

*На правах рукописи*



**Савенкова Ольга Владимировна**

**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ  
МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ  
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ**

**14.01.12 – онкология**

**03.03.04 — гистология, цитология, клеточная биология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Томск – 2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский научно-исследовательский институт онкологии»

**Научные руководители:** Перельмутер Владимир Михайлович,  
доктор медицинских наук, профессор

Чойнзонов Евгений Лхамацыренович, доктор  
медицинских наук, профессор, академик РАН

**Официальные оппоненты:** Суходоло Ирина Владимировна, доктор ме-  
дицинских наук, профессор,  
Государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального об-  
разования «Сибирский государственный ме-  
дицинский университет» Минздрава России,  
заведующая кафедрой морфологии и общей  
патологии

Зуков Руслан Александрович, кандидат меди-  
цинских наук, доцент, Государственное бюд-  
жетное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Краснояр-  
ский государственный медицинский универ-  
ситет имени профессора В.Ф.Войно-  
Ясенецкого» Минздрава России, заведующий  
кафедрой онкологии и лучевой терапии с  
курсом ПО

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина»,  
г. Москва

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_ часов на заседании  
диссертационного совета Д 001.032.01 при Федеральном государственном бюд-  
жетном научном учреждении «Томский научно-исследовательский институт он-  
кологии» (634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Томского НИИ он-  
кологии», [www.oncology.tomsk.ru](http://www.oncology.tomsk.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор



Фролова И.Г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Доля рака гортани среди опухолей верхних дыхательных путей равна 65–70 % (Писарева Л.Ф., 2003, Решетов И.В. с соавт., 2005, Жуйкова Л.Д., 2011, Джафаров К.Г. с соавт., 2014, Allam E., 2011). Удельный вес этой патологии в структуре онкологической заболеваемости составляет 2 % в мужской популяции и 0,3 % в женской. Чаще раком гортани страдают мужчины в работоспособном возрасте. Среди впервые выявленных больных раком гортани I–II стадия регистрируется в 33,7 % случаев, III стадия – в 48,4 % и IV стадия – у 17,9 % больных. Локализация опухолевого процесса в пределах гортани имеет свои особенности. Наиболее часто (56,1 %) при раке гортани поражается надскладочный отдел, складочный отдел – в 41,4 % и в 2,5 % случаев – подскладочный (Пачес А.И., 2000). Поиск новых прогностических маркеров, определяющих характер и темп опухолевой прогрессии, включая вероятность метастазирования, является одной из важных задач современной онкологии (Чиссов В.И. с соавт., 2000, Ольшанский В.О., 2001, Чойнзонов Е.Л. с соавт., 2013, Vajracharya D. et al., 2014).

При инвазивном росте опухоли и её метастазировании ключевую роль играет взаимодействие клеток опухоли и стромы (David H. 2005, Condeelis J. et al., 2006, Del Casar J.M. 2009, Escaff S. et al., 2011, Fan H.X., 2012). Опухолевые клетки продуцируют ферменты – металлозависимые протеиназы, которые разрушают экстрацеллюлярный матрикс, базальные мембраны, стенки кровеносных и лимфатических сосудов. Регуляция экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП) происходит на трех уровнях: при изменении экспрессии гена, путем активации латентных зимогенов или при ингибции тканевыми ингибиторами (Соловьева Н.И., 2000). В нормальных условиях ММП содержатся в тканях в незначительных количествах в везикулах размером 300–600 нм, которые локализованы вблизи плазматической мембраны клетки. В норме миграция везикул из клетки происходит в ответ на специфические ангиогенные стимулы и лишь на определенном участке клеточной мембраны, а в клетках опухоли непрерывно и по всей поверхности клетки (Соловьева Н.И., 2000, 2004, Снарская Е.С., 2005). Металлопротеиназы способны индуцировать ангиогенез путем расщепления экстрацеллюлярного матрикса (Соловьева Н.И., 2000, Danilewicz M., 2003). Тканевые ингибиторы ММП играют роль регуляторов активности ММП (Christopoulos T.A., 2007, Groblewska M., 2012). При прогрессировании плоскоклеточного рака отмечали гиперэкспрессию ММП2 и 9 в зоне инвазии опухоли (Bordador L.C., 2000, Ondruschka C., 2003). По данным Ishibashi Y. et al. (2004), CD147 экспрессировался в злокачественных и диспластически измененных тканях, но не в нормальной слизистой гортани, а экспрессия ММП2 наблюдалась в нормальных фибробластах и лишь в некоторых случаях в клетках плоскоклеточного рака.

В доступной литературе крайне скудны сведения об экспрессии металлопротеиназ опухолевыми структурами разного строения при плоскоклеточном раке гортани, а также стромальными элементами опухоли и о значимости такой экспрессии в распространенности и лимфогенном метастазировании.

### **Цель исследования**

Целью настоящей работы является изучение прогностического значения гетерогенности экспрессии матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов клеточными элементами опухоли и стромы у больных раком гортани.

### **Задачи исследования**

1. Оценить экспрессию ММП1, ММП2, ММП9 и тканевых ингибиторов TIMP1, TIMP2 и CD147 (EMMPRIN) в различных тканевых структурах рака гортани.
2. Оценить экспрессию ММП1, ММП2, ММП9 и тканевых ингибиторов TIMP1, TIMP2 и CD147 (EMMPRIN) в стромальных элементах опухоли.
3. Сравнить экспрессию ММП, их тканевых ингибиторов и клинико-морфологические показатели течения опухолевого процесса.
4. Определить экспрессию CD31 как маркера ангиогенеза в опухолевой ткани и выявить связь с экспрессией металлопротеиназ, их ингибиторов и активатора.
5. Определить значимые маркеры, связанные с регионарным метастазированием рака гортани.

### **Научная новизна работы**

Впервые обнаружено, что при плоскоклеточном раке гортани экспрессия металлопротеиназ, индуктора синтеза и ингибиторов их активности зависит от степени дифференцировки опухолевых структур и наиболее выражена в дискретных опухолевых клетках. Гетерогенность экспрессии металлопротеиназ в плоскоклеточном раке гортани подчеркивается ее изменением после неoadьювантной терапии. Она подчиняется «правилу исходного уровня»: экспрессия повышается в высокодифференцированных структурах, где исходно она была низкой, и снижается в низкодифференцированных, где она была высокой.

Впервые показано, что распространенность плоскоклеточного рака гортани независимо от локализации опухоли выражена в большей степени, если опухоль имеет выраженный гетерогенный характер: построена структурами высокой и низкой степени дифференцировки. Причем распространенность таких опухолей связана в большей степени не с экспрессией металлопротеиназ клетками опухоли, а с экспрессией ММП2 в мононуклеарных лейкоцитах и фибробластах.

Впервые обнаружено, что лимфогенное метастазирование плоскоклеточного рака гортани независимо от локализации опухоли сопряжено с экспрессией ММП9 в более дифференцированных опухолевых структурах 1, 2 и 3-го типов.

Впервые установлено, что более частое лимфогенное метастазирование плоскоклеточных карцином, располагающихся преимущественно в надскладочном отделе гортани, в сравнении с опухолями голосовых складок связано с наличием высоко- и низкодифференцированных структур. Причем это сопряжено с более выраженной экспрессией ММП9 в сегментоядерных лейкоцитах, инфильтрирующих строму.

Впервые обнаружено: при опухолях смешанного строения с наличием высоко- и низкодифференцированных структур, локализующихся в надскладочной области гортани, неoadьювантная терапия оказывается эффективной в отношении реализации лимфогенных метастазов.

Впервые показано, что опухолевые структуры низкой дифференцировки в опухолях в группе с лимфогенными метастазами обладают выраженной чувствительностью к неoadьювантной терапии.

### **Практическая значимость**

Для определения прогностической значимости экспрессии металлопротеиназ, прежде всего ММП2 и ММП9, а также молекул, регулирующих их экспрессию и активность, необходимо учитывать гетерогенность морфологического строения плоскоклеточного рака гортани и оценивать экспрессию металлопротеиназ раздельно в разных морфологических структурах опухоли.

Для оценки распространенности плоскоклеточного рака гортани и риска лимфогенного метастазирования целесообразно определять экспрессию металлопротеиназ не только клетками опухоли, но и нейтрофильными и мононуклеарными лейкоцитами и фибробластами.

Необходимо учитывать, что частота лимфогенного метастазирования плоскоклеточного рака гортани зависит от локализации опухоли и от принадлежности к трем группам, выделенным нами по характеру дифференцировки и гетерогенности. Это опухоли с преимущественно высоко- или низкодифференцированными структурами, а также наиболее гетерогенные опухоли с сочетанием высоко- и низкодифференцированных структур. Опухоли третьей группы при локализации в надскладочной области имеют высокую частоту лимфогенного метастазирования, а при локализации на голосовых связках – минимальный риск метастатического поражения лимфоузлов.

Неoadьювантная терапия опухолей третьей группы с локализацией в надскладочной области может быть эффективной в отношении лимфогенных метастазов.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. При плоскоклеточном раке гортани экспрессия металлопротеиназ, индуктора синтеза и ингибиторов их активности характеризуется выраженной внутриопухолевой гетерогенностью, зависимой от типа опухолевых структур, различающихся степенью дифференцировки, и максимальна в дискретных опухолевых клетках. Влияние предоперационной терапии на экспрессию металлопротеиназ подчиняется «правилу исходного уровня»: экспрессия повышается в высокодифференцированных структурах, где исходно она была низкой, и снижается в низкодифференцированных, где она была высокой.

2. Лимфогенное метастазирование сопряжено с экспрессией ММП9 в более дифференцированных опухолевых структурах 1, 2 и 3-го типов. Значительно большая частота лимфогенного метастазирования карцином надскладочной области в сравнении с опухолями голосовых связок связана с опухолями, построенными высоко- и низкодифференцированными структурами, и более выраженной экспрессией ММП9 в сегментоядерных лейкоцитах, инфильтрирующих строму.

3. При плоскоклеточных карциномах надскладочной области гетерогенного строения с сочетанием высоко- и низкодифференцированных структур неoadьювантная терапия уменьшает частоту реализации лимфогенных метастазов. Структуры низкой дифференцировки в опухолях с лимфогенными метастазами встре-

чаются значительно реже после неoadьювантной терапии и, по видимому, являются более чувствительными к предоперационной терапии.

### **Апробация диссертации**

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН, «Современная онкология: достижения и перспективы развития», 10–11 сентября 2009 года; на шестой Российской конференции по фундаментальной онкологии в 2010 году; конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева, «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» в 2007, 2009 и 2010 годах, Томск.

### **Внедрение результатов исследования**

Обнаруженные морфологические прогностические критерии лимфогенного метастазирования плоскоклеточного рака гортани внедрены в практику работы отделения патологической анатомии и цитологии, отделения опухолей головы и шеи Томского НИИ онкологии, а также используются в преподавании раздела «Эпителиальные злокачественные опухоли» на кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

### **Личный вклад автора в получение новых результатов исследования**

Автором проанализированы клинические данные по теме диссертации, выполнены морфологические исследования первичной карциномы гортани и удаленных лимфатических узлов. Проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии металлопротеиназ, их ингибиторов и индуктора синтеза ферментов CD147. Создана электронная база данных клинических, гистологических и иммуногистохимических исследований. Результаты подвергнуты статистической обработке. Самостоятельно проанализированы результаты работы, сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту.

### **Публикации**

По теме проведенного исследования опубликовано 15 печатных работ, отражающих основные положения диссертации, из них 6 журнальных статей в рекомендованных ВАК изданиях.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, главы о материалах и методах исследования, результатах собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и приложение. Работа иллюстрирована 37 таблицами (в том числе в приложении 21) и 10 рисунками. Список литературы содержит 252 источника, из них 80 отечественных и 172 зарубежных.

### **Материалы и методы исследования**

#### *Материалы исследования*

В исследование были включены 82 больных плоскоклеточным раком гортани T1-4N0-3M0 в возрасте от 32 до 75 лет, проходивших лечение в отделении

опухолей головы и шеи Томского НИИ онкологии. Исследовался операционный материал, полученный при выполнении ларингэктомии или резекции гортани.

По гистологическому типу основную группу составляли пациенты с умеренно дифференцированным плоскоклеточным раком – 43 (54,43 %). Высокодифференцированный плоскоклеточный рак был определен в 19 случаях (24,05 %), низкодифференцированный рак – в 17 случаях (21,51 %). Регионарное метастазирование отмечалось в 36,7 % случаев (29 пациентов), в 63,3 % случаев (50 пациентов) регионарные лимфоузлы были интактны.

Пациенты были разделены на две группы. Первая группа – больные, которым проводилась неoadъювантная терапия, вторая группа – больные, которым лечение на предоперационном этапе не проводилось.

В первой группе 24 пациента (из них 23 мужчины и одна женщина) в предоперационном периоде получали химиолучевую терапию. Средний возраст пациентов составил  $57,2 \pm 8,7$  лет.

Во второй группе было 55 человек (из них 54 мужчины и одна женщина). Данным больным в послеоперационном периоде проводилась лучевая терапия. Средний возраст пациентов составил  $57,7 \pm 7,8$  лет. Анализировались первичные документы – истории болезни и амбулаторные карты.

Больным, включенным в первую группу, проводились 2 курса неoadъювантной химиотерапии с интервалом 3–4 недели по схеме паклитаксел  $175 \text{ мг/м}^2$ , карбоплатин АУС-6 с последующей лучевой терапией в режиме мультифракционирования дозы по 1,3 Гр 2 раза в день с интервалами в 4 ч, с оценкой эффекта на суммарной очаговой дозе (СОД) 40 Гр по изоэффекту. Пациентам, эффект лечения которых был оценен как частичная регрессия или стабилизация, выполнялось хирургическое вмешательство.

Дистанционная лучевая терапия выполнялась на гамма-терапевтическом аппарате Theratron с использованием системы планирования облучения.

Радикальное хирургическое вмешательство – ларингэктомия, и органосохраняющее – резекция гортани, выполнялись по общепринятым методикам, описанным в монографии А.И. Пачеса (2000). Оперативные вмешательства проводили под эндотрахеальным наркозом, интубация осуществлялась через предварительно выполненную трахеостому.

Больным второй группы проводилась лучевая терапия разовой очаговой дозой (РОД) 2,0 Гр 5 раз в неделю до СОД = 40,0 Гр в послеоперационном периоде на зону регионарного метастазирования.

Распределение пациентов по стадиям заболевания представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Стадирование больных раком гортани по системе TNM

Стадия заболевания	Количество больных	
	абс. ч.	%
I стадия (T1N0M0)	2	2,53
II стадия (T2N0M0)	17	21,51
III стадия (T3N0M0; T3N1M0)	51	64,5
IV стадия (T4N0M0; T4N1-3M0)	9	11,39
Всего	79	100

Опухоли надскладочной области гортани и складочного отдела были представлены практически в равных долях (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение больных в зависимости от преимущественного поражения отдела гортани

Локализация опухоли	Количество больных	
	абс. ч.	%
Преимущественно надскладочный отдел	41	50
Преимущественно складочный отдел	38	46,3
Подскладочный отдел	3	3,7
Всего	82	100

Исследовался операционный материал, полученный при ларингэктомии или резекции гортани.

Клиническая классификация опухолей гортани по стадиям проведена по системе TNM (Пачес А.И., 2000).

#### *Методы исследования*

Выполнялось морфологическое изучение операционного материала. Микроскопической оценке подвергалась ткань опухоли. Материал фиксировался в 10 % растворе нейтрального формалина. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной методике. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином и подвергались световой микроскопии.

Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартной методике (Франк Г.А. с соавт., 2009).

Для исследования использовались мышиные антитела для парафиновых блоков фирмы «Новокастра»: ММП1 (NCL–MMP1, рабочее разведение 1:5 – 1:20); ММП9 (NCL–MMP9, рабочее разведение 1:40); ТИМП1 (NCL–TIMP1-485, рабочее разведение 1:200); ММП2 (NCL–MMP2-507, рабочее разведение 1:40 – 1:80); ТИМП2 (NCL–TIMP2-487, рабочее разведение 1:20), CD 147 (NCL – CD147, рабочее разведение 1:40); CD 31 (NCL – CD31 – 1A10, рабочее разведение 1:100). Использовали высокочувствительную полимерную систему визуализации производства фирмы BioGenex, в качестве хромогена применяли диаминобензидин (ДАБ).

Количество сосудов определялось по экспрессии CD31. Плотность сосудов учитывалась полуколичественным методом, при этом выделяли степени васкуляризации: 1 – слабая (единичные сосуды), 2 – умеренная (до 5 сосудов в поле зрения), 3 – выраженная (в каждом поле зрения более 5 сосудов). Сосудистая сеть оценивалась при увеличении x200.

Экспрессия исследуемых маркеров оценивалась как отрицательная, слабая, умеренная и выраженная в опухолевых структурах 1–5-го типа и в поверхностном многослойном плоском эпителии.

Для определения экспрессии маркеров в опухоли морфологически было выделено 5 типов структур: 1-й тип – структуры с ороговением в центре (формирующие жемчужины); 2-й – состоящие из атипических клеток шиповатого вида; 3-й – состоящие из атипических базальных клеток – базалиоидный тип; 4-й –



структуры, состоящие из низкодифференцированных клеток; 5-й – комплексы опухолевых клеток и поверхностный многослойный плоский эпителий.

Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ Statistica 6.0 for Windows. Применялся дисперсионный анализ, критерий  $\chi^2$ , тест Краскела – Уоллиса, тест Манна – Уитни. Обсуждались результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$  и с тенденцией к различиям при  $p < 0,1$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с рекомендациями ВОЗ (2005) плоскоклеточный рак гортани делят на высоко-, умеренно- и низкодифференцированный. Согласно описанию высокодифференцированные опухоли цитологически напоминают нормальный эпителий. Опухоли с умеренной дифференцировкой отличаются отчетливым ядерным полиморфизмом и менее выраженной кератинизацией. При низкой степени дифференцировки преобладают незрелые атипичные клетки, много нормальных и атипических митозов. Считается, что степень кератинизации, как и уровень дифференцировки опухоли, не имеет существенного прогностического значения. В противоположность этому полагают, что большее значение для прогноза имеет оценка инвазивного фронта опухоли. Если инвазивный фронт «экспансивный», с крупными гнездами опухолевых клеток и сдавлением края опухоли, то прогноз более благоприятен. Когда инвазивный фронт «инфильтративный» и представлен тяжами или отдельными опухолевыми клетками, то прогноз менее благоприятен (Barnes L. et al., 2005).

Однако оценка степени дифференцировки опухоли нередко вызывает затруднения, поскольку в части случаев наблюдается сочетание структур высокой и низкой дифференцировки. Столь же трудно в большинстве случаев оценить вариант инвазивного фронта опухоли, поскольку мелкие группы, тяжи и отдельные опухолевые клетки располагаются не только на границе с окружающей тканью, но и «внутри» опухоли среди более дифференцированных структур.

Плоскоклеточный рак гортани характеризуется выраженной гетерогенностью морфологического строения. Систематизация результатов оценки гетерогенности морфологического строения плоскоклеточных карцином позволила выделить структуры с ороговением (1-й тип), с клетками базалоидного и шиповатого типа без ороговения (2-й тип), с клетками базалоидного типа (3-й тип), структуры с выраженным клеточным полиморфизмом (4-й тип) и одиночные опухолевые клетки (5-й тип). Структуры 1-го и 2-го типа являются высокодифференцированными, в то время как структуры 3, 4 и 5-го типа можно рассматривать как низкодифференцированные. Причем уменьшение степени дифференцировки нарастает от структуры 3-го типа к структуре 5-го типа.

Мы обнаружили гетерогенный характер экспрессии металлопротеиназ в плоскоклеточных карциномах гортани. Выраженность экспрессии металлопротеиназ, индуктора их синтеза и ингибиторов этих ферментов зависела от степени дифференцировки опухолевых клеток, строящих разные структуры. В отличие от высокодифференцированных структур, структуры 5-го типа – разрозненные опухолевые клетки, в наибольшей степени соответствующие инвазивному морфологическому фенотипу, демонстрировали наиболее выраженную экспрессию

ММП1, ММП2, ММП9 и ТИМП2, которые, как известно, играют существенную роль в мезенхимном варианте инвазивного роста изолированных клеток (рисунок 1) (Friedl P. et al., 2011, Shuman Moss L.A. et al., 2012).

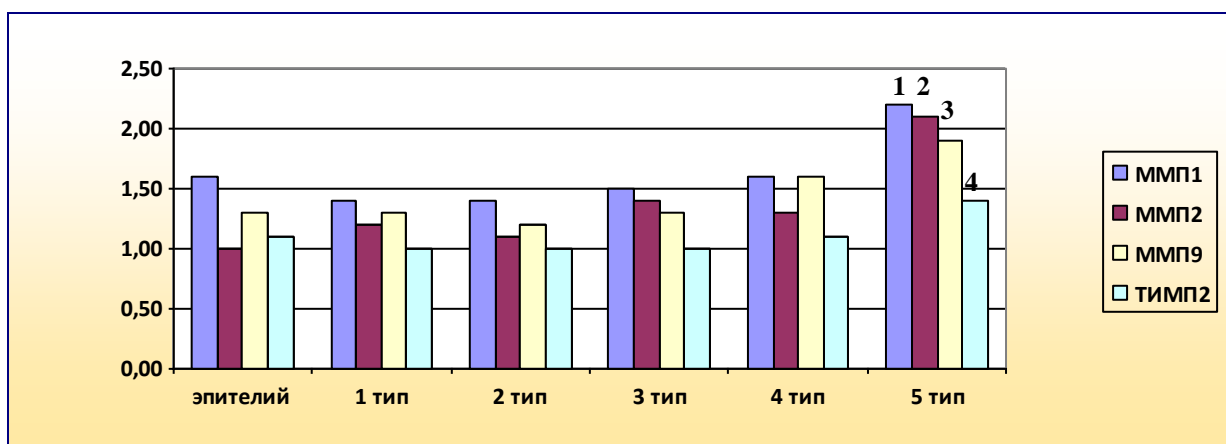


Рисунок 1 – Экспрессия металлопротеиназ и их ингибиторов в разных структурах плоскоклеточного рака гортани:

различия со значениями  $p < 0,05$  по отношению: 1 (ММП1) – к норм. эпит. и структурам 1–4-го типа; 2 (ММП2) – к норм. эпит. и структурам 1–4-го типа; 3 (ММП9) – к норм. эпит. и структурам 1–3-го типа; 4 (ТИМП2) – к структурам 1–3-го типа

Влияние предоперационной химиотерапии на экспрессию металлопротеиназ и их ингибиторов, по-видимому, подчиняется «правилу исходного уровня» (Лейтес С.М., 1977). В соответствии с ним при воздействии адаптогенных или стрессорных факторов средней силы слабая активность (экспрессия) какого-либо фактора стимулируется, исходно выраженная активность, наоборот, снижается. Именно такие изменения мы наблюдали после проведения предоперационной терапии: в высокодифференцированных структурах 1-го и 2-го типа, как и в нормальном плоском эпителии, происходило усиление изначально низкой экспрессии металлопротеиназ, в наименее дифференцированных структурах 5-го типа – уменьшение экспрессии изначально высокого уровня ферментов.

Предоперационное лечение привело к увеличению экспрессии ММП9 в поверхностном эпителии (с  $1,3 \pm 0,4$  до  $2,1 \pm 0,9$ ;  $p=0,0075$ ), в структурах 1-го типа (с  $1,3 \pm 0,6$  до  $1,6 \pm 0,7$ ;  $p=0,04$ ) и в структурах 2-го типа (с  $1,2 \pm 0,5$  до  $1,6 \pm 0,7$ ;  $p=0,004$ ). В противоположность этому в структурах 5-го типа произошло уменьшение экспрессии ММП1 (с  $2,2 \pm 0,9$  до  $1,3 \pm 0,5$ ;  $p=0,1$ ) и отмечалась тенденция к уменьшению ММП2 (с  $2,1 \pm 1,3$  до  $1,5 \pm 0,8$ ;  $p=0,0075$ ). За счет этих изменений после химиотерапии исчезли какие-либо различия в экспрессии металлопротеиназ и их ингибиторов в нормальном эпителии и опухолевых клетках разных структур. Экспрессия CD147 в цитоплазме опухолевых клетках разных структур была умеренно выраженной и оставалась таковой после предоперационной терапии.

Гетерогенность экспрессии металлопротеиназ проявилась относительно ангиогенеза в опухолях. Оказалось, что имеется прямая связь между количеством микрососудов и экспрессией CD147 опухолевыми клетками 1-го типа структур

( $r=0,42$ ;  $p=0,006$ ), а также с экспрессией ТИМП2 клетками 3-го типа структур ( $r=0,35$ ;  $p=0,036$ ). В литературе имеются данные, что MMP9 вместе с другими факторами сопряжены с промоцией ангиогенеза (Gregory A.D., 2011).

Гетерогенность морфологического строения опухоли проявляется сочетанием структур разной степени дифференцировки. В связи с этим целесообразно разделение плоскоклеточных карцином гортани на три типа в зависимости от варианта сочетающихся структур. Результаты исследования показали, что чаще встречаются опухоли смешанного строения при локализации как преимущественно в надскладочном пространстве, так и в зоне голосовых связок. Опухоли, образованные низкокодифференцированными структурами, чаще (на уровне тенденции) встречаются в надскладочном пространстве (таблица 3).

Таблица 3 – Типы плоскоклеточных карцином гортани в зависимости от сочетания опухолевых структур у больных без предоперационного лечения

Локализация опухоли		Степень дифференцировки опухолевых структур		
		высокая	низкая	высокая и низкая
Надскладочное пространство	1	5/32 (15 %)	10/32 (32 %) $p_2=0,068$	17/32 (53 %) $p_2=0,14$
Голосовые складки	2	4/22 (18 %)	3/22 (14 %)	15/22 (68 %)

Примечание:  $p$  – показатель достоверности различий между группами

В чем могут состоять различия трех вариантов плоскоклеточных карцином? Обладают ли опухолевые клетки, строящие одинаковые структуры в опухолях «мономорфного» по дифференцировке или смешанного типа одинаковыми или разными свойствами? Оказалось, что опухоли смешанного строения не идентичны ни высококодифференцированным (со структурами 1-го и/или 2-го типа), ни низкокодифференцированным (с сочетанием структур 3-го, и/или 4-го, и/или 5-го типа) карциномам. Различия проявились в выраженности васкуляризации опухоли, определяемой по экспрессии CD31 (таблица 4).

Таблица 4 – Взаимосвязь варианта сочетания структур опухоли разной степени дифференцировки с количеством сосудов в новообразовании при раке гортани без предоперационного лечения

Вариант сочетания структур разной степени дифференцировки	Группа	Плотность сосудов, $M \pm S.D.$
Высокодифференцированные	1	$1,4 \pm 0,7$ (n=8)
Низкодифференцированные	2	$1,7 \pm 0,4$ (n=12) $p_1=0,12$ $p_3=0,002$
Высоко- и низкокодифференцированные	3	$1,3 \pm 0,4$ (n=35)

Примечание:  $p$  – показатель достоверности различий между группами

Исследования показали, что неoadъювантная терапия привела к значительному уменьшению количества сосудов в опухолях с низкодифференцированными структурами. Напротив, в опухолях со смешанным строением и в чисто высокодифференцированных опухолях эффекта предоперационной терапии по отношению к исходному количеству сосудов не было. Этот результат подчеркивает существенные различия опухолей относительно гомогенного по морфологии и гетерогенного строения и целесообразность предлагаемого методического подхода при изучении плоскоклеточных карцином гортани (таблица 5).

Таблица 5 – Взаимосвязь варианта сочетания структур опухоли разной степени дифференцировки с количеством сосудов в новообразовании при раке гортани после лечения

Вариант сочетания структур разной степени дифференцировки	Группа	Плотность сосудов, $M \pm S.D.$
Высокодифференцированные	1	$1,7 \pm 0,8$ (n=12) $p_2=0,05$ $p_3=0,01$
Низкодифференцированные	2	$1,0 \pm 0,0$ (n=7)
Высоко- и низкодифференцированные	3	$1,2 \pm 0,5$ (n=26)

Примечание: p – показатель достоверности различий между группами

Между степенью дифференцировки опухоли, определяемой в соответствии с критериями ВОЗ, и экспрессией металлопротеиназ и их ингибиторов не выявлено однонаправленных связей. При оценке экспрессии металлопротеиназ в разных структурах обнаружено, что в низкодифференцированных опухолях экспрессия ММП2 максимальна в структурах 3-го типа, ТИМП2 – в структурах 1, 2 и 3-го типа (рисунок 2).

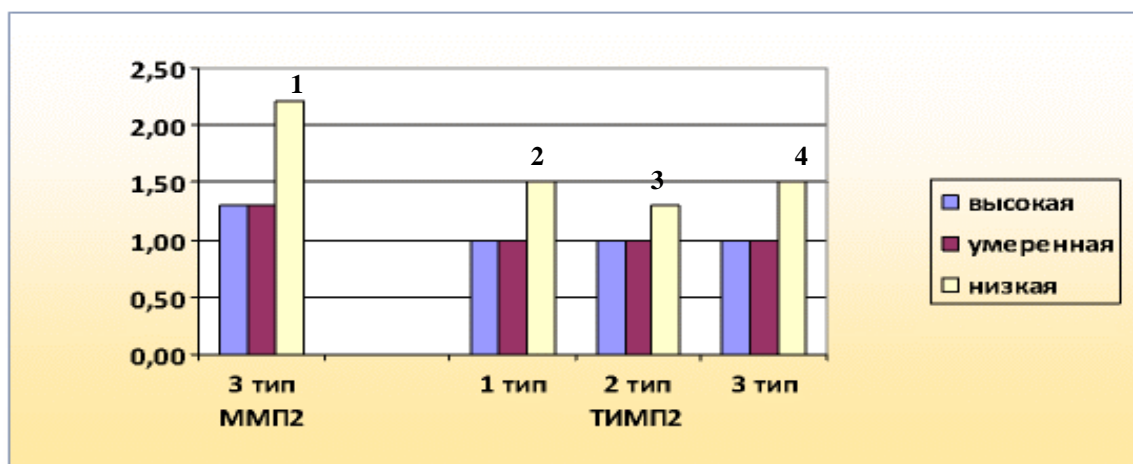


Рисунок 2 – Выраженность экспрессии ММП2 и ТИМП2 (по оси ординат) в разных структурах плоскоклеточного рака гортани в зависимости от степени дифференцировки опухоли: 1 –  $F=3,6$ ;  $p=0,037$ ; 2 –  $F=18,5$ ;  $p=0,0000$ ; 3 –  $F=9,5$ ;  $p=0,0004$ ; 4 –  $F=15,1$ ;  $p=0,0000$

Все это свидетельствует, что экспрессия некоторых металлопротеиназ и их ингибиторов в одних и тех же структурах зависит от степени дифференцировки опухоли.

Экспрессия металлопротеиназ, их ингибиторов и индуктора синтеза металлопротеиназ CD147 не одинакова в клеточных элементах, формирующих воспалительный инфильтрат в строме опухоли. Она минимальна в фибробластах в сравнении с моно- и сегментоядерными лейкоцитами (рисунок 3).

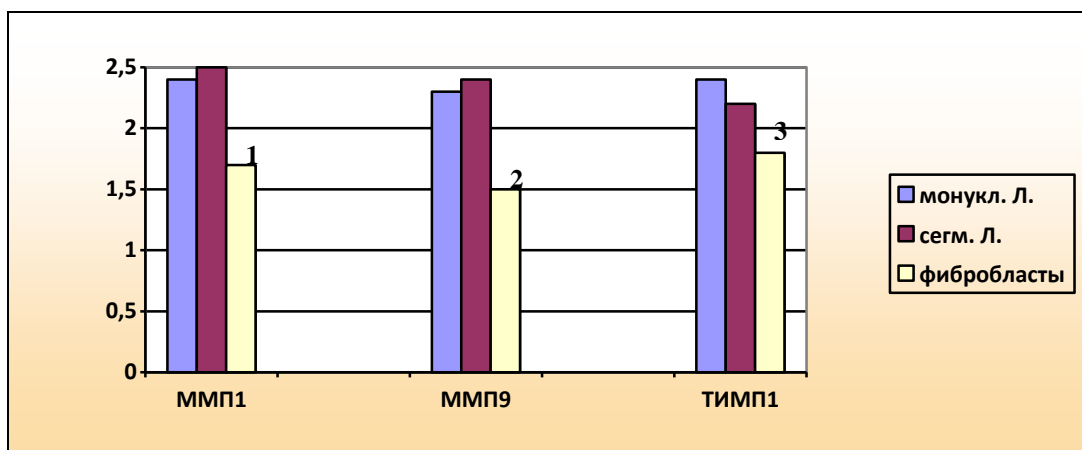


Рисунок 3 – Выраженность экспрессии ММП1, ММП9 и ТИМП1 (по оси ординат) в клетках воспалительного инфильтрата в строме опухоли (экспрессия в фибробластах меньше): 1 и 3 – ММП1 и ММП9 по отношению к мононуклеарным и сегментарным лейкоцитам ( $p=0,0000$ ); 2 – ТИМП1 по отношению к мононуклеарным лейкоцитам ( $p=0,0004$ )

В отличие от опухолевых элементов, в которых предоперационная терапия снижала экспрессию определяемых маркеров в структурах, где исходно она была более выражена, в клетках стромы экспрессия оказалась резистентной к предоперационной терапии. Таким образом, экспрессия металлопротеиназ и молекул, регулирующих их экспрессию и активность в клеточных элементах воспалительного инфильтрата, не подчиняется «правилу исходного уровня», как это наблюдалось в опухолевых клетках.

Регуляция синтеза металлопротеиназ и молекул, влияющих на их экспрессию, и активность в опухолевых клетках и в стромальных элементах могут быть взаимосвязанными или не зависеть друг от друга. Бросается в глаза, что в наименьшей степени связана регуляция экспрессии в опухолевых элементах и фибробластах. Судя по характеру корреляционных связей, можно предположить, что усиление синтеза индуктора экспрессии металлопротеиназ CD147 в мононуклеарных лейкоцитах стимулирует экспрессию ММП1 в структурах 1-го типа ( $r=0,32$ ;  $p=0,03$ ) и ММП9 в структурах 4-го типа ( $r=0,58$ ;  $p=0,01$ ); CD147 в опухолевых клетках 3-го типа структур – экспрессию ММП9 в фибробластах ( $r=0,35$ ;  $p=0,03$ ), а в опухолевых структурах 4-го типа – ММП2 в мононуклеарных ( $r=0,58$ ;  $p=0,014$ ) и нейтрофильных ( $r=0,62$ ;  $p=0,007$ ) лейкоцитах. Однако наиболее интересен разный характер связей в более и менее дифференцированных структурах опухоли. Экспрессия ММП1 в более дифференцированных структурах опухоли связана

преимущественно с экспрессией ММП1, 2 и 9 в мононуклеарных лейкоцитах. В отличие от этого, экспрессия ММП1, 2, 9 в низкодифференцированных структурах 4-го и 5-го типа связана преимущественно с экспрессией ММП1, 2 в нейтрофилах. Можно предположить, что инвазивные свойства высокодифференцированных структур опухоли больше связаны с мононуклеарной инфильтрацией, а низкодифференцированных – с инфильтрацией нейтрофильными лейкоцитами.

Следует подчеркнуть, что экспрессия металлопротеиназ и их ингибиторов в фибробластах и лейкоцитах опухолевой стромы также не зависела от сочетания в опухоли структур разной степени дифференцировки.

Распространенность плоскоклеточного рака гортани (критерий T) существенно не связана с активностью металлопротеиназ и их ингибиторов в опухолевых клетках. Предоперационная терапия не влияет на связь активности металлопротеиназ и распространенности опухоли. Эти факты определенно подтверждают, что инвазивные свойства плоскоклеточных структур, лежащие в основе распространения опухоли, действительно является результатом многофакторных изменений опухолевых клеток и поэтому не имеют заметной связи с экспрессией металлопротеиназ.

В отличие от экспрессии металлопротеиназ опухолевыми клетками, способность плоскоклеточных карцином к распространению на уровне выраженных тенденций связана с экспрессией металлопротеиназ клетками воспалительного инфильтрата: с усилением экспрессии ММП2 в мононуклеарных лейкоцитах ( $F=2,3$ ;  $p=0,09$ ) и в фибробластах ( $F=2,4$ ;  $p=0,07$ ). Вероятность такой связи подтверждается данными литературы о роли воспаления в проявлении способности опухолевых клеток к инвазивному росту (Finger E.C., 2010, Shuman Moss L.A., 2012).

Одно из ярких проявлений различий между опухолями, характеризующимися разным сочетанием высоко- и низкодифференцированных структур, – разная степень распространенности опухоли. Против ожидания, характеристика T при опухолях, образованных преимущественно высоко- или низкодифференцированными структурами, была практически одинаковой. Хотя, конечно, предполагается, что низкодифференцированные опухоли должны быть в большей степени склонны к инвазивному росту и распространению. Трудно понять, почему гетерогенные опухоли, в которых есть структуры с высокой и низкой степенью, не похожи по распространенности с гомогенными по морфологическому строению опухолями, в которых имеются или высоко-, или низкодифференцированные структуры. Они характеризуются более агрессивным течением: меньшей частотой встречаемости T1 и большей – T3 (рисунок 4). Быть может, описанные различия обусловлены тем, что ключевые события, определяющие распространение опухолей, их инвазивность, связаны с функциональными свойствами не опухолевых клеток, а клеток, инфильтрирующих строму.

Поскольку инвазивность плоскоклеточной карциномы связана с уровнем дифференцировки опухоли, степенью ее гетерогенности и активностью металлопротеиназ, секретлируемых опухолевыми элементами, представляет интерес обсуждение характера взаимосвязи этих параметров и их значения в лимфогенной диссеминации плоскоклеточных карцином.

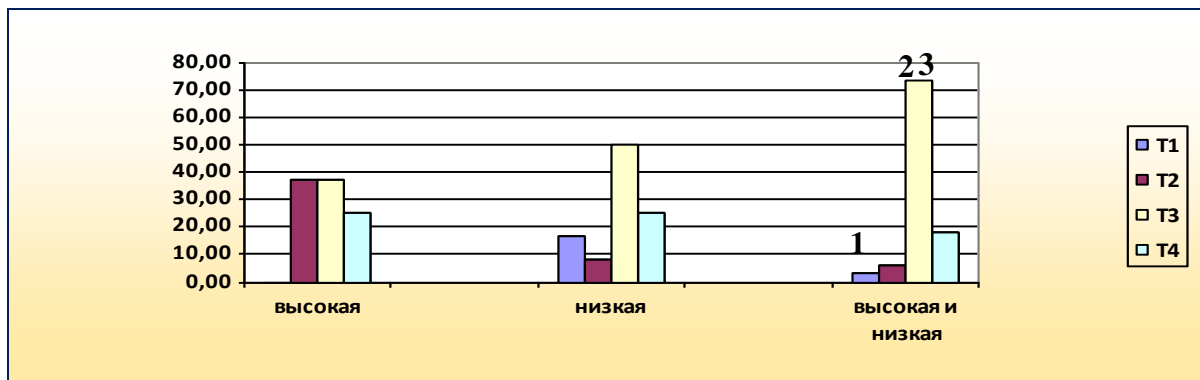


Рисунок 4 – Частота разной степени распространенности плоскоклеточного рака гортани (Т1–4 по оси ординат) в зависимости от сочетания в опухолях структур высокой и низкой степени дифференцировки: опухоли с наличием высоко- и низкодифференцированных структур отличаются в сравнении с опухолями с низкодифференцированными структурами (1;  $p=0,06$ ); в сравнении с опухолями с высокодифференцированными структурами (2;  $p=0,03$ ); в сравнении с опухолями с низкодифференцированными структурами (3;  $p=0,07$ )

Как было установлено, потенциальная способность опухолевых клеток к инвазивному росту, оцениваемая по экспрессии металлопротеиназ и их ингибиторов, оказалась в соответствии с ожиданием минимальной в дифференцированных структурах и максимально выраженной по экспрессии ММП1, ММП2 и ММП9 в наименее дифференцированных дискретных опухолевых клетках. Однако такая закономерность распределения активности металлопротеиназ в структурах плоскоклеточного рака разной степени дифференцировки была характерна в большей степени для случаев без лимфогенных метастазов, но не для группы с лимфогенной диссеминацией карциномы.

С лимфогенным метастазированием оказалась связанной только более выраженная в опухолевых клетках экспрессия ММП9 (рисунок 5).

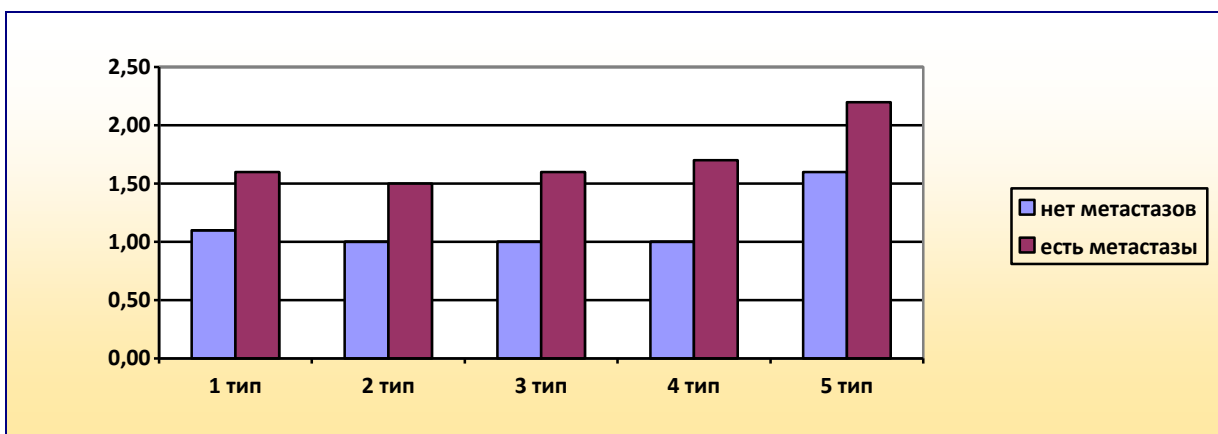


Рисунок 5 – Выраженность экспрессии ММП9 (по оси ординат) в разных структурах опухоли при отсутствии и наличии лимфогенных метастазов: экспрессия выше при развитии лимфогенных метастазов в 1-м типе ( $F=5,3$ ;  $p=0,02$ ); 2-м типе ( $F=8,3$ ;  $p=0,006$ ); 3-м типе ( $F=9,7$ ;  $p=0,003$ )

Имеющиеся наблюдения относительно роли металлопротеиназ и их ингибиторов в лимфогенном метастазировании противоречивы. Многие авторы сообщают, что при наличии регионарных лимфогенных метастазов выявляется снижение уровня экспрессии ТИМП2 в опухолевых клетках и ТИМП1 в строме (Кондакова И.В. с соавт., 2011). Существуют данные о связи экспрессии ММП9 и ММП2 с инвазией и лимфогенным метастазированием плоскоклеточного рака (Patel В.Р., 2007). ММП9 даже предлагают в качестве прогностического фактора лимфогенного метастазирования при плоскоклеточной карциноме головы и шеи (Какурина Г.В. с соавт., 2012, Ruokolainen H. et al., 2004, Dunne A.A. et al., 2005). С другой стороны, существуют данные о том, что экспрессия ММП9 не связана ни с размером опухоли, ни с клинической стадией, ни со степенью дифференцировки, ни с состоянием лимфатических узлов (Клишо Е.В. с соавт., 2003, Peschos D. et al., 2006).

Особенностью наших наблюдений было достоверное усиление экспрессии ММП9 в группе пациентов с лимфогенными метастазами только в более дифференцированных структурах плоскоклеточной карциномы (1, 2 и 3-го типа). Кроме этого, в наиболее дифференцированных структурах 1-го типа наблюдалось и усиление экспрессии CD147, индуктора синтеза металлопротеиназ.

Повышение синтеза металлопротеиназ в опухолевых структурах высокой степени дифференцировки может свидетельствовать о том, что их способность к коллективному инвазивному росту усилена в опухолях, метастазирующих в лимфатические узлы. Это соответствует тезису, что лимфогенное метастазирование может осуществляться кластерами опухолевых клеток (Aceto N. et al., 2014).

В основе способности кластера опухолевых клеток к инвазивному росту лежит эпителиально-мезенхимальный переход. Именно металлопротеиназы, увеличивая экспрессию фактора транскрипции Snail, индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход, в результате которого трансформированные клетки не только теряют адгезивные молекулы, но и приобретают способность быть подвижными (Клишо Е.В. с соавт., 2011, Przybylo J.A. et al., 2007, Radisky E.S. 2010).

Экспрессия металлопротеиназ, их ингибиторов и индуктора синтеза металлопротеиназ CD147 в случаях проведения дооперационной терапии существенно не различалась в группах с наличием и отсутствием лимфогенных метастазов. Это обусловлено усилением их экспрессии после лечения в группе больных без лимфогенных метастазов. Так, экспрессия ММП9 в структурах 1-го типа в группе без неoadьювантной терапии и без поражения регионарных лимфатических узлов составляла  $1,1 \pm 0,3$ , а в аналогичной группе после лечения –  $1,5 \pm 0,7$  ( $p=0,055$ ); в опухолевых элементах 2-го типа структур – соответственно  $1,0 \pm 0,1$  и  $1,6 \pm 0,7$  ( $p=0,0000$ ).

Интересен обнаруженный в исследовании факт значительного уменьшения под влиянием неoadьювантной терапии опухолевых структур 3-го и 4-го типа в группе с лимфогенными метастазами. Так, в группе без предоперационного лечения структуры 3-го типа встречались при отсутствии лимфогенных метастазов в 21 случае, при наличии – в 16. В группе с предоперационным лечением – соответственно в 11 и 0 случаях ( $\chi^2 = 7,14$ ;  $p=0,0076$ ). Касательно структур 4-го типа в



группе без предоперационного лечения они встречались при отсутствии лимфо-генных метастазов в 2 случаях, при наличии – в 15. В группе с предоперационным лечением – соответственно в 9 и 0 случаях ( $\chi^2 = 18,8$ ;  $p=0,0000$ ).

Это еще раз свидетельствует о связи морфологической и биологической гетерогенности плоскоклеточных карцином. По-видимому, гетерогенность касается и резистентности опухоли к неoadьювантной терапии. Можно предположить, что опухолевые клетки структур 3-го и 4-го типа обладают большей чувствительностью в сравнении с другими структурами. Представляет интерес изучение механизма, посредством которого эта большая чувствительность сопряжена еще и с лимфогенным метастазированием.

В общей группе экспрессия металлопротеиназ и их ингибиторов в клетках стромального инфильтрата оказалась не связанной с лимфогенным метастазированием. Связь синтеза металлопротеиназ и молекул, регулирующих их экспрессию и активность, а также дифференцировки опухоли с частотой лимфогенного метастазирования уточнена благодаря сравнению процесса метастазирования при локализации опухолей в надскладочной области и в области голосовых связок.

Частота развития лимфогенных метастазов почти в 5 раз выше при расположении опухоли в надскладочном пространстве по сравнению с локализацией процесса в области голосовых складок. После проведения предоперационной терапии различия в частоте лимфогенного метастазирования в сравниваемых анатомических областях сохраняются, однако становятся менее выраженными за счет уменьшения в 2 раза (с 75 до 33 %;  $p=0,0057$ ) количества случаев с лимфогенным метастазированием при локализации опухоли преимущественно в надскладочном пространстве. В отличие от этого неoadьювантная терапия не приводила к уменьшению количества случаев с лимфогенными метастазами при локализации плоскоклеточной карциномы в области голосовых связок (14 % и 10 %;  $p=0,33$ ) (рисунок 6).

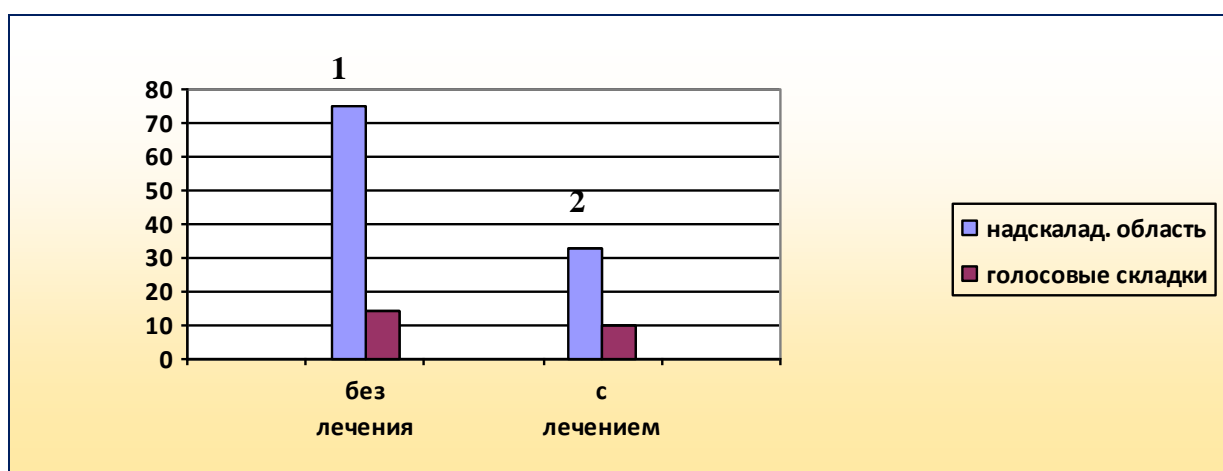


Рисунок 6 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от локализации плоскоклеточного рака гортани (% по оси ординат): частота метастазирования выше при локализации в надскладочной области в группе без лечения (1;  $p=0,0000$ ) и в группе с лечением (2;  $p=0,038$ )

Важно то, что опухоли, построенные преимущественно низкодифференцированными или высокодифференцированными структурами, метастазировали одинаково с подобными себе независимо от локализации. Различия касались только опухолей с выраженным гетерогенным строением – с наличием высоко- и низкодифференцированных структур (рисунок 7).

Наблюдалась отчетливая тенденция к уменьшению частоты выявления лимфогенных метастазов опухолей надскладочной области, образованных высоко- и низкодифференцированными структурами (70,5 % и 28,6 %;  $p=0,05$ ).

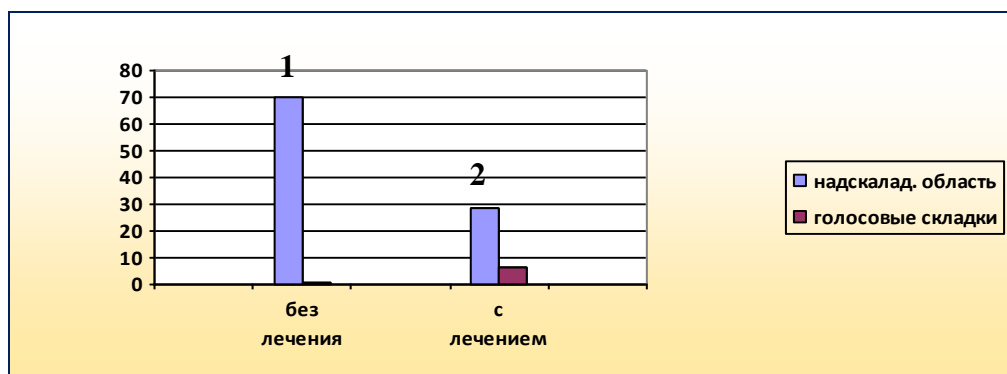


Рисунок 7 – Частота лимфогенного метастазирования плоскоклеточного рака гортани с наличием высоко- и низкодифференцированных структур в зависимости от локализации (% по оси ординат): частота метастазирования выше при локализации в надскладочной области в группе без лечения (1;  $p=0,0000$ ) и в группе с лечением (2;  $p=0,05$ )

Мы получили аргументы в пользу определенной роли экспрессии металлопротеиназ и их ингибиторов в лимфогенном метастазировании. Следует отметить, что значение металлопротеиназ как одного из существенных факторов, определяющих большую частоту метастазирования плоскоклеточного рака надскладочной области, оказалось возможным установить, учитывая вариант сочетания в опухоли высоко- и низкодифференцированных структур.

Прежде всего обнаружено, что в гетерогенных опухолях, в структурах 1-го типа опухолей голосовых связок имелась тенденция к более выраженной экспрессии ТИМП1 – ингибитора металлопротеиназ 1 и 9 (соответственно  $2,60\pm 0,60$  и  $2,00\pm 1,1$ ;  $p=0,08$ ). С другой стороны, выявлено, что большая склонность к лимфогенному метастазированию опухолей надскладочной области, построенных высоко- и низкодифференцированными структурами, в сравнении с опухолями подобного строения голосовых связок сочетается с более выраженной экспрессией ММП9 ( $3,60\pm 0,50$  и  $2,10\pm 1,1$ ;  $p=0,004$ ) и CD147 ( $2,00\pm 1,2$  и  $1,3\pm 0,5$ ;  $p=0,037$ ) в сегментоядерных лейкоцитах, инфильтрирующих опухоль.

Возможно назвать несколько факторов, с которыми, по-видимому, связаны различия в частоте лимфогенного метастазирования опухолей рассматриваемых локализаций. С одной стороны, в карциномах надскладочной области усиление экспрессии ММП9 и CD147 в сегментоядерных лейкоцитах могло вызывать ремоделирование межклеточного матрикса, способствующее инвазивному росту опухоли, – свойству, необходимому для метастазирования. С другой стороны,

в плоскоклеточных карциномах голосовых связок усиление экспрессии ТИМП1 в опухолевых структурах 1-го типа могло ингибировать активность ММП9, которая в наших исследованиях оказалась сопряженной с лимфогенным метастазированием. Все это можно рассматривать как одну из причин меньшей частоты лимфогенного метастазирования плоскоклеточных карцином голосовых складок.

Таким образом, плоскоклеточный рак гортани характеризуется гетерогенностью морфофункционального строения. В зависимости от сочетания различных вариантов пяти типов морфологических структур опухоли делятся на относительно гомогенные высоко- и умеренно дифференцированные и максимально гетерогенные с сочетанием высоко- и низкодифференцированных структур. Экспрессия металлопротеиназ, индуктора их синтеза и ингибиторов их активности связана с гетерогенностью морфологического строения. Выраженная экспрессия металлопротеиназ характерна для низкодифференцированных структур 5-го типа.

Влияние предоперационной терапии на экспрессию металлопротеиназ и их ингибиторов, по-видимому, подчиняется «правилу исходного уровня»: увеличение активности наблюдается в высокодифференцированных структурах с исходно низкой активностью ферментов и уменьшение – в низкодифференцированных структурах с исходно высокой активностью. Экспрессия металлопротеиназ минимальна в фибробластах в сравнении с моно- и сегментоядерными лейкоцитами.

Способность плоскоклеточных карцином к распространению (Т-характеристика опухоли) связана, очевидно, с экспрессией металлопротеиназ клетками воспалительного инфильтрата. Гетерогенные опухоли, в которых есть структуры высокой и низкой степени дифференцировки, характеризуются большей степенью распространения.

С лимфогенным метастазированием оказалась связанной только экспрессия ММП9 и индуктора синтеза металлопротеиназ, более выраженная в высокодифференцированных структурах плоскоклеточной карциномы. Предоперационная терапия приводит к стимуляции экспрессии ММП9 в высокодифференцированных структурах только в группе без лимфогенных метастазов, где исходно экспрессия была ниже, чем в группе с наличием метастазов в лимфатических узлах. Обнаруженное в группе с лимфогенными метастазами значительное уменьшение количества опухолевых структур 3-го и 4-го типа под влиянием неoadъювантной терапии, возможно, обусловлено большей чувствительностью опухолевых клеток этих структур в сравнении с другими структурами.

Частота развития лимфогенных метастазов почти в 5 раз выше при расположении опухоли в надскладочном пространстве по сравнению с локализацией опухоли в области голосовых складок. Различия касаются только опухолей смешанного строения и, по-видимому, связаны с более выраженной экспрессией ММП9 и CD147 в сегментоядерных лейкоцитах, инфильтрирующих опухоли надскладочной области, и с более выраженной экспрессией ТИМП1 – ингибитора металлопротеиназ 1 и 9 в опухолевых клетках структуры 1-го типа рака голосовых связок.

## Выводы

1. Плоскоклеточный рак гортани характеризуется гетерогенностью морфологического строения. Имеются структуры с ороговением (1-й тип), с клетками базалоидного и шиповатого типа без ороговения (2-й тип), с клетками базалоидного типа (3-й тип), с выраженным клеточным полиморфизмом (4-й тип) и одиночные опухолевые клетки (5-й тип). Опухоли со структурами 1-го и/или 2-го типа являются высокодифференцированными, с сочетанием структур 3-го, и/или 4-го, и/или 5-го типа – низкодифференцированными, с сочетанием структур 1-го и/или 2-го и 3-го, и/или 4-го, и/или 5-го типа – высоко- и низкодифференцированными, т.е. смешанного типа дифференцировки.

2. Экспрессия ММП и их ингибиторов характеризуется гетерогенностью в разных морфологических структурах плоскоклеточного рака гортани. Она минимальна и существенно неотличима от нормального эпителия, а также в структурах 1–4-го типа. Максимальна экспрессия ММП1, ММП2 и ММП9 в наименее дифференцированных структурах 5-го типа. Эффекты предоперационной терапии зависят от типа опухолевых структур: в высокодифференцированных структурах 1-го и 2-го типа, как и в нормальном плоском эпителии, происходит усиление изначально низкой экспрессии ММП9, в наименее дифференцированных структурах 5-го типа, наоборот, – уменьшение изначально высокого уровня экспрессии ММП1 и ММП2.

3. По мере снижения дифференцировки опухоли возрастает экспрессия ММП2 в структурах 3-го типа, ТИМП2 в структурах 1, 2, 3-го типа и в мононуклеарных лейкоцитах, ТИМП1 в фибробластах. Экспрессия ММП1, напротив, снижается в низкодифференцированных опухолях. На фоне проведения предоперационной терапии данная зависимость отсутствует.

4. Экспрессия ММП1, ММП9, ТИМП1 и CD147 минимальна в фибробластах в сравнении с лейкоцитами, не подвержена влиянию предоперационной терапии. Максимальное количество корреляционных связей между экспрессией металлопротеиназ опухолевыми клетками и клетками инфильтрата наблюдается в структурах 4-го типа. Экспрессия ММП в опухолевых клетках высокодифференцированных структур коррелирует с экспрессией ММП в мононуклеарных лейкоцитах, а экспрессия ММП в опухолевых клетках низкодифференцированных структур – с экспрессией ММП нейтрофилов. Чаще при этом отмечается корреляция экспрессии ММП1 и ММП9.

5. Развитие лимфогенных метастазов связано с большей плотностью сосудов в опухоли. В опухолях, построенных только низкодифференцированными структурами, отмечается максимальная плотность сосудов. При сочетании низко- и высокодифференцированных структур плотность сосудов не отличается от таковой высокодифференцированных опухолей. Количество сосудов в строме опухоли напрямую связано с экспрессией ТИМП2 в структурах 3-го типа и CD147 в структурах 1-го типа. Неoadьювантная терапия приводит к уменьшению степени васкуляризации в опухолях с низкой дифференцировкой.

6. Распространенность плоскоклеточного рака гортани (Т) связана с усилением экспрессии ММП2 в мононуклеарных лейкоцитах и в фибробластах. Предоперационная терапия отменяет эти связи. Распространенность опухоли выше при

наличии в ней высоко- и низкодифференцированных структур. Они характеризуются меньшей частотой встречаемости T1 и большей – T3.

7. Развитие лимфогенных метастазов связано с повышенной экспрессией ММП9 в структурах 1–3-го типа, CD147 в структурах 1-го типа в сравнении с группой больных без лимфогенных метастазов. Предоперационная терапия нивелирует эти различия за счет стимуляции экспрессии данных маркеров в группе больных без лимфогенных метастазов. Неоадьювантная терапия приводит к меньшей частоте встречаемости в опухолях у больных с лимфогенными метастазами структур 3-го и 4-го типа.

8. Частота лимфогенного метастазирования почти в 5 раз выше при преимущественной локализации плоскоклеточных карцином в надскладочном отделе гортани, в сравнении с областью голосовых складок. Различия связаны с опухолями, построенными высоко- и низкодифференцированными структурами, в которых в сравнении с опухолями подобного строения голосовых складок более выражена экспрессия ММП9 и CD147 в сегментоядерных лейкоцитах, инфильтрирующих строму. Неоадьювантная терапия приводит к снижению частоты лимфогенных метастазов опухолей надскладочного отдела гортани преимущественно за счет опухолей, образованных сочетанием высоко- и низкодифференцированных структур.

### **Практические рекомендации**

Для прогнозирования потенций к распространенности плоскоклеточного рака гортани необходимо учитывать, что ее вероятность выше при сочетании в опухоли высоко- и низкодифференцированных структур, а также при усилении экспрессии ММП2 в мононуклеарных лейкоцитах и в фибробластах.

Следует принимать во внимание, что лимфогенное метастазирование плоскоклеточных карцином, построенных высоко- и низкодифференцированными структурами, локализованными преимущественно в надскладочном отделе гортани, в 5 раз выше в сравнении с локализацией в области голосовых складок. Это связано с более выраженной экспрессией ММП9 и CD147 в сегментоядерных лейкоцитах, инфильтрирующих строму.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Савенкова О.В. Оценка содержания металлопротеиназы ММП9 и ее эндогенного ингибитора ТИМП1 в связи с клинико-морфологическими параметрами при раке гортани [Текст] / Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, О.В. Савенкова, В.М. Перельмутер, Е.Л. Чойнзонов, Д.А. Шишкин // Онкология сегодня. Успехи и перспективы : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию онкологической службы Республики Татарстан и кафедры онкологии и хирургии Казанской государственной медицинской академии, 13–15 сентября 2006 г. / ред. И.А. Гилязутдинов. – Казань, 2006. – Т. 9 : Труды КОД МЗ РТ. – С. 119–120.

2. Савенкова О.В. Определение содержания металлопротеиназы 9 и тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 в опухолевой ткани и сыворотке крови при раке гортани [Текст] / Е.В. Клишо, О.В. Савенкова, В.М. Перельмутер, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов, Д.А. Шишкин // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 3. – С. 125–126.

3. Савенкова О.В. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в опухолях и сыворотке крови больных плоскоклеточным раком головы и шеи [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, Е.В. Малахова, О.В. Савенкова, Д.А. Шишкин, Е.Л. Чойнзонов // Одиннадцатый Российский онкологический конгресс : материалы конгресса / ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН. – М., 2007. – С. 180.

4. Савенкова О.В. Оценка содержания металлопротеиназ и их эндогенных ингибиторов в раке гортани [Текст] / Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, О.В. Савенкова, В.М. Перельмутер, Е.Л. Чойнзонов, Д.А. Шишкин // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 26–31.

5. Савенкова О.В. Экспрессия генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в тканях плоскоклеточных карцином головы и шеи [Текст] / Е.В. Малахова, Г.В. Какурина, О.В. Савенкова // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Прил. 1. – С. 82–83.

6. Савенкова О.В. Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 и их тканевые ингибиторы как факторы метастазирования злокачественных новообразований головы и шеи [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, Г.В. Какурина, О.В. Савенкова, Д.А. Шишкин, Е.Л. Чойнзонов, М.Р. Мухамедов // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 555–560.

7. Савенкова О.В. Матриксные металлопротеиназы – новые опухолевые прогностические маркеры [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, Е.В. Малахова, Г.В. Какурина, О.В. Черемисина, О.В. Савенкова // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 58.

8. Савенкова О.В. Металлопротеиназы и прогрессия злокачественных опухолей [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, Г.В. Какурина, Е.В. Малахова, Е.Л. Чойнзонов, О.В. Савенкова, Д.А. Шишкин // Молекулярная онкология: Всероссийская конференция с международным участием : сборник материалов / ГУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, ГОУ ВПО Новосибирский государственный университет, ГУ НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. – Новосибирск: Альфа Виста Н, 2008. – С. 118–119.

9. Савенкова О.В. Содержание матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в сыворотке крови и опухолях при их метастазировании : реферат [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, Г.В. Какурина, О.В. Савенкова, Е.Л. Чойнзонов, Д.А. Шишкин // ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ. – 2008. – № 2. – С. 88–92. – (СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК).

10. Savenkova O.V. Matrix metalloproteinases 2 and 9 as the factors of head and neck tumor metastases [Text] / I.V. Kondakova, E.V. Klisho, O.V. Savenkova, G.V. Kakurina, E.L. Choinzonov, D.A. Shishkin // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2008. – Vol. 2, № 3. – С. 298–301.

11. Савенкова О.В. Экспрессия металлопротеиназ и их эндогенных ингибиторов опухолевыми и стромальными элементами при раке гортани [Текст] / О.В. Савенкова, Е.В. Клишо, Е.В. Спирина // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. 1. – С. 171.

12. Савенкова О.В. Взаимосвязь экспрессии матриксных металлопротеиназ и их генов в плоскоклеточных карциномах головы и шеи с клинико-морфологическими параметрами заболевания [Текст] / Е.В. Малахова, Е.В. Клишо, И.В. Кондакова,

Г.В. Какурина, О.В. Савенкова, О.В. Черемисина // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Прил. 1. – С. 72–73.

**13. Савенкова О.В. Тканевая регуляция экспрессии матричных металлопротеиназ в плоскоклеточных карциномах головы и шеи [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, О.В. Савенкова, Д.А. Шишкин, Е.Л. Чойнзонов // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21, № 3. – С. 36–41.**

**14. Савенкова О.В. Патогенетическая значимость системы матричных металлопротеиназ при плоскоклеточном раке головы и шеи [Текст] / И.В. Кондакова, Е.В. Клишо, О.В. Савенкова, Д.А. Шишкин, Е.Л. Чойнзонов // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 1. – С. 29–33.**

**15. Савенкова О.В. Связь экспрессии матричных металлопротеиназ с морфологической гетерогенностью, дифференцировкой опухоли и лимфогенным метастазированием плоскоклеточной карциномы гортани [Текст] / О.В. Савенкова, М.В. Завьялова, В.А. Бычков, Е.Л. Чойнзонов, В.М. Перельмутер // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 1. – С. 51–58.**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

абс. ч. – абсолютное число

Гр – грей

ДАБ – диаминобензидин

ММП – матричная металлопротеиназа

РОД – разовая очаговая доза

СОД – суммарная очаговая доза

ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназы

EMMPRIN – Extracellular matrix metalloproteinase inducer – индуктор синтеза металлопротеиназ

F – критерий Фишера

M – среднее значение показателя

p – критерий значимости различий

S.D. – стандартное отклонение