ уровень сывороточного РЭА статистически достоверно ($p < 0,01$) превышал аналогичные показатели в контрольной группе. Такая же картина наблюдалась и в группе больных раком гортани. Иными словами, течение ХГЛ и рака гортани сопровождалось усилением синтеза РЭА и повышением их сывороточного уровня. Напротив, значения Cyfra 21-1 в обеих исследованных группах по сравнению с контрольной имели тенденцию к снижению, но статистически недостоверную ($p > 0,05$), которая сопровождалась слабоположительной ИГХ-реакцией эпителия слизистой оболочки у больных ХГЛ в отношении цитокератина 19 (Cyfra 21-1) и кератина 16. Уровень сывороточного SCC при ХГЛ практически не отличался от показателей в контрольной группе, в то время как у больных раком гортани увеличение SCC достигало статистически достоверных значений по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Таким образом, вариации количественного уровня РЭА при ХГЛ (с учетом синергичности этих изменений с изменениями в группе больных раком гортани) могут быть подвергнуты дальнейшему анализу на предмет использования их в качестве биомаркера течения и прогноза ХГЛ.

Представлял интерес расчет доли пациентов с ХГЛ, у которых конкретные результаты уровней онкомаркеров превышали значение верхнего (75-го) процентиля в контрольной группе, который был взят в качестве «планки», в связи с достоверным увеличением РЭА и SCC у обследованных больных. Из табл. 2 видно, что у 85,7 % больных ХГЛ определялся уровень РЭА, превышающий значение 1,56 нг/мл (значение 75-го процентиля в контрольной группе), а у больных раком гортани этот процент достигал 94 %. Доля больных ХГЛ, у которых уровни SCC превышали значение

Таблица 1. *Значения онкомаркеров в сыворотке крови при хроническом гипертрофическом ларингите (ХГЛ) и раке гортани, нг/мл, Me (25-й; 75-й процентили)*

Table 1. *Tumor marker serum levels in chronic hypertrophic laryngitis (CHL) and laryngeal cancer, ng/ml, Me (25; 75 percentiles)*

Группа больных Patient group	Раково-эмбриональный антиген Carcinoembryonic antigen	Онкомаркер Cyfra 21-1 Cyfra 21-1 tumor marker	Антиген плоскоклеточной карциномы Squamous cell carcinoma antigen
ХГЛ, *n* = 15 CHL, *n* = 15	2,44 (2; 2,6)**	0,36 (0,25; 0,61)	1,2 (1,15; 1,85)
Рак гортани, *n* = 10 Laryngeal cancer, *n* = 10	2,63 (2,1;4,4)**	0,36 (0,22;0,63)	1,7 (1,3; 3,5)*
Контрольная, *n* = 14 Control, *n* = 14	1,55 (1,09;1,56)	0,57 (0,37;0,59)	1,1 (1;1,4)

*$p < 0,05$, **$p < 0,01$ – по сравнению с контролем (Т-критерий Манна–Уитни).*
*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ compared to control (Mann-Whitney U-test).*

Таблица 2. *Доля больных хроническим гипертрофическим ларингитом (ХГЛ) и раком гортани относительно уровней онкомаркеров, превышающих значения 75-го процентиля в контрольной группе, %*

Table 2. *Percent of patients with chronic hypertrophic laryngitis (CHL) and laryngeal cancer in relation to tumor marker levels above the level of 75th percentile in the control group, %*

Группа больных Patient group	Раково-эмбриональный антиген Carcinoembryonic antigen	Онкомаркер Cyfra 21-1 Cyfra 21-1 tumor marker	Антиген плоскоклеточной карциномы Squamous cell carcinoma antigen
	1,56 нг/мл 1.56 ng/ml	**0,59 нг/мл** 0.59 ng/ml	**1,4 нг/мл** 1.4 ng/ml
ХГЛ, *n* = 15 CHL, *n* = 15	85,7	28,5	42,8
Рак гортани, *n* = 10 Laryngeal cancer, *n* = 10	94	29	71,5

Таблица 3. *Значения белков теплового шока (БТШ) при хроническом гипертрофическом ларингите (ХГЛ) и раке гортани, нг/мл, Me (25-й; 75-й процентили)*

Table 3. *Levels of heat shock proteins (HSP) in chronic hypertrophic laryngitis (CHL) and laryngeal cancer, ng/ml, Me (25; 75 percentiles)*

Группа больных Patient group	БТШ27 HSP27	БТШ70 HSP70	БТШ90 HSP90
ХГЛ, *n* = 15 CHL, *n* = 15	30 (27,9; 349,2)*	7,8 (6,4; 9,4)**	62,7 (51; 74)
Рак гортани, *n* = 10 Laryngeal cancer, *n* = 10	28 (20,8;112,1)**	6,4 (4,4;7,9)**	51 (34,8;62,7)*
Контрольная группа, *n* = 14 Control, *n* = 14	413,6 (305;423)	36,2 (30,2;43,4)	73,6 (61;87,7)

*$p < 0,05$, **$p < 0,01$ по сравнению с контролем (Т-критерий Манна–Уитни).*
*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ compared to control (Mann-Whitney U-test).*

1,4 нг/мл (значение 75-го процентиля в контрольной группе), составила 42,8 %, а при раке гортани она возрастала до 71,5 %. При раке гортани, напомним, определялось достоверное увеличение сывороточного уровня SCC по сравнению с контролем. По Cyfra 21-1 полученные результаты не представляли информационной ценности, т. е. уровни сывороточных РЭА и SCC при ХГЛ являются патогенетически взаимосвязанными.

Количественные уровни БТШ27, БТШ70 и БТШ90 в сыворотке крови у больных ХГЛ и при раке гортани представлены в табл. 3. Видно, что при ХГЛ, так же как и при раке гортани, отмечается статистически достоверное снижение и БТШ27, и БТШ70 ($p < 0,05$, $p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой. Примечательно, что значения этих белков были практически идентичны в двух исследованных группах больных. БТШ90 достоверно снижался по сравнению с данными в контрольной группе только при раке гортани.

С учетом того, что уровни БТШ при ХГЛ были ниже по сравнению с контролем, мы оценили количественное разделение больных по отношению к значениям 25-го процентиля контрольной группы (табл. 4).

Таблица 4. *Доля больных хроническим гипертрофическим ларингитом (ХГЛ) и раком гортани относительно уровней белков теплового шока (БТШ) со значениями ниже 25-го процентиля в контрольной группе, %*

Table 4. *Percent of patients with chronic hypertrophic laryngitis (CHL) and laryngeal cancer in relation to heat shock proteins (HSP) levels below the level of 25th percentile in the control group, %*

Группы больных Patient group	БТШ27 HSP 27	БТШ70 HSP 70	БТШ90 HSP 90
	305 нг/мл 305 ng/ml	30 нг/мл 30 ng/ml	61 нг/мл 61 ng/ml
ХГЛ, $n = 15$ CHL, $n = 15$	71,4	100	28,5
Рак гортани, $n = 10$ Laryngeal cancer, $n = 10$	85,7	100	57

Как видно, все обследованные больные (с ХГЛ и раком гортани) имели уровни БТШ70 ниже 30 нг/мл по сравнению со значением БТШ70 (25-го процентиля) в контрольной группе, в то время как в контрольной группе такой уровень имели только 25 % здоровых доноров. Показатели БТШ27 в группах ХГЛ и больных раком гортани превышали контрольные более чем в 2 раза. Наибольшее количество случаев, при которых уровень БТШ90 был ниже 61 нг/мл (значение 25-го процентиля в контрольной группе), было зарегистрировано в группе больных раком гортани (57 %), в то время как у больных ХГЛ эти цифры практически не отличались от контрольных. Таким образом, при разработке предложений относительно прогностической ценности уровней БТШ при ХГЛ, помимо констатации факта ингибиции продукции БТШ также весьма информативен расчет доли пациентов, у которых уровень БТШ ниже значений 25-го процентиля по сравнению с контрольной группой.

В обследованной нами группе больных ХГЛ дисплазия I степени определялась в 35 % случаев, из чего вытекает, что синхронные изменения уровней онкомаркеров и БТШ при раке гортани и ХГЛ могут быть рассмотрены в качестве прогностических маркеров относительно вероятности малигнизации эпителия гортани при ХГЛ. Причем это заключение распространяется не только на случаи ХГЛ, сопровождающиеся дисплазией I степени, но и на случаи, при которых дисплазия не определяется.

Дальнейший анализ результатов наших исследований связан с оценкой распределения уровней БТШ в зависимости от колебаний количества онкомаркеров в сыворотке крови больных ХГЛ. Цель анализа – это, прежде всего, определение количественных диапазонов сопряженных изменений БТШ и онкомаркеров, однонаправленных и при ХГЛ, и при раке гортани. С этой целью мы использовали возможности сводной таблицы программы Microsoft Excel. В случаях, когда в такие диапазоны попадает максимальное количество больных, а также при наличии достоверных корреляционных взаимосвязей и высоких показателях чувствительности, специфичности и прогностичности использованных тестов, можно рекомендовать подобные показатели в качестве прогностических, представив вероятность озлокачествления процесса при ХГЛ. При таких условиях замеров показателей мы можем определить значения онкомаркеров на максимальном уровне клеточного стресса эпителиоцитов гортани, определяемого по продукции БТШ.

Распределение уровней БТШ27 и соответствующих значений РЭА в периферической крови больных ХГЛ представлено на рис. 4*а*. С целью сравнительного анализа аналогичная диаграмма по отношению к раку гортани отражена на рис. 4*б*. Видно, что максимальные уровни БТШ27 и при ХГЛ, и при раке гортани встречаются только в случаях, когда показатели РЭА у этих больных находятся в диапазоне от 2 до 3 нг/мл. Иными словами, стресс эпителиоцитов гортани, возникающий

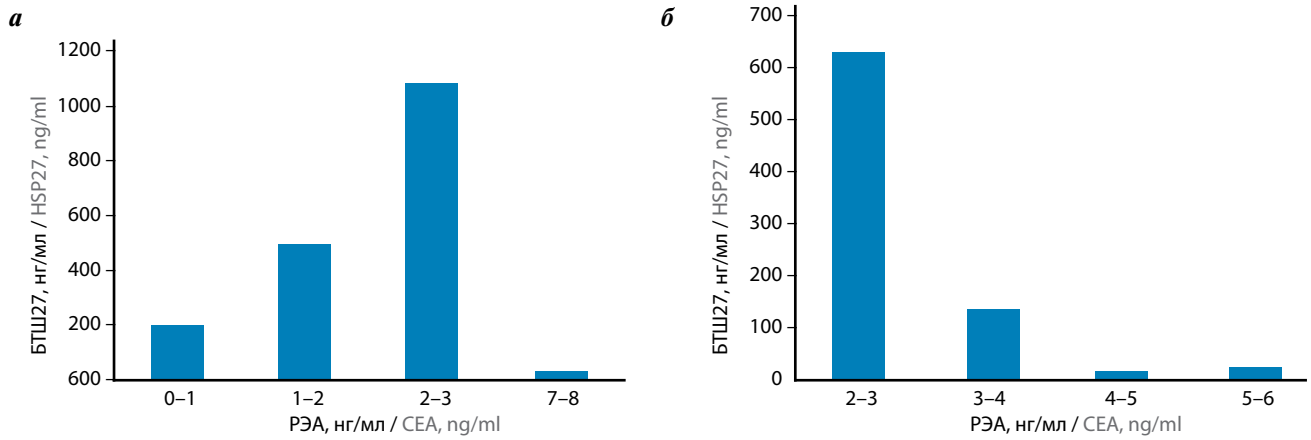

Рис. 4. *Уровень белков теплового шока 27 (БТШ27) в различных диапазонах концентрации раково-эмбрионального антигена (РЭА) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 4. *Levels of heat shock protein 27 (HSP27) for various ranges of carcinoembryonic antigen (CEA) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

при ХГЛ и раке гортани, сопровождается максимальным выбросом в кровь БТШ27. Этот уровень чутко отражает состояние систем клеточного жизнеобеспечения, и данный процесс сопровождается синтезом РЭА в указанном количественном диапазоне. Условно эти соотношения можно представить так:

РЭА – от 2 до 3 нг/мл ~ *max* БТШ27.

В соответствии с принципами анализа, принятыми в настоящей работе, указанные соотношения можно рекомендовать в качестве прогностических относительно вероятности озлокачествления эпителиоцитов при ХГЛ. Напомним, что при ХГЛ и раке гортани уровни РЭА достоверно повышались по сравнению с контрольной группой ($p < 0{,}01$, см. табл. 1); у максимального количества больных с этими заболеваниями уровни РЭА превышали значения 1,56 нг/мл (значение 75-го процентиля в контрольной группе) (см. табл. 2).

На рис. 5*а* и *б* отражены уровни БТШ70 при различных количественных диапазонах РЭА в крови больных ХГЛ и раком гортани. Видно, что и в этих случаях максимальные уровни БТШ70 встречаются только в тех случаях, когда уровни РЭА у этих больных находятся в диапазоне от 2 до 3 нг/мл. Указанные соотношения можно представить следующим образом:

РЭА – от 2 до 3 нг/мл ~ *max* БТШ70.

Подчеркнем важный элемент результатов – это синергизм изменений при ХГЛ и раке гортани.

На рис. 6*а* и *б* представлены аналогичные диаграммы, касающиеся уровня БТШ90. Картина по нему также принципиально не отличается от предшествующих данных. Видно, что максимальные уровни БТШ90 приходятся на диапазон РЭА от 2 до 3 нг/мл. Соотношения выглядят следующим образом:

РЭА – от 2 до 3 нг/мл ~ *max* БТШ90.

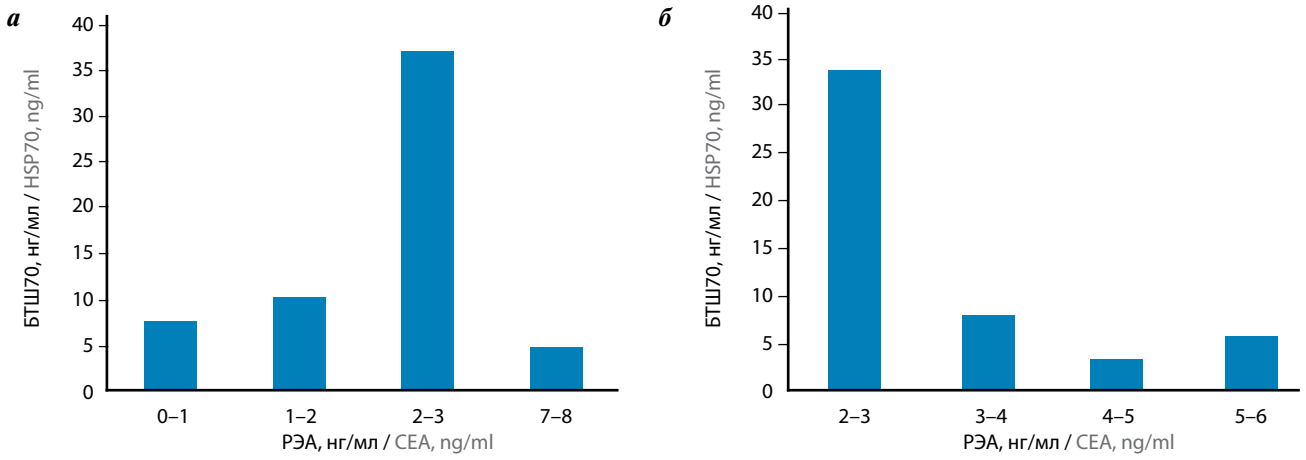

Рис. 5. *Уровень белков теплового шока 70 (БТШ70) в различных диапазонах концентрации раково-эмбрионального антигена (РЭА) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 5. *Levels of heat shock protein 70 (HSP70) for various ranges of carcinoembryonic antigen (CEA) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

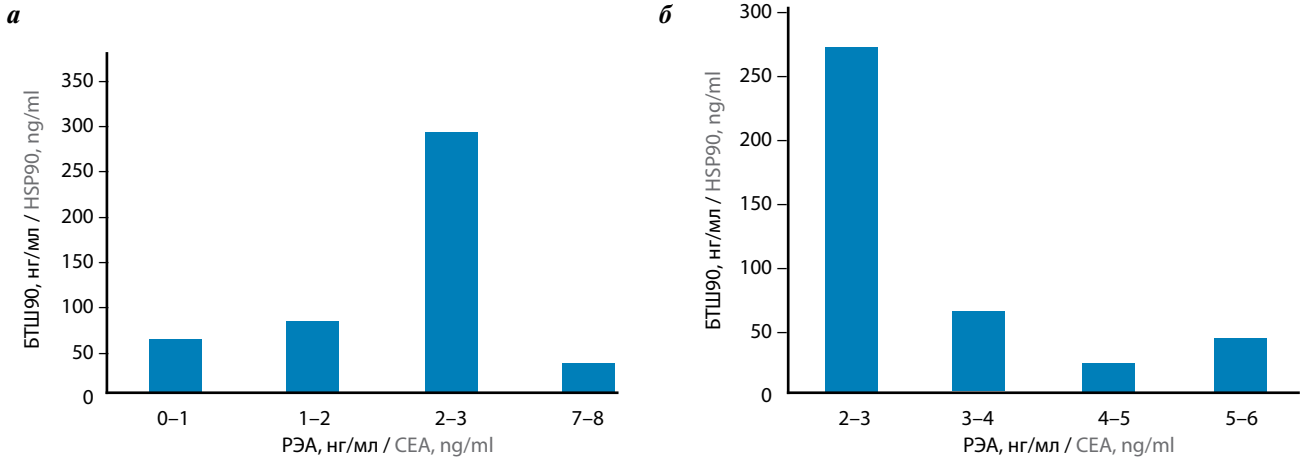

Рис. 6. *Уровень белков теплового шока 90 (БТШ90) в различных диапазонах концентрации раково-эмбрионального антигена (РЭА) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 6. *Levels of heat shock protein 90 (HSP90) for various ranges of carcinoembryonic antigen (CEA) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

Также отмечается синергизм изменений БТШ90 и РЭА при ХГЛ и раке гортани Таким образом, основываясь на результатах анализа полученных данных, уровни РЭА от 2 до 3 нг/мл при ХГЛ можно рассматривать в качестве прогностических относительно трансформации ХГЛ в рак гортани.

Следующий блок полученных результатов касался взаимоотношений БТШ с уровнем SCC. Диаграммы, отражающие уровни БТШ27 в различных количественных диапазонах SCC при ХГЛ и раке гортани, представлены на рис. 7*а* и *б*. Видно, что при ХГЛ максимальный уровень БТШ27определяется в диапазоне концентраций SCC от 1 до 2 нг/мл, в то время как при раке гортани их максимальный уровень наблюдался в диапазоне концентраций SCC от 4 до 6 нг/мл, т. е. синергичности изменений изученных показателей при ХГЛ и раке гортани не наблюдается. Эти показатели характеризуют каждое заболевание в отдельности, и рекомендовать их использование в качестве прогностического теста при ХГЛ оснований нет.

Иная картина открывается в отношении БТШ70 и БТШ90. На рис. 8*а* и *б* представлены диаграммы, отражающие уровни БТШ70 при количественных диапазонах SCC в сыворотке крови. Очевидно, что в отношении БТШ70 наблюдается синергизм изменений SCC: при ХГЛ максимальный уровень БТШ70 определяется в диапазоне концентраций SCC от 1 до 2 нг/мл, при раке гортани он регистрируется в диапазоне концентраций SCC от 0 до 2 нг/мл. Напомним, что абсолютный уровень SCC в сыворотке крови больных в группе ХГЛ определял только тенденцию к повышению ($p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой, в то время как при раке гортани эти различия становились статистически достоверными (см. табл. 1). Доля больных ХГЛ, у которых значения SCC превышали значения 75-го процентиля контрольной группы (1,4 нг/мл), составила 42,8 %. При раке гортани эта доля удваивалась – 71,5 % (см. табл. 2). Все вместе взятое позволяет ввести значения SCC в сыворотке крови больных ХГЛ, превышающие 1,4 нг/мл, в качестве

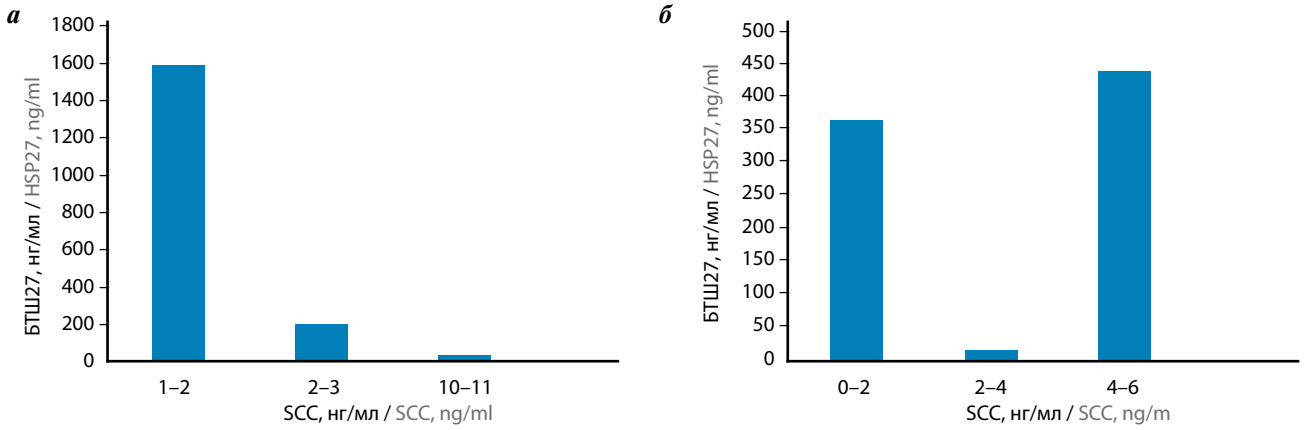

Рис. 7. *Уровень белков теплового шока 27 (БТШ27) в различных диапазонах концентрации плоскоклеточной карциномы (SCC) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 7. *Levels of heat shock protein 27 (HSP27) for various ranges of squamous cell carcinoma antigen (SCC) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

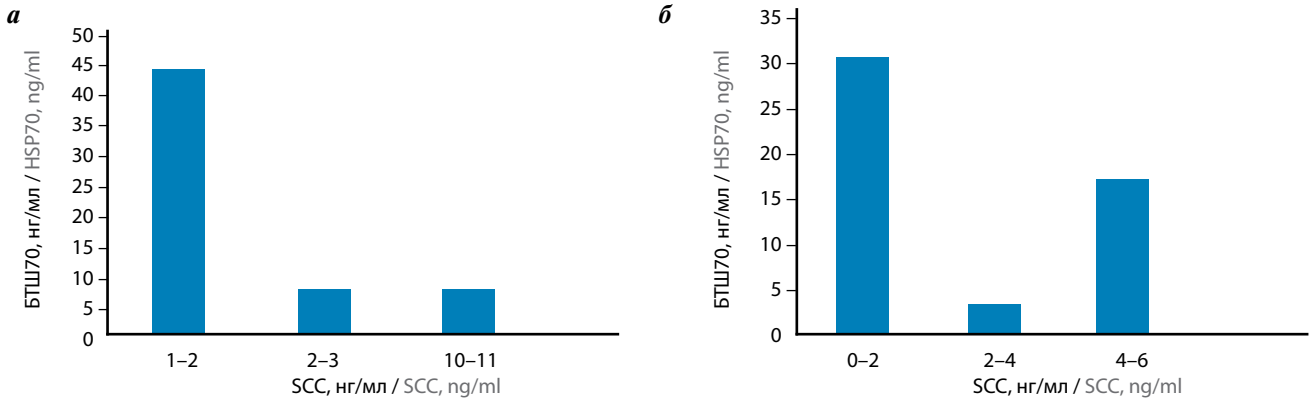

Рис. 8. *Уровень белков теплового шока 70 (БТШ70) в различных диапазонах концентрации плоскоклеточной карциномы (SCC) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 8. *Levels of heat shock protein 70 (HSP 70) for various ranges of squamous cell carcinoma antigen (SCC) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

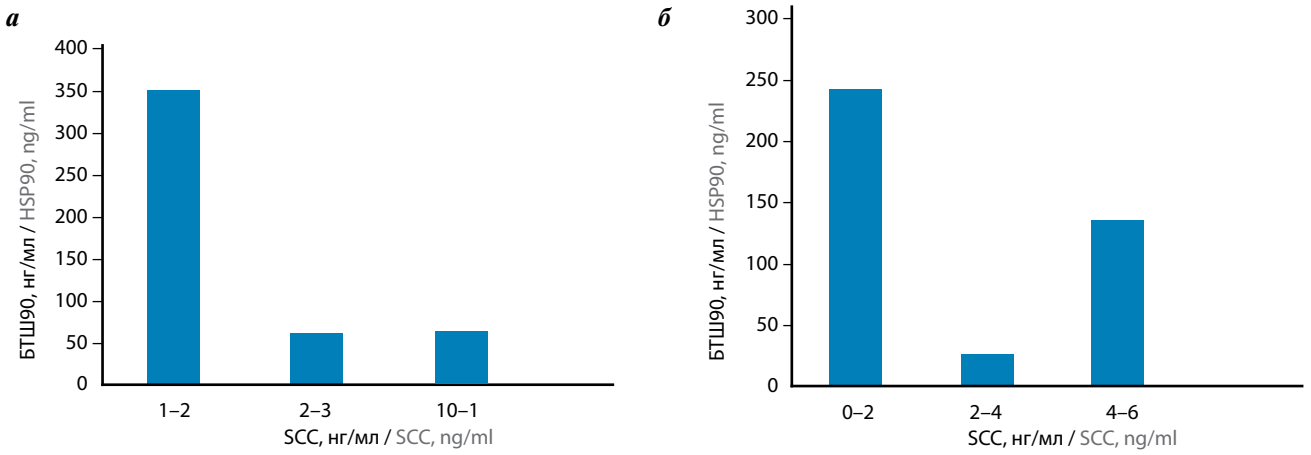

Рис. 9. *Уровень белков теплового шока 90 (БТШ90) в различных диапазонах концентрации плоскоклеточной карциномы (SCC) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 9. *Levels of heat shock protein 90 (HSP 90) for various ranges of squamous cell carcinoma antigen (SCC) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

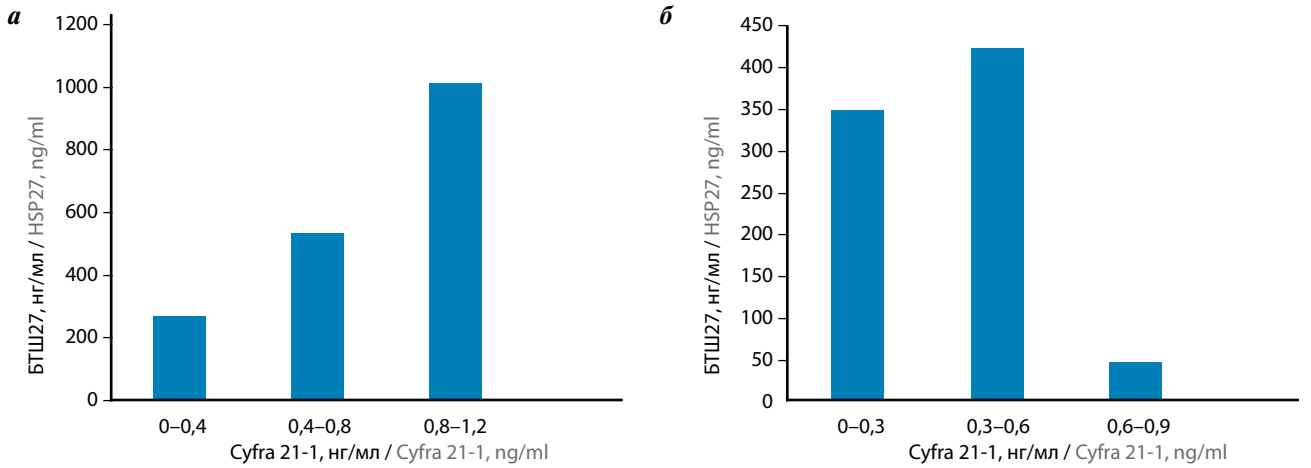

Рис. 10. *Уровень белков теплового шока 27 (БТШ27) в различных диапазонах концентрации цитокератина 19 (Cyfra 21-1) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 10. *Levels of heat shock protein 27 (HSP 27) for various ranges of cytokeratin 19 (Cyfra 21-1) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

прогностических в отношении вероятности малигнизации эпителия гортани.

Изложенное в полной мере относится и к БТШ90. На рис. 9*а* и *б* представлены диаграммы, отражающие соотношения уровней этого белка и SCC в сыворотке крови, на которых видно, что синергизм в отношении максимального уровня БТШ90 при ХГЛ и раке гортани достигается в диапазоне концентраций SCC от 0 до 2 нг/мл, таким образом все вышесказанные характеристики по БТШ70 в полной мере можно отнести и к БТШ90.

Третьим изученным нами онкомаркером был Cyfra 21-1. Как явствует из табл. 1, достоверных изменений уровней Cyfra 21-1 при ХГЛ и раке гортани не наблюдается. Более того, отмечается тенденция к понижению концентраций фрагментов цитокератинов 19 в сыворотке крови. Однако оценка соответствий значений БТШ и Cyfra 21-1 в сыворотке крови (рис. 10*а* и *б*) выявила определенные закономерности. Как видно из диаграмм, синергичности достижений максимальных уровней БТШ27 и количественных диапазонов Cyfra 21-1 при ХГЛ и раке гортани не наблюдается, соответственно информативности в контексте цели настоящей работы эти результаты не несут. Однако, если обратиться к БТШ70, картина существенно меняется. На диаграммах в отношении БТШ70 и уровней Cyfra 21-1 (рис. 11*а* и *б*) видно, что максимальный уровень БТШ70 достигается практически в едином диапазоне Cyfra 21-1 – от 0 до 0,4 нг/мл при ХГЛ и раке гортани. Вполне правомерно заключение о том, что стресс эпителиоцитов гортани при ХГЛ сопровождается достоверной связью с синтезом онкомаркера Cyfra 21-1 до уровня 0,4 нг/мл. Кроме этого, синергичность этих изменений при ХГЛ и раке гортани позво-

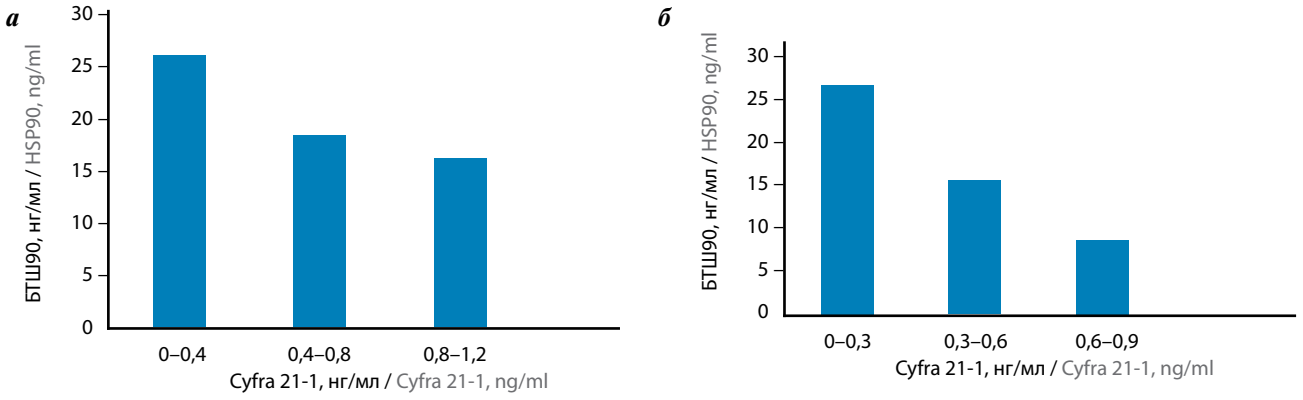

Рис. 11. *Уровень белков теплового шока 70 (БТШ70) в различных диапазонах концентрации цитокератина 19 (Cyfra 21-1) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 11. *Levels of heat shock protein 70 (HSP 70) for various ranges of cytokeratin 19 (Cyfra 21-1) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

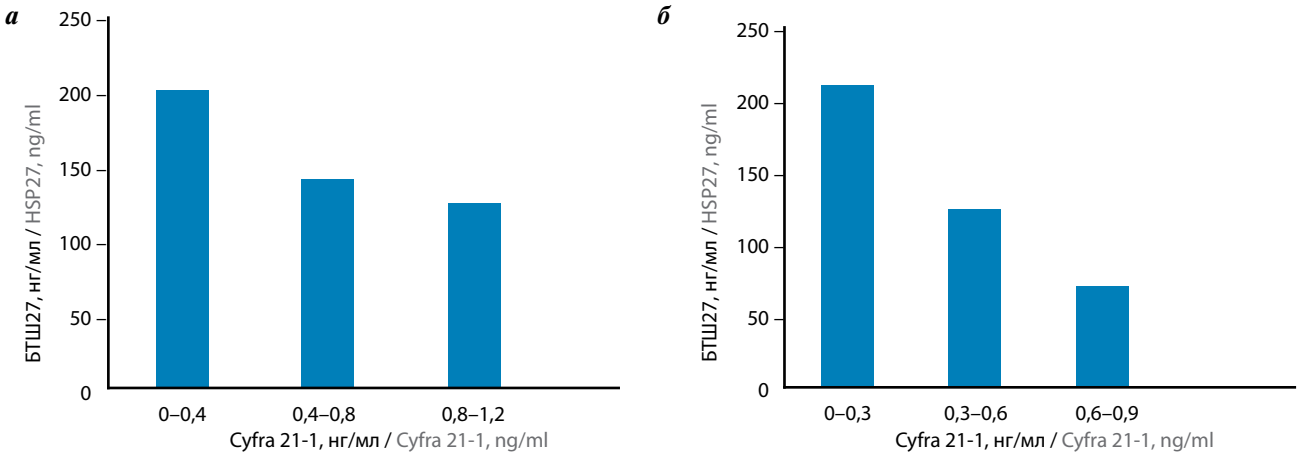

Рис. 12. *Уровень белков теплового шока 90 (БТШ90) в различных диапазонах концентрации цитокератина 19 (Cyfra 21-1) при хроническом гипертрофическом ларингите (а) и раке гортани (б)*

Fig. 12. *Levels of heat shock protein 90 (HSP 90) for various ranges of cytokeratin 19 (Cyfra 21-1) concentration in chronic hypertrophic laryngitis (a) and laryngeal cancer (б)*

ляет отнести значения Cyfra 21-1 до 0,4 нг/мл при ХГЛ к числу прогностических в отношении вероятности озлокачествления эпителиоцитов.

Диаграммы в отношении БТШ90 (рис. 12*а* и *б)* представляются идентичными диаграммам по БТШ70 (см. рис. 11*а* и *б*). И в этом случае максимум синтеза БТШ90 приходится на диапазон концентраций Cyfra 21-1 от 0 до 0,4 нг/мл. Соответственно, заключение, представленное по БТШ70, полностью относится и к БТШ90.

Заключение

Примененный нами при анализе фактического материала методологический прием, позволяющий оценить соотношение уровней продукции белков клеточного стресса (в основном максимального) с концентрационным диапазоном сывороточных онкобелков при ХГЛ, показал себя достаточно информативным в отношении определения критериев вероятной малигнизации эпителиоцитов гортани. Обязательный компонент подобного приема – это сравнение полученных результатов с аналогичными результатами при раке гортани.

Учет патоморфологических признаков, прежде всего рака *in situ*, а также степени дисплазии эпителия, является в настоящее время единственным используемым на практике методологическим подходом скрининга пациентов групп риска [8, 9]. Практическое испонение такого подхода сопряжено с рядом трудностей, в частности, с проблемой регулярного получения и изучения ткани слизистой оболочки гортани, а также с необходимостью проведения ИГХ-исследований на онкомаркеры. Молекулярно-генетические методы, позволяющие тестировать патологические и/или мутантные гены в настоящее время в клинической практике еще не приняты. При этом мониторинг по растворимым факторам сыворотки крови безусловно более доступен. В качестве основных показателей были изучены сывороточные уровни наиболее информативных при заболеваниях гортани онкомаркеров – РЭА и Cyfra 21-1,

а также SCC. Важной особенностью использованной нами методологии было то, что продукция указанных онкомаркеров изучалась во взаимосвязи с продукций клеточных стресс-белков (БТШ27, БТШ70 и БТШ90) и учитывалась концентрация сывороточных онкомаркеров на пике продукции всех классов БТШ. Последнее обстоятельство имеет принципиальное значение с учетом того, что все молекулярно-генетические события, предшествующие собственно процессу малигнизации эпителиоцитов, сопряжены с выраженным клеточным стрессом. Наиболее чувствительным показателем этого стресса является уровень продукции БТШ [6, 7]. Подобный подход обеспечивал максимальную информативность тех диапазонов концентраций онкомаркеров, которые соответствовали пику продукции БТШ.

Принимая во внимание то, что изученные нами показатели интерпретировались в контексте вероятности малигнизации эпителиоцитов гортани, был необходим сравнительный анализ полученных данных с аналогичными данными по контрольной группе здоровых доноров и больных раком гортани. Последняя группа больных выступала в качестве точки отсчета, приближение к которой означало повышение вероятности малигнизации эпителиоцитов при ХГЛ.

Анализ полученных результатов проводился с учетом пика продукции стресс-белков – БТШ27, БТШ70 и БТШ90. Однако общий уровень этих белков в сыворотке крови больных ХГЛ был достоверно ниже по сравнению с контрольной группой (см. табл. 3), что расходится с некоторыми данными литературы, согласно которым опухолевые заболевания головы и шеи сопровождаются увеличением уровня этих белков [5–7, 10]. Эти результаты можно объяснить следующим образом. Процесс хронического воспаления в слизистой оболочке гортани является мощным фактором стресса эпителиоцитов. Основным и специфическим признаком этого стресса является увеличение продукции БТШ [6, 7, 10]. Известно, что эти белки высвобождаются в окружающую среду, в том числе и в сыворотку крови, как в свободной, так и в связанной форме [7, 10]. Последняя формируется благодаря образованию БТШ прочных комплексов с молекулами субстрата. При ХГЛ связанные формы БТШ превалируют над свободными, соответственно, в формирование этих комплексов вовлечено больше молекул из пула свободных БТШ, и этот процесс уменьшает общий сывороточный уровень последних. Примененный нами метод иммуноферментного анализа регистрирует только свободные формы БТШ.

С использованием возможностей сводных таблиц показано, что на пике продукции всех стресс-белков при ХГЛ концентрационный диапазон РЭА составлял 2–3 нг/мл, SCC – 1–2 нг/мл и Cyfra 21-1 – 0–1,2 нг/мл. Аналогичные показатели при раке гортани имели тенденцию к повышению по сравнению с ХГЛ. На этом основании представленные значения онкомаркеров при ХГЛ могут быть использованы в качестве прогностических. Наличие указанных значений и тем более их повышение может свидетельствовать о возможности малигнизации эпителиоцитов гортани при ХГЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Шелковникова А.В. , Осипов В.Д., Герасимова И.Ю. Неспецифические опухолевые маркеры и клинико-морфологические показатели в диагностике и лечении предрака и раннего рака гортани. Вестник оториноларингологии 2008;5(прил.):307–8.
2. Alkotyfan K., Wiegand S., Müller H.H. et al. Cyfra 21-1 as a tumor marker for follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. Anticancer Res 2010;30(6):2291–6. PMID: 20651382.
3. Céruse P., Rabilloud M., Charrié A. et al. Study of Cyfra 21-1, a tumor marker, in head and neck squamous cell carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005;114(10):768–76. DOI: 10.1177/000348940511401006. PMID: 16285267.
4. Eleftheriadou A., Chalastras T., Ferekidou E. et al. Clinical effectiveness of tumor markers in squamous cell carcinoma of the larynx. Anticancer Res 2006;26(3B):2493–7. PMID: 16821638.
5. Титов В.Н., Крылин В.В. Стресс. Белки-шапероны. Нарушение биологической функции эндоэкологии и биологических реакций экскреции, воспаления и артериального давления (лекция). Клиническая лабораторная диагностика 2010;5:20–35.
6. Chen J.H., Chen L.M., Xu L.Y. et al. Expression and significance of heat shock proteins in esophagal squamous cell carcinoma. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2006;28(10):758-61. [Article in Chinese] PMID: 17366788.
7. Ciocca D., Calderwood S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones 2005;10(2):86–103. PMID: 6038406.
8. Blackwell K.E., Fu Y.S., Calcaterra T.C. et al. Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. Cancer 1995;75(2):457–63. PMID: 7812916.
9. Cupić H., Kruslin B., Belicza M. Epithelial hyperplastic lesions of the larynx in biopsy specimens. Acta Otolaryngol Suppl. 1997;527:103–4. PMID: 9197494.
10. Киселев В.И., Северин Е.С., Пальцев М.А. Противоопухолевые вакцины. Белки теплового шока как индукторы противоопухолевого иммунитета. Молекулярная медицина 2005;1:3–21.