

## Прогностическая роль лабораторных и иммуногистохимических маркеров в рецидивировании плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта

С.И. Кутукова<sup>1,2</sup>, Г.М. Манихас<sup>1,2</sup>, А.И. Яременко<sup>2</sup>, А.Б. Чухловин<sup>2</sup>, Н.П. Беляк<sup>1</sup>,  
С.С. Божор<sup>2</sup>, Р.К. Дибиров<sup>2</sup>, Т.С. Ермакова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Контакты: Светлана Игоревна Кутукова dr.s.kutukova@gmail.com

Под наблюдением находились 259 пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта и группа контроля – 50 здоровых добровольцев. Неблагоприятный прогноз и возникновение ранних рецидивов коррелировали с одновременным высоким уровнем С-реактивного белка (СРБ), раково-эмбрионального антигена (РЭА) и антигена плоскоклеточной карциномы (SCCA) (и ростом их значений в динамике), повышенным уровнем WBC (лейкоцитов), ANC (абсолютного числа нейтрофилов) и PLT (тромбоцитов), низкой экспрессией Caspase-3, высокой экспрессией p53 и bcl-2 и отсутствием снижения экспрессии Ki-67 в динамике, наличием EBV и CMV в ткани опухоли. Снижение индекса Ki-67 на этапах лечения, высокая экспрессия Caspase-3, низкая экспрессия bcl-2 и p53, низкий уровень СРБ, РЭА и SCCA, HPV-положительный статус опухоли ассоциированы с благоприятным прогнозом течения опухолевого процесса.

**Ключевые слова:** рецидивирование плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта, прогностические факторы, лабораторные показатели, иммуногистохимические маркеры, вирусы

### Prognostic role of laboratory and immunohistochemical markers in the recurrence of oral mucosal squamous cell carcinoma

S.I. Kutukova<sup>1,2</sup>, G.M. Manikhas<sup>1,2</sup>, A.I. Yaremenko<sup>2</sup>, A.B. Chukhlovin<sup>2</sup>, N.P. Belyak<sup>1</sup>, S.S. Bozhor<sup>2</sup>, R.K. Dibirov<sup>2</sup>, T.S. Ermakova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>City Clinical Oncology Dispensary, Saint Petersburg;

<sup>2</sup>Acad. I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia

Twenty fifty-nine patients with oral mucosal squamous cell carcinoma (a study group) and 50 healthy volunteers (a control group) were followed up. The poor prognosis and occurrence of early recurrences correlated with the simultaneous high level of C-reactive protein (CRP), carcinoembryonic antigen (CEA), squamous cell carcinoma antigen (SCCA) (and an increase in their values over time), elevated WBC, ACN, and PLT levels, low Caspase-3 expression, high p53 and bcl-2 expression, and the absence of lower Ki-67 expression over time, and the presence of EBV and CMV in tumor tissue. Decreased Ki-67 index at the stages of treatment, high Caspase-3 expression, low bcl-2 and p53 expression, and low CRP, CEA, and SCCA levels, and tumor HPV-positive status were associated with the favorable prognosis of a tumor process.

**Key words:** recurrent oral mucosal squamous cell carcinoma, prognostic factors, laboratory parameters, immunohistochemical markers, viruses

Злокачественные новообразования слизистой оболочки полости рта составляют до 4,5 % в структуре общеонкологической заболеваемости в России [1], и начиная с 80-х годов прошлого столетия это показатель неуклонно растет. Если в 2003 г. в России было выявлено 4600 случаев первичного рака данной локализации, то в 2013 г. этот показатель уже составил 9833 человека [2].

В настоящее время планирование лечения пациентов со злокачественными опухолями слизистой оболочки полости рта осуществляется в большинстве случаев эмпирическим путем и в основном базируется на «опыте хирурга или онколога». Расширение возмож-

ностей лабораторной диагностики, совершенствование хирургической техники, разработка новых химиотерапевтических препаратов и их комбинаций, возможность проведения сочетанного химиолучевого лечения дают возможность индивидуализировать подход к планированию комплексного и комбинированного лечения.

Прогностическая значимость различных факторов изучалась в достаточном количестве исследований [3, 4], однако на сегодняшний момент, к сожалению, не найдено единого показателя или сочетания оных, однозначно позволяющих оценить прогноз течения заболевания и риск развития его рецидива, что побудило нас к проведению данного исследования.

**Задачи исследования** – оценить прогностическую значимость комплекса клинических и лабораторных показателей: локализации процесса, гистологического типа опухоли, динамики сывороточных маркеров (С-реактивный белок (СРБ), раковый эмбриональный антиген (РЭА), антиген плоскоклеточной карциномы (SCCA)) и показателей периферической крови (лейкоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов) в течении и рецидивировании плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта. С помощью иммуногистохимического анализа провести оценку уровня экспрессии белков-регуляторов апоптоза Caspase-3 и bcl-2, маркера клеточной пролиферации Ki-67 и белка-супрессора p53 в опухолевой ткани. Определить частоту ассоциации плоскоклеточного рака полости рта с некоторыми типами вирусов (вирус папилломы человека (HPV) 6, 11, 16 и 18-го подтипов, вирус Эпштейна–Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV) и вирусы простого герпеса (HSV) I и II подтипов).

#### Материалы и методы

С января 2009 по май 2014 г. под наблюдением находилось 259 пациентов (146 мужчин и 113 женщин), госпитализированных в СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер» с диагнозом «плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта». Возраст пациентов варьировал от 31 года до 74 лет (медиана возраста составила 54 года). У 98 больных опухолевый процесс локализовался на слизистой оболочке языка, у 34 – на слизистой оболочке десны, у 19 – на слизистой оболочке щек, у 67 – на слизистой оболочке дна полости рта, у 18 – на слизистой оболочке нижней губы и у 23 – на слизистой оболочке ретромолярной области. Первичная опухоль у 31 пациента расценивалась как T1, у 45 – T2, у 97 – T3 и у 86 – T4. У 83 пациентов не определялись регионарные метастазы, у 57 пациентов определялись метастазы в 1 регионарный лимфатический узел (N1) и у 119 – в 3 лимфатических узла и более, соответственно (N2). Отдаленных метастазов (M) не было зарегистрировано ни у одного пациента, включенного в исследование. При гистологическом исследовании ткани опухоли у 74 пациентов опухолевый процесс был высокодифференцированный, у 99 – умеренно дифференцированный и у 86 – низкодифференцированный.

Всем больным в рамках комплексного лечения проводились 2–4 цикла предоперационной полихимиотерапии (ПХТ) в режиме PF (цисплатин 100 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно в 1-й день + 5-фторурацил 1000 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно, 24-часовая инфузия, с 1-го по 4-й день) с последующим хирургическим удалением опухолевого очага и путей регионарного метастазирования (объем хирургического вмешательства определялся с учетом стадии заболевания и распространенности опухолевого процесса). Завершающим этапом

лечения служил послеоперационный курс лучевой терапии до СОД 60 Гр. После завершения полного курса комплексного лечения пациенты переводились в режим динамического наблюдения с обследованием каждые последующие 3 мес.

На визите исходной оценки, перед началом каждого цикла лечения и на этапах наблюдения у всех пациентов проводилось изучение общего и местного статуса, фиксировался уровень лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови, определялись сывороточная концентрация СРБ и уровень РЭА и SCCA.

Компьютерно-томографическая оценка таргетных и нетаргетных очагов проводилась до начала лечения, после завершения каждого из его этапов, а также каждые 3 мес после завершения лечения.

В качестве иммуногистохимических маркеров были выбраны следующие показатели: Ki-67 – общепринятый маркер клеточной пролиферации, bcl-2 – внутриклеточный супрессор апоптоза, Caspase-3 – основной внутриклеточный эффектор программы апоптоза и p53 – белок-супрессор образования злокачественных новообразований. Экспрессию иммуногистохимических показателей оценивали до начала специализированного лечения с использованием образца опухолевой ткани, полученной при биопсии первичного очага. Кроме того, экспрессия Ki-67 изучалась на гистологическом материале, полученном в ходе хирургического этапа лечения.

С целью определения вирусной ДНК в опухолевой ткани проводилось полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени нативного образца, полученного при биопсии до начала лечения, фиксированного в этилендиаминтетрауксусной кислоте и замороженного до –20 °С на срок не более 30 сут. С целью контроля наличия вирусов у здоровых людей была произведена ПЦР-оценка образца неизменной слизистой оболочки десны у 50 здоровых добровольцев (31 мужчина и 19 женщин в возрасте от 28 до 69 лет, медиана возраста – 57 лет).

#### Результаты исследования

Из 259 пациентов 70 (27 %) к моменту написания настоящей статьи не имеют признаков прогрессирования заболевания. Эти пациенты условно составили группу 1. Рецидив опухоли зарегистрирован у 189 (73 %) человек – группа 2. Возникновение рецидива было зарегистрировано в сроки от 5 до 26 мес от момента завершения последнего этапа комплексного лечения. Медиана времени до прогрессирования (от момента начала комплексного лечения до наступления прогрессии заболевания) составила 16 мес.

#### Динамика исследуемых показателей

На визите исходной оценки все пациенты 1-й группы (без прогрессии заболевания) имели нормальный

уровень РЭА, не превышающий 2 нг/мл, а анализ динамики его концентрации не выявил повышения уровня показателя на этапах комплексного лечения и динамического наблюдения. Средний показатель РЭА на момент начала лечения и на контрольных этапах оценки составил  $2,1 \pm 0,2$  нг/мл. У 136 (72 %) пациентов 2-й группы, у которых возник рецидив опухоли, мы зарегистрировали первоначальный средний уровень РЭА  $3,47 \pm 0,7$  нг/мл, что не превышало верхней границы нормы; 53 (28 %) пациента имели повышенное значение РЭА до 9,6 нг/мл (средний показатель составил  $5,8 \pm 1,1$  нг/мл). При регистрации рецидива заболевания концентрация РЭА в сыворотке крови пациентов данной группы в среднем не превышала  $6,6 \pm 1,3$  нг/мл. Достоверного роста данного показателя при прогрессировании заболевания не отмечено, однако имеется уверенная тенденция к его повышению ( $p > 0,05$ ).

Уровень SCCA у больных 1-й группы находился в пределах референсных значений, его средний уровень на всех этапах оценки составил  $1,1 \pm 0,09$  нг/мл. Во 2-й группе 87 (46 %) пациентов имели повышенный уровень данного маркера уже на визите исходной оценки (максимальное значение составило 8,3 нг/мл, среднее –  $7,1 \pm 2,5$  нг/мл). У 63 (33 %) пациентов 2-й группы первичное среднее значение SCCA составляло  $1,9 \pm 0,8$  нг/мл, однако у них было отмечено достоверное повышение показателя на этапе регистрации прогрессии заболевания до  $9,6 \pm 2,8$  нг/мл ( $p < 0,01$ ). Уровень SCCA у 39 (21 %) пациентов 2-й группы на всех этапах оценки не превышал нормального значения.

Следует отметить, что у пациентов 2-й группы, у которых было зарегистрировано повышение концентрации РЭА при развитии рецидива, отмечался достоверный сочетанный рост SCCA ( $p < 0,01$ ).

Гематологические показатели – WBC (лейкоциты), ANC (абсолютное число нейтрофилов) и PLT (тромбоциты) – пациентов 1-й группы во всех контрольных точках находились в пределах установленной нормы. Лабораторная оценка данных показателей у больных 2-й группы в момент прогрессирования заболевания показала достоверное повышение уровня WBC до  $14,3 \pm 3,8 \times 10^9$ /л, ANC до  $7,4 \pm 2,9 \times 10^9$ /л, PLT до  $536 \pm 148 \times 10^9$ /л ( $p < 0,05$ ).

Средняя концентрация СРБ в сыворотке крови пациентов 1-й группы (без прогрессии) на визите исходной оценки составляла  $1,28 \pm 0,13$  мг/л и достоверно не увеличивалась при последующем динамическом наблюдении ( $p < 0,05$ ). У пациентов 2-й группы первоначальный уровень СРБ достоверно не отличался от такового у представителей 1-й группы: только у 5 % ( $n = 9$ ) больных на визите исходной оценки концентрация СРБ превышала верхнюю границу нормы и составила в среднем  $18,7 \pm 8,4$  мг/л. Однако при регистрации прогрессии заболевания уровень СРБ резко возрастал, средняя его концентрация составляла  $67,4 \pm 15,8$  мг/л,

а максимальное значение у пациента в группе с рецидивом заболевания составило 206,3 мг/л.

Проведенное иммуногистохимическое исследование позволило выявить следующие закономерности.

Экспрессия маркера клеточной пролиферации Ki-67 при изучении первичного материала была выявлена у 100 % пациентов 1-й группы: минимальный уровень составил 9 %, максимальный – 92 % (медиана – 63 %). При исследовании материала, полученного после ПХТ и хирургического удаления опухоли, было зарегистрировано достоверное снижение индекса Ki-67 в среднем до  $20 \pm 3$  % ( $p < 0,05$ ). У больных 2-й группы Ki-67-позитивные клетки также были выявлены в 100 % случаев (у всех 189 пациентов), и экспрессия их варьировала в пределах от 24 до 96 % (средний показатель составил  $57 \pm 7$  %). Анализ же послеоперационного материала у пациентов с зарегистрированным рецидивом показал умеренное снижение индекса маркера до  $49 \pm 5$  %, что достоверно отличалось от динамики снижения окраски ядер у пациентов 1-й группы (без рецидива заболевания) ( $p < 0,05$ ).

Анализ экспрессии bcl-2 выявил окрашивание менее 30 % опухолевых клеток у 56 (80 %) пациентов 1-й группы. В 14 (20 %) образцах наблюдалась гиперэкспрессия протеина bcl-2 ( $> 30$  %). Следует отметить, что в 11 из 14 случаев повышенного уровня белка bcl-2 регистрировалась его коэкспрессия с протеином p53, уровень которого превышал 25 %. Индекс p53 у пациентов с низким показателем bcl-2 не превосходил 25 %.

У больных 2-й группы была зарегистрирована положительная окраска цитоплазмы опухолевых клеток на bcl-2 в 121 (64 %) образце, и уровень ее превышал 30 %; у 68 (36 %) пациентов гиперэкспрессии белка bcl-2 выявлено не было. Достоверной разницы между исследуемыми группами по данному показателю выявить не удалось, однако говорить о тенденции возможно.

Уровень экспрессии белка p53 в образцах 1-й группы выявили в 9 % ( $n = 6$ ) случаев, остальные 63 (91 %) образца были отрицательными по данному показателю. У пациентов с зарегистрированным рецидивом заболевания (2-я группа) положительная экспрессия p53 выявлена в 45 (24 %) образцах, что отличается от результатов, полученных в 1-й группе ( $p > 0,05$ ). Сочетанная экспрессия bcl-2 и p53 во 2-й группе была зарегистрирована в 19 % ( $n = 35$ ) образцов.

Экспрессия апоптотического протеина Caspase-3 (до 10 %) была зарегистрирована у 98 % ( $n = 68$ ) пациентов 1-й группы, что свидетельствовало в пользу активного процесса разрушения опухолевых клеток, средний ее показатель составил  $7 \pm 0,1$  %. Во 2-й группе уровень экспрессии данного протеина не превышал в среднем  $1,5 \pm 0,04$  % и был достоверно ниже, чем в группе пациентов без рецидива заболевания ( $p < 0,05$ ).

При проведении вирусологического исследования (real-time ПЦР) в тканях слизистой оболочки полости

рта у здоровых добровольцев EBV выявлен в 20 % образцов (10 человек), HPV 6, 11, 16 и 18-го подтипов (суммарно) – в 40,3 % (20 человек), HSV I и II – в 2 % (1 человек), а CMV не был зарегистрирован ни у одного из обследованных.

Анализ нативной ткани опухоли пациентов 1-й группы показал наибольшее содержание ДНК HPV в 6,8 % образцов, а у пациентов 2-й группы – только в 1,4 % (значимых различий не выявлено).

В опухолевой ткани больных 2-й группы EBV выявлялся достоверно чаще (47 % образцов), чем в 1-й группе, где данный уровень составил только 8 % ( $p < 0,005$ ). А поражение клеток CMV было зарегистрировано только в 3 % образцов пациентов 2-й группы.

### Заключение

Проведенный нами анализ позволил выявить возможные прогностические факторы, оказывающие влияние на риск возникновения рецидивов плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта.

Так, в группе пациентов, у которых был зарегистрирован рецидив опухоли после комплексного лечения (2-я группа), были выявлены такие неблагоприятные факторы прогноза, как изначально высокий уровень РЭА и SCCA и их повышение в динамике, постоянный рост уровня WBC, ANC и PLT в ходе лечения, а также повышение уровня СРБ в динамике (повыше-

ние уровня СРБ в процессе ПХТ может свидетельствовать, кроме того, об отсутствии эффективности применяемой схемы); отсутствие снижения индекса Ki-67 в ходе лечения, низкий уровень Caspase-3, высокий уровень bcl-2 и p53 (при возможной их коэкспрессии), а также наличие в тканях опухоли EBV и CMV.

У пациентов 1-й группы (без рецидива) были отмечены более низкие концентрации РЭА и SCCA на этапах оценки, достоверное снижение уровня СРБ и нахождение его в пределах референсных значений, а также отсутствие роста изучаемых лабораторных показателей. Иммуногистохимически данная группа характеризовалась высоким уровнем Caspase-3, низким уровнем bcl-2 и p53, а также выраженным достоверным снижением индекса Ki-67 на фоне проводимого лечения (даже при изначально высоком его показателе). В вирусологической палитре у больных 1-й группы преобладает HPV всех рассмотренных подтипов.

Таким образом, поиск достоверных прогностических факторов необходим, возможен и целесообразен для оптимизации лечения пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта, поскольку выбор лечебной тактики должен зависеть от прогноза заболевания и выявленных факторов риска развития рецидива. Этот факт побуждает нас продолжать дальнейшее изучение данного вопроса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2007;18 (2).
2. Состояние онкологической помощи населению в 2013 году. Под ред.

- А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» МЗ РФ, 2014.
3. Горбань Н.А., Кудайбергенова А.Г., Панкратов В.А. Прогностическое значение маркеров пролиферативной активности и регуляции апоптоза при плоскоклеточном

раке гортани. Архив патологии 2013;1:3–9.

4. Яковлева Л.П., Кропотов М.А., Матякин Е.Г. и др. Анализ прогностических факторов и выбор тактики лечения при раке слизистой оболочки полости рта. Сибирский онкологический журнал 2010;3(39):83–5.