

*Д.В. БЕРЕЗНЮК, І.С. ШПОНЬКА, С.М. ТИМЧУК,
О.В. КОВТУНЕНКО, О.В. ПОСЛАВСЬКА*

АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ МАТРИЧНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ 1 ТА 9 В ПУХЛИНАХ У ХВОРИХ НА ПЛОСКОКЛІТИННИЙ РАК РОТОВОЇ ЧАСТИНИ ГЛОТКИ

*Каф. оториноларингології (зав. – проф. В.В. Березнюк);
каф. пат. анатомії (зав. – проф. І.С. Шпонька) Дніпропетр. держ. мед. академії*

Захворюваність на рак ротової частини глотки в Україні в 2009 р. становила 4,3 на 100 тис. населення (світовий стандартний показник – 2,9), показник смертності хворих показав 3,2 на 100 тис. населення (світовий стандартний показник – 2,1), а не прожили 1 року з числа вперше захворівших 50,4%. Серед пацієнтів переважають чоловіки працездатного віку – від 40 до 55 років. Повноцінне комбіноване або комплексне лікування отримують 77,5% хворих, і отже, результати лікування хворих вважаються незадовільними. У 71,9% пацієнтів вперше діагностуються розповсюджені стадії захворювання (III-IV ст.). Найбільші темпи зростання захворюваності у чоловічого населення зареєстровано при злоякісних новоутвореннях глотки (6,4%) [6].

В 2007 р. вищий керуючий орган – Всесвітня асамблея охорони здоров'я (World Health Assembly) прийняла резолюцію в зв'язку з розповсюдженістю і неухильною тенденцією до підвищення та омолодження захворюваності на рак ротової порожнини та глотки, яка зобов'язує всі країни – члени ВОЗ внести в свої національні програми дослідження по ранній діагностиці і лікуванню хворих на рак голови та шиї [21, 23]. Впровадження подібної стратегії по скороченню факторів ризику та індивідуалізації схем терапії привело до покращання показників 5-річного виживання хворих на рак гортані, але аналогічні показники у хворих на рак ротової частини глотки не змінились [5, 7]. Особливо насторожує те, що згідно з TNM класифікацією в I-II стадії діагностовано 40,6% нових випадків раку ротової порожнини та 21,1% нових випадків раку глотки, в III ст. – 29,5% та 42,1%, в IV ст. – 18,5% та 29,8%, відповідно. Це призводить до того, що біля 50% пацієнтів не проживає і року з моменту визначення діагнозу [3, 4, 6, 10]. Більше 90% пухлин ротової порожнини та глотки – плоскоклітинний рак (ПР) слизової оболонки, який характеризується раннім розвитком місцевого рецидиву та метастазуванням в лім-

фатичні вузли шиї [2, 12, 20]. Наявність регіонарних метастазів у хворих з пухлинами голови та шиї значно погіршує прогноз лікування та показники виживання [11, 17, 19, 22]. За даними деяких авторів [8], показник 2-річного виживання в групі пацієнтів без метастазів складає 56,8%, а з метастазами у відповідні N₁-N₃ тільки 18,8%, тому вже на етапі діагностики важливо знати ступінь агресивності фенотипу пухлини для можливого попередження рецидивів та метастазів у віддалені органи за рахунок лікувальної тактики.

Матричні металопротеїнази (ММП) – це родина ензимів, що відіграють головну роль в протеолітичній деградації позаклітинного матриксу. Матрична металопротеїназа залучена в реструктурування міжклітинного матриксу при нормальних фізіологічних процесах на зразок розвитку ембріона і підтримки структури тканин. Активність металопротеїнази також відіграє важливу роль при таких хвороботворних процесах, як артрит і метастази. Більшість ММП синтезуються як неактивні пробілки, які активізуються за допомогою позаклітинних протеїназ. ММП₁ деградує колаген типів I, II і III. ММП₁₂ деградує еластини. Активність даних білків може відігравати роль при розвитку емфіземи. Активність ММП₁ підвищується при дії сигаретного диму. Поліморфізм в генах ММП₁ і ММП₁₂ пов'язаний з підвищеним ураженням легенів при курінні і з хронічною обструктивною хворобою легенів [14].

Для багатьох злоякісних новоутворень було відмічено підвищення рівня протеолітичної активності матричних металопротеїназ, яка корелювала з інтенсивністю процесів інвазії та метастазування. За допомогою імуноферментних методів показано, що вміст матричної металопротеїнази 2, 3 і 13 в пухлинах достовірно підвищений у порівнянні з довколишньою гістологічно незміненою слизовою оболонкою в 70-90% хворих на рак. Відомо, що руйнування базальної мембрани, що оточує пухлину, і поза-

клітинного матриксу, який асоціюється з пухлиною, є одним з основних механізмів інвазії, метастазування і неопластогенезу. У цих процесах задіяно декілька класів протеїназ, перш за все, мультигенне сімейство матриксних металопротеїназ, або матриксинів, названих так завдяки їх здатності специфічно гідролізувати всі основні білки позаклітинного матриксу, зокрема колаген. З'являються дані, що свідчать про те, що важливу роль в регуляції зростання і диференціювання пухлинних і нормальних клітин відіграють тканинні інгібітори металопротеїнази, яка має також антиангіогенні властивості. І ті, і інші розглядаються як біологічні маркери прогнозу [11, 13, 16].

Мета дослідження: вивчити рівень експресії маркерів тканинної інвазії ММП₁ та ММП₉ при плоскоклітинному раку у хворих на рак ротової частини глотки для визначення зв'язку між рівнем експресії та метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли ший.

Матеріали та методи

В дослідженні було проаналізовано результати обстеження та лікування 309 пацієнтів з раком ротової частини глотки, які перебували в ЛОР-онкологічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова в період з 2000 по 2008 рр. Виявилося, що при первинному звертанні пацієнтів на ранні стадії T₁-T₂ припадає всього 20,7% (64 пацієнта), а на стадії T₃ – 47,9% (148 пацієнтів) та T₄ – 31,4% (97 пацієнтів), незважаючи на те, що пухлини ротової частини глотки легко візуалізуються. Ці показники узгоджуються з даними інших клінік [6, 8]. Лікування всіх хворих проводилось комбінованим або комплексним методом за стандартами з використанням сучасних методів. Для достовірності виконаного нами дослідження і для однорідності групи були відібрані 62 пацієнта з T₃ (59 чоловіків і 3 жінки), які отримали однакової схеми комбінованого лікування з проведенням внутрішньоартеріальної селективної поліхіміотерапії за схемою РВМФ. Всі хворі були розподілені на 2 групи: 31 з виявленими метастазами в лімфатичні вузли ший (T₃N_{1,3}M₀) та 31 – без метастазів в регіонарні лімфатичні вузли (T₃N₀M₀). Аналіз отриманих даних свідчить про те, що обстежувані групи хворих ідентичні за основними параметрами. Для проведення імуногістохімічного дослідження використовувались формалін-фіксовані парафінові блоки біопсійного матеріалу плоскоклітинного раку ротової частини глотки, первинні поліклональні антитіла до ММП₁ (DakoCytomation) та ММП₉ (DakoCytomation) і система візуалізації EnVision (DakoCytomation). Ідентифікація реак-

цій проводилась за допомогою хромогену DAB. При оцінці експресії маркерів ММП₁ та 9, згідно з рекомендаціям інших авторів [15, 18], використовувався напівкількісний цифровий візуальний аналіз мікрофотографій зрізів в програмі ImageJ (National Institutes of Health), за допомогою якої, на підставі шкали інтенсивності забарвлення в умовних балах, експресія маркерів була розподілена на 4 категорії: негативна, слабка, помірна і висока. Для статистичного аналізу використовувалися сучасні математично-статистичні методи. Обробка отриманих даних проводилась за допомогою пакетів ліцензійних програм статистичного аналізу Statistica v.6.1 (Statsoft Inc., США, ліцензійний №AJAR909E415822FA), Microsoft® Office Excel® 2007 (12.0.6514.5000) SP2 MSO (12.0.6425.1000), (США, ліцензійний №89409-707-9902422-65234) і «Биостатистика» (Москва, 1998).

Результати досліджень

При проведенні дослідження та порівняльного аналізу експресії ММП₁ в групах ПРРЧГ з наявністю метастазів у лімфатичні вузли та без них отримані наступні дані (табл. 1, мал. 1, 2).

Взагалі були отримані тільки негативні (43,5%, n=27) та слабкі (56,5%, n=35) цитоплазматичні реакції. В метастатичних пухлинах негативну реакцію показали 38,7% спостережень (n=12), а в пухлинах з відсутнім метастатичним ураженням лімфатичних вузлів – 48,4% (n=15). Слабка реакція відмічалась в групі з метастазами в 61,3% спостережень (n=19), без метастазів – в 51,6% (n=16). Виявлені відмінності не мали статистичної значимості (p>0,05), достовірного кореляційного зв'язку між цими параметрами також не було. При дослідженні маркеру ММП₁ гіпотезу про однорідність розподілу інтенсивності експресії в групах підтверджено (w = -1,31), що говорить про неможливість використання маркеру ММП₁ для передбачення наявності метастазів в ПРРЧГ.

При проведенні дослідження та порівняльного аналізу експресії ММП₉ в групах ПРРЧГ з наявністю метастазів у лімфатичні вузли та без них отримані наступні дані (табл. 2, мал. 3, 4).

Взагалі були отримані всі варіанти експресії маркеру, окрім негативної реакції. Слабка цитоплазматична реакція відмічалась в 40,3% спостережень (n=25), помірна реакція – в 38,7% (n=24) та висока – в 21,0% (n=13).

При дослідженні експресії ММП₉ в ПРРЧГ по групах залежності від метастазування виявлено суттєві відмінності. При дослідженні маркеру ММП₉ гіпотезу про однорідність розподілу інтенсивності експресії в групах спростовано (w = -3,095), має місце статистично зна-

Експресія ММП1 в ПРРЧГ в залежності від наявності метастазів

Заболівання, супутуючі полипозу носа		Всього (n)	Негативна	Слабка	Помірна	Висока
1. ПРРЧГ з метастазами (T ₃ N ₁₋₃ M ₀)	абс. (n)	31	12	19	0	0
	M±m (%)		38,7±8,7	61,3±8,7	0	0
2. ПРРЧГ без метастазів (T ₃ N ₀ M ₀)	абс. (n)	31	15	16	0	0
	M±m (%)		48,4±9,0	51,6±9,0	0,0+0,2*	0,0+0,2*
P 1-2 груп			=0,447	=0,446		
Всього	абс. (n)	62	27	35	0	
	M±m (%)		43,5±6,3	56,5±6,3	0	0

Примітка: * – показник розрахований з поправкою Йейтса

Таблиця 2

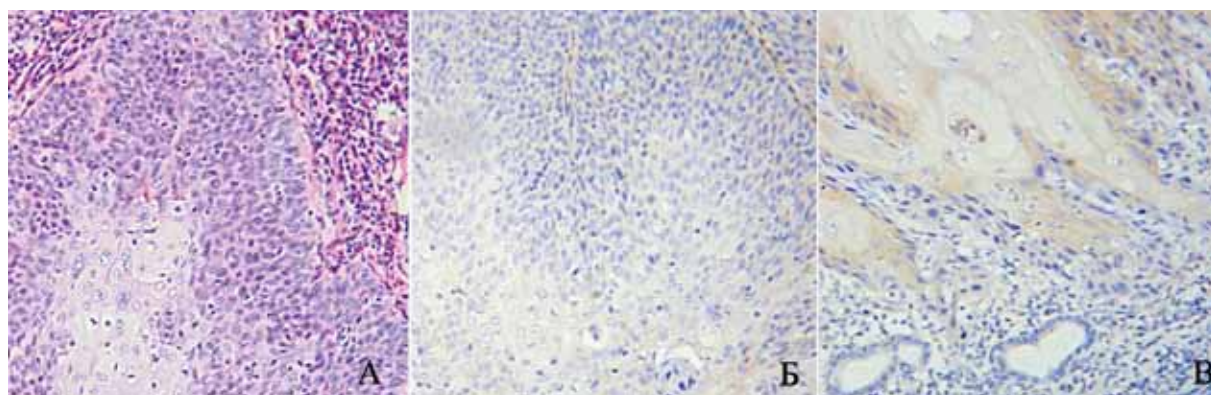
Експресія ММП9 в ПРРЧГ в залежності від наявності метастазів

Обстежувані групи		Всього (n)	Негативна	Слабка	Помірна	Висока
1. ПРРЧГ з метастазами (T ₃ N ₁₋₃ M ₀)	абс. (n)					
	M±m (%)		0,0+0,2*	16,1±6,6	51,6±9,0	32,3±8,4
2. ПРРЧГ без метастазів (T ₃ N ₀ M ₀)	абс. (n)	31	0	20	8	3
	M±m (%)		0,0+0,2*	64,5±8,6	25,8±7,9	9,7±5,3
P груп 1-2				=0,0002	=0,042	=0,044
Всього	абс. (n)	62	0	25	24	13
	M±m (%)		0,0+0,2*	40,3±6,2	38,7±6,2	21,0±5,2

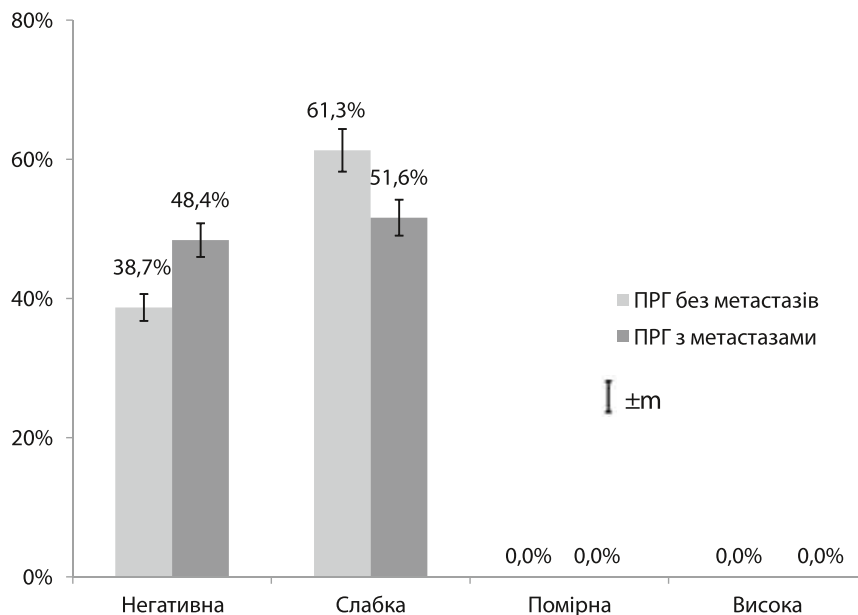
Примітка: * – показник розрахований з поправкою Йейтса

чуща відмінність розподілу експресії ММП₉ в групах з метастазами та без них. Так, при пухлинах з метастазами у лімфатичні вузли слабка реакція ММП₉ спостерігались у 4,0 рази рідше (16,1±6,6%), ніж при відсутності мета-

стазів (64,5±8,6%), а висока, відповідно, частіше у 3,3 рази – 32,3±8,4% при наявності метастазів, а без них – в 9,7±5,3%. Відмінності між групами по всім типам реакцій статистично значущі з $p < 0,001-0,05$ ($r = -0,21$; $ВШ = 3,7$;



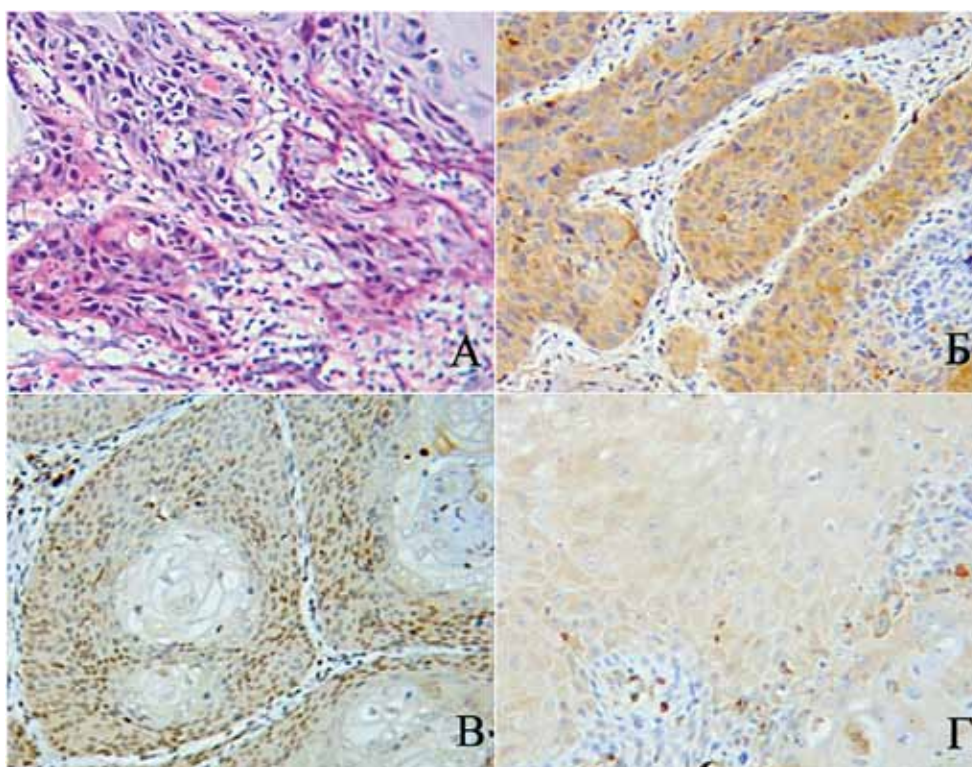
Мал. 1. Неороговілий помірнодиференційований плоскоклітинний рак ротової частини глотки. Забарвлення Г-Е (А). Цитоплазматична реакція з ММП₁: негативна реакція (Б), слабка реакція (В), ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Масра, $\times 200$.



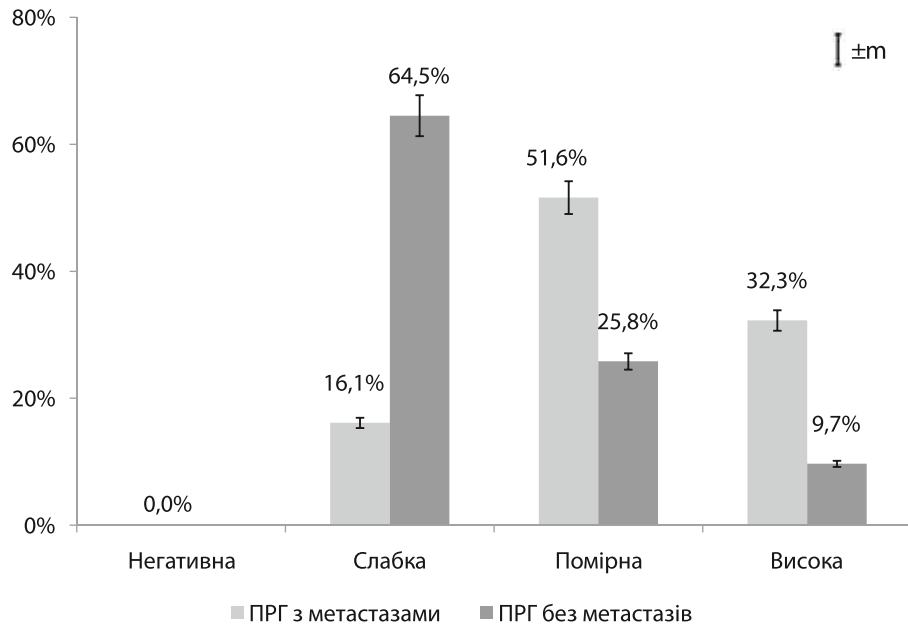
Мал. 2. Порівняння частоти експресії ММП₁ в ПРРЧГ в залежності від наявності метастазів

95% ДІ – 9,7-64,5). Виявлено достовірний зворотний кореляційний зв'язок між цими параметрами. Тобто в пухлинах при зростанні показника експресії ММП₁, зменшується ймовірність наявності метастазів у регіонарні лімфовузли

(в 3,7 рази) і, навпаки, зростає при зменшенні експресії, що дозволяє використовувати результати дослідження ММП₁ для виявлення й підтвердження прихованих метастазів у лімфатичні вузли. Це дає можливість стверджувати, що



Мал. 3. Неороговілий помірно диференційований плоскоклітинний рак ротової частини глотки. Забарвлення Г-Е (А). Цитоплазматична реакція з ММП₁: високий рівень експресії (Б), помірний рівень експресії (Б'), слабкий рівень експресії (Г), ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксином Масра, ×200.



Мал. 4. Порівняння частоти експресії ММП₉ в ПРРЧГ в залежності від наявності метастазів

використання маркера ММП₉ є доречним для передбачення наявності метастазів в ПРРЧГ.

Висновки

Дані дослідження маркера ММП₁ мали однорідність розподілу інтенсивності експресії в групах ($w=1,31$), відмінності не мали статистичної значущості ($p>0,05$), достовірного кореляційного зв'язку між цими параметрами не виявлено, що говорить про неможливість використання маркера ММП₁ для передбачення наявності метастазів у хворих на плоскоклітинний рак ротової частини глотки.

У пацієнтів з плоскоклітинним раком ротової частини глотки без метастазування у регіонарні лімфовузли показники експресії ММП₉ спостерігались частіше у 3,7 рази ніж при наявності метастазів. Прогностичне значення показників експресії ММП₉ відносно метастазування визначено наявністю зворотного кореляційного зв'язку ($r=-0,21$; ВШ=3,7; 95% ДІ – 9,7-64,5; $p<0,001-0,05$).

Для прогнозування розвитку метастазів у хворих на плоскоклітинний рак ротової частини глотки доцільно проведення дослідження експресії ММП₉ імуногістохімічним методом.

1. Аничков Н.М. Новое в учении о метастазировании злокачественных опухолей / Н.М. Аничков // Патология. – 2006. – Т 3, №2. – С. 4-12.
2. Гладылина И.А. Современные подходы к терапии рака ротоглотки / И.А. Гладылина, М.А. Шабанов, М. И. Нечушкин // Практическая онкология – 2003. – Т.4, №1. – С. 45-50. (1).
3. Заболотный, Д.И. Злокачественные опухоли глотки / Д.И. Заболотный // Справочник по онкологии / Под. ред. С.А. Шалимова, Ю.А. Гриневича, Д.В. Мясоедова. – К.: Здоров'я, 2000. – С. 294-300.
4. Лукач, Е.В. Проблеми ЛОР-онкології в Україні [Текст] / Лукач Е.В. // IX з'їздоториноларингологів України: тези доповідей. – Київ, 2000. – С. 272-273.
5. Проценко С.А. Поиски путей индивидуализации противоопухолевой терапии / С.А. Проценко // Практическая онкология – 2007. – Т. 8, №4. – С. 173-181.
6. Рак в Україні, 2008 – 2009. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / Під ред. проф. І. Б. Щепотіна // Бюлетень національного канцер-реєстру України. – Видання № 11. – К., 2010. – 111 с.
7. Соловьев М.М. Рак слизистой оболочки полости рта и языка (резервы улучшения результатов лечения) / М. М. Соловьев // Практическая онкология – 2003. – Т. 4, №1. – С. 31-37.
8. Тактические подходы к лечению регионарных метастазов у больных раком гортани, гортаноглотки, слизистой оболочки полости рта и ротоглотки / А.А. Айдарбекова, В.Л. Любаев, С.И. Ткачев [и др.] // Современ. онкол. – 2006. – Т. 8, №3. – С. 110-115.
9. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the In-

- ternational Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium / M. Hashibe, P. Brennan, S. Benhamou [et al.] // J. Natl Cancer Inst. – 2007. – Vol. 99, № 10. – P. 777-789.
10. Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery / I.M. Agra, A.L. Carvalho, C.A. Pinto [et al.] // Arch otolaryngol head neck. – 2008. – Vol. 134, № 7. – P. 743-749.
 11. Boscolo-Rizzo P. Carcinoma metastatic to cervical lymph nodes from an occult primary tumor: the outcome after combined-modality therapy / P. Boscolo-Rizzo, A. Gava, M.C. Da Mosto // Ann surg oncol. – 2007. – Vol. 14, № 5. – P. 1575-1582.
 12. Cardesa A. Pathology of the Head and Neck / A. Cardesa, P.J. Slootweg. – Berlin: Springer, 2006. – 316 p.
 13. Cell cycle dysregulation in oral cancer / R. Todd, P. W. Hinds, K. Munger [et al.] // Crit rev oral biol med. – 2002. – Vol. 13, № 1. – P. 51-61.
 14. Choi S. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy / S. Choi, J.N. Myers // Dentres. – 2008. – Vol. 87, № 1. – P. 14-32.
 15. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression / S.H. Kim, N.H. Cho, K. Kim [et al.] // J. Surg. Oncol. – 2006. – Vol. 93, № 4. – P. 330-337.
 16. Da Mosto M. C. Pattern of lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the tonsil: implication for selective neck dissection / M. C. Da Mosto, F. Zanetti, P. Boscolo-Rizzo // Oral oncol. – 2009. – Vol. 45, № 3. – P. 212-217.
 17. Daisuke Sano. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue / Daisuke Sano, Jeffrey N. Myers // Cancer metastasis rev. – 2007. – Vol. 26, № 3-4. – P. 645-662.
 18. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis / Akihiro Katayama, Nobuyuki Bandoh, Kan Kishibe [et al.] // Clinical cancer research. – 2004. – Vol. 10. – P. 634-640.
 19. Metastatic tumours to the oral cavity – pathogenesis and analysis of 673 cases / A. Hirshberg, A. Shnaiderman-Shapiro, I. Kaplan [et al.] // Oral oncol. – 2008. – Vol. 44, № 8. – P. 743-752.
 20. Perez-Ordóñez B. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck / B. Perez-Ordóñez, M. Beauchemin, R.C. Jordan [et al.] // J. Clin. pathol. – 2006. – Vol. 59. – P. 445-453.
 21. Petersen P.E. Global policy for improvement of oral health in the 21st century – implications to oral health research of World Health Assembly 2007, World Health Organization // Community dentistry and oral epidemiology. – 2009. – Vol. 37, № 1. – P. 1-8.
 22. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue / H. Keski-Säntti, T. Atula, J. Tikka [et al.] // Oral oncol. – 2007. – Vol. 43, № 10. – P. 1007-1013.
 23. World Health Organization of tumours. pathology and genetics of head and neck tumours / L. Barnes, J. Eveson, P. Richard [et al.]. – Lyon, France: IARC Press, 2005. – 430 p.

Надійшла до редакції 07.06.11.

© Д.В. Березнюк, І.С. Шпонько, С.М. Тимчук, О.В. Ковтуненко, О.В. Пославська, 2011

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МАТРИЧНЫХ
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 1 И 9 В ОПУХОЛЯХ
У БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ
РОТОВОЙ ЧАСТИ ГЛОТКИ**

*Березнюк Д.В., Шпонько И.С., Тимчук С.М.,
Ковтуненко А.В., Пославская А.В. (Днепропетровск)*

Резюме

Работа посвящена исследованию уровня экспрессии маркеров тканевой инвазии MMP₁ и MMP₉ у больных плоскоклеточным раком ротовой части глотки для определения связи между уровнем экспрессии и метастазированием в регионарные лимфатические узлы шеи. Прогностическое значение показателей экспрессии MMP₉ относительно метастазирования определено наличием обратной корреляционной связи ($r = -0,21$; $p < 0,001-0,05$), показана целесообразность их определения у пациентов с плоскоклеточным раком ротовой части глотки. Полученные результаты экспрессии маркера MMP₁ не имели статистической значимости ($p > 0,05$), что говорит о невозможности использования маркера для предсказания наличия метастазов у больных плоскоклеточным раком ротовой части глотки.

**ANALYSIS OF EXPRESSION
OF MATRIX METALLOPROTEINASES 1 AND 9
IN TUMOURS FOR PATIENTS BY
PLANOCELLULAR CANCER OF PHARYNX**

*Bereznyuk V.V., Shponka I.S., Timchuk S.M.,
Kovtunencko O.V., Poslavska O.V. (Dnepropetrovsk)*

Summary

Work is devoted to research of level of expression of markers of tissue invasion of MMP₁ and MMP₉ for patients by the planocellular cancer of pharynx for determination of connection between the level of expression and metastases. Prognostic value of indexes of expression of MMP₉ in relation to an innidiation certainly by the presence of cross-correlation feed-back ($r = -0,21$; $p < 0,001-0,05$), research expedience is rotined for patients by the planocellular cancer of pharynx. The got results of expression of marker of MMP₁ did not have statistical meaningfulness ($p > 0,05$), that talks about impossibility of the use of marker for the prediction of presence of metastases for patients the planocellular cancer of pharynx.