

Е.Л. Чойнзонов, Л.В. Спирина, И.В. Кондакова, Д.А. Шишкин, С.Ю. Чижевская

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ NF- κ B И HIF-1 В ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМАХ ГОЛОВЫ И ШЕИ: СВЯЗЬ С ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск

Изучена экспрессия транскрипционных факторов NF- κ B p65, NF- κ B p50 и HIF-1 в ткани плоскоклеточных карцином головы и шеи (ПКГШ). Выявлена связь развития регионарных метастазов заболевания с увеличением экспрессии транскрипционного фактора NF- κ B p50. У 10 пациентов после лечения были выявлены рецидивы заболевания в течение от 3 до 47 месяцев, метастазы в регионарные лимфоузлы обнаружены у 3 пациентов, летальные исходы имели место у 12 пациентов. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ зависела от порогового уровня экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B p65, p50, HIF-1, равного 9,6, 7,8 и 9 УЕ/мг белка соответственно.

Ключевые слова: плоскоклеточные карциномы головы и шеи, транскрипционные факторы NF- κ B и HIF-1, прогноз заболевания

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПКГШ) характеризуются высокой запущенностью, связанной с особенностями анатомо-топографической локализации, бессимптомным течением и высокой степенью злокачественности процесса, что определяет не только тяжесть заболевания, но и довольно агрессивную тактику комбинированного лечения [3]. Несмотря на успехи в хирургическом и комбинированном лечении ПКГШ, прогноз заболевания остается крайне неблагоприятным. Размер опухоли, наличие регионарных метастазов, возраст пациента при манифестации заболевания до сих пор остаются главными критериями при принятии терапевтического решения. Актуальной задачей является поиск молекулярных показателей, которые, характеризуя биологические особенности опухоли, смогут прогнозировать исход заболевания, что, в свою очередь, поможет обеспечить максимальную эффективность лечения каждого больного [1, 3]. К числу важнейших регуляторов биологического поведения опухолей относятся транскрипционные факторы, в частности NF- κ B и HIF-1, которые синтезируются непосредственно в опухоли и регулируют различные функции опухолевых клеток.

NF- κ B (nuclear factor kappa — B) является ключевым фактором транскрипции, связанным с процессами апоптоза и контролем пролиферации клеток. Семейство факторов NF- κ B — важное звено в развитии иммунного ответа и воспаления. Это семейство состоит из 5 белков: NF- κ B1 (или p50), NF- κ B2 (или p52), RelA (или p65), RelB и c-Rel, образующих 15 комбинаций димеров. Все белки семейства объединяет наличие домена гомологии Rel, который обеспечивает образование белковых димеров, связывание NF- κ B с ДНК и с цитозольным ингибиторным белком I κ B. Фактор NF- κ B проявляет активность только в димерной форме, причём, наиболее распространена димеризация субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65 [8]. Активной является субъединица p65, а соотношение субъединиц p65 к p50 менее единицы может свидетельствовать о синтезе функционально неактивных димеров NF- κ B [5].

Фактор HIF (hypoxia inducible transcription factor) представляет собой фактор транскрипции, активирующийся в условиях гипоксии. Семейство этих факторов представлено HIF-1, HIF-2 и HIF-3. В большинстве случаев выявляется HIF-1, который является гетеродимером, состоящим из α и β субъединиц. β -Субъединицы фактора являются конститутивными, активность фактора в условиях гипоксии зависит от экспрессии и посттрансляционных модификаций α -субъединиц [9]. При активации ядерного гипоксического фактора происходит увеличение экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста, результатом чего является рост новых сосудов в опухоли и прогрессирование заболевания [10].

Патогенез ПКГШ, как полагают, тесно связан с активацией транскрипционного фактора NF- κ B [11]. Снижение транскрипционной активности ядерного фактора способствует развитию антипролиферативного эффекта в культуре плоскоклеточных карцином [4]. Однако, связь данного показателя с течением заболевания и выживаемостью больных ПКГШ практически не изучена.

Рост экспрессии HIF-1 и связанная с ним продукция в опухоли ангиогенных белков и пептидов играют значимую роль в развитии

ПКГШ. Существуют противоречивые данные о связи уровня продукции транскрипционного фактора с прогнозом заболевания. T. Fillies и соавт. показали, что высокий уровень HIF-1 в ткани опухоли является признаком хорошего прогноза у больных на ранних стадиях ПКГШ [7]. Однако, по данным большинства исследователей рост экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 наблюдается у больных с высоким риском лимфогенного метастазирования, что коррелирует и с ухудшением их общей выживаемости [6].

В целом, связь транскрипционных факторов с прогнозом ПКГШ является малоизученной, существующие данные носят неоднозначный характер. Цель проведенного исследования заключалась в изучении связи транскрипционных факторов NF-κB p50, p65 и HIF-1 с безрецидивной, безметастатической и общей выживаемостью больных ПКГШ.

Материал и методика

Обследованы 32 пациента (средний возраст 57,1±1,7 лет) с морфологически верифицированным диагнозом плоскоклеточного рака области головы и шеи T2-3N0-2. Кроме того, в исследование были включены 15 больных раком гортани и гортаноглотки, 8 пациентов с опухолями полости рта и 8 больных – с раком языка, которые в виду одинакового гистологического строения опухоли составили общую группу больных плоскоклеточными карциномами области головы и шеи. Объемы диагностики (TNM, 2009) и лечения больных соответствовали рекомендуемому алгоритмам, утвержденным Министерством здравоохранения РФ. Все пациенты подверглись оперативному удалению опухоли. При наличии регионарных метастазов выполняли фасциально-фулярное иссечение шейной клетчатки, операцию Крайля. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, получены информированные согласия от всех пациентов.

После проведенного комбинированного лечения с целью обнаружения признаков прогрессирования заболевания больные проходили обследование в течение первого года через 3 мес и далее через каждые 6 мес. Период динамического наблюдения за больными составил от 3 до 47 месяцев, средний срок — 16,6±1,5 месяцев. У 10 больных в период от 8 до 26 месяцев после лечения были выявлены рецидивы. Метастазы в регионарные лимфоузлы выявлены у 3 пациентов в срок от 4 до 7 месяцев после лечения. Летальные исходы имели место у 18,2% пациентов (12 человек).

Материалом для исследования протеасом явились образцы опухолевой и гистологически неизмененной ткани, находящиеся на расстоянии не менее 2 см от границы опухоли, которые были получены при выполнении радикального оперативного вмешательства. Весь материал проходил гистологическую верификацию.

Приготовление тканевых экстрактов для определения HIF-1α и NF-κB (p50 и p65 форм). Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 50 мл фосфатного буфера, содержащего 0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,01 М NaH₂PO₄, 0,0017 М KH₂PO₄ (pH 7.4), при постоянном помешивании инкубировали 15 минут при 4°C и центрифугировали при 14000g и 4°C. Полученный супернатант использовали для определения экспрессии транскрипционных факторов.

Определение содержания транскрипционных факторов. Активированные формы NF-κB p50, p65 и HIF-1α субъединиц определяли в ядерных экстрактах с помощью наборов Caymanchem (США) методом ИФА. Уровень белка в гомогенатах и ядерных экстрактах оценивался по Лоури. Результаты определения содержания ростовых факторов (VEGF) выражали в нг/мг белка, а транскрипционных факторов — в условных единицах на мг белка в лунке.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как $m \pm M$, где m — среднее выборочное, M — ошибка среднего или как медиана с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий исследовали с помощью t -критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни. Значимость различий в группах больных была также исследована с помощью многомерного непараметрического дисперсионного анализа, рангового теста Краскела-Уоллиса и медианного теста.

Результаты и их обсуждение

Экспрессия NF-κB в исследуемом материале зависела от наличия метастазов в регионарные лимфоузлы (табл. 1), причем, эта зависимость носила сложный волнообразный характер. Экспрессия субъединицы NF-κB p50 увеличивалась в 2,9 раз у больных со стадией T₂₋₃N₁ по сравнению с больными со стадией T₂₋₃N₀. Дальнейшее увеличение количества пораженных лимфоузлов сопровождалось снижением экспрессии NF-κB p50: у больных со стадией T₂₋₃N₂ содержание фактора снижалось по сравнению с больными со стадией T₂₋₃N₁. Экспрессия активированной формы NF-κB p65 при поражении лимфатических узлов имела тенденцию к увеличению.

Волнообразная динамика изменения содержания ядерного фактора NF-κB была выявлена и для коэффициента NF-κB p65/p50. Данный показатель снижался у больных со стадией T₂₋₃N₁ по сравнению с больными без поражения лимфоузлов и составлял 0,6. В группе больных T₂₋₃N₂ коэффициент NF-κB p65/p50 повышался до уровня 2,5. Содержание HIF-1α при прогрессировании заболевания имело тенденцию к увеличению у больных с поражением регионарных лимфоузлов по сравнению с больными со стадией T₂₋₃N₀. Выявленное колебание содержания субъединицы p50 NF-κB, как можно предположить, имеет важное значение в механизме лимфогенного распространения опухоли.

Дополнительно была исследована и связь лимфогенного метастазирования с экспрессией транскрипционных факторов. Ранговый тест Краскела-Уоллиса показал зависимость стадии N заболевания от экспрессии NF-κB p50 ($p=0,05$), что свидетельствует о вовлеченности этих показателей в развитие регионарных метастазов.

Таблица 1. Экспрессия транскрипционных факторов в зависимости от поражения регионарных лимфоузлов при плоскоклеточном раке головы и шеи, Me (Q₁-Q₃)

Показатели		Группы больных		
		T2-3N0, n=15	T2-3N1, n=8	T2-3N2, n=8
Экспрессия транскрипционных факторов, УЕ/мг белка в лунке	NF-kB p50	6,6 (2,2 — 17,0)	19,7 (11,8 — 30,8)*	5,2 (2,8 — 7,8)**
	NF-kB p65	9,2 (5,9 — 14,4)	12,5 (10,7 — 16,7)	8,7 (7,0 — 19,4)
	NF-kB p65/p50	1,6 (0,7 — 3,3)	0,6 (0,5 — 0,8)	2,5 (1,7 — 3,2)**
	HIF-1a	7,8 (4,6 — 21,1)	10,9 (10,8 — 16,7)	9,0 (6,5 — 14,6)

Примечание: * — значимость различий по сравнению с сравнению с группой N0, (p<0,05); ** — значимость различий по сравнению с сравнению с группой N1, (p<0,05);

Таблица 2. Однофакторный анализ прогностических параметров у больных ПКГШ (тест Гехана-Вилкоксона)

Показатели			выживаемость, р		
			безреци- дивная	безметас- татическая	общая
Экспрессия транскрип- ционных факторов. УЕ/мг белка в лунке	NF-kBp65	менее 9,6	0,28	0,04	0,10
		более 9,6			
	NF-kBp50	менее 7,8	0,37	0,02	0,30
		более 7,8			
	Коэф- фициент NF-kBp65/ p50	менее 1,39	0,14	0,63	0,19
		более 1,39			
	HIF-1a	менее 9,0	0,20	0,04	0,58
		более 9,0			
Содержание VEGF, пг/ мг белка		менее 81,7	0,06	0,28	0,42
		более 81,7			

Примечание: p — значимость различий; курсивом обозначены значимые связи при p<0,05;

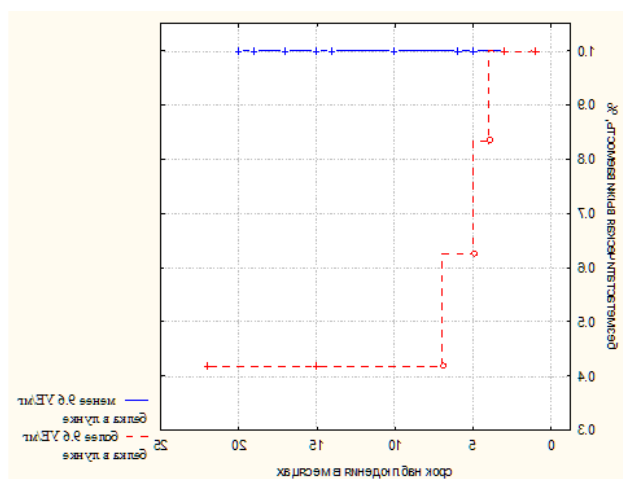


Рис.1. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня экспрессии NF-kBp65, равного 9,6 УЕ/мг белка в лунке

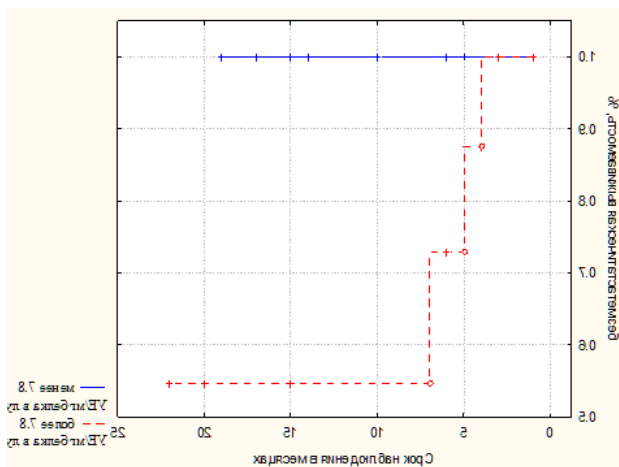


Рис.2. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня экспрессии NF-kBp50, равного 7,8 УЕ/мг белка в лунке

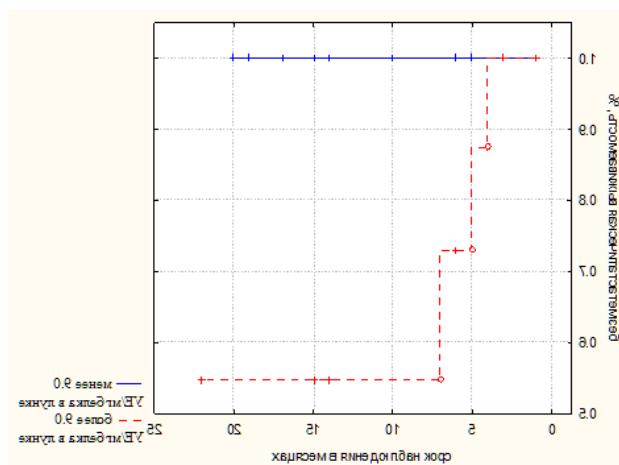


Рис.3. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ в зависимости от порогового уровня экспрессии HIF-1a, равного 9,0 УЕ/мг белка в лунке

Регуляция содержания транскрипционных факторов в ткани ПКГШ является конечным результатом активации внутриклеточных сигнальных систем, а также их взаимного влияния; значение имеют процессы фосфорилирования [5, 10]. Согласно нашим данным [2], как и наблюдениям других исследователей, заметную роль в процессе онкогенеза играет состояние внутриклеточного протеолиза, за счет которого возможна как деградация изучаемых факторов транскрипции, так и их активация. Выявлена взаимосвязь между химотрипсинподобной активностью протеасом и содержанием транскрипционных факторов NF-kB в плоскоклеточных карциномах головы и шеи. Вероятно, в опухолях головы и шеи одним из механизмов регуляции экспрессии транскрипционных факторов является протеасомная система.

Прогнозирование исходов онкологических заболеваний является важной задачей в прак-

тической онкологии. Склонность к раннему метастазированию данной формы рака во многом определяет неблагоприятный прогноз заболевания. Соответственно была исследована прогностическая значимость определения экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65, p50 и HIF-1 в оценке безрецидивной, безметастатической и общей выживаемости больных с помощью теста Гехана-Вилкоксона (табл. 2). В качестве пороговых значений изучаемых показателей был использован их средний уровень.

Связи безрецидивной и общей выживаемости больных ПКГШ с пороговыми уровнями экспрессии изучаемых транскрипционных и ростовых факторов обнаружено не было. Выявлено, с другой стороны, что безметастатическая выживаемость больных ПКГШ зависела от уровня экспрессии NF-κB p65, p50, а также HIF-1 в ткани опухоли. Более благоприятная безметастатическая выживаемость наблюдалась при уровнях экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65, p50 и HIF-1 менее 9,6, 7,8 и 9 УЕ/мг белка в лунке, соответственно (рис. 1, 2, 3). Распределение больных в сравниваемых группах по стадии заболевания, степени дифференцировки и возрасту больных было сопоставимым. Рост продукции данных факторов транскрипции является одним из механизмов онкогенеза, связанным с пролиферацией опухолевых клеток и их распространением в организме. Соответственно, снижение их уровня может являться маркером хорошего течения и прогноза заболевания.

В итоге исследования выявлена связь лимфогенного метастазирования с уровнем экспрессии транскрипционного фактора NF-κBp50 в плоскоклеточных раках головы и шеи, что обосновывает значимость изучаемого показателя в механизмах опухолевой прогрессии. Роль транскрипционных факторов NF-κBp65, NF-κBp50 и HIF-1 была выявлена при оценке их связи с прогнозом заболевания. Безметастатическая выживаемость больных ПКГШ увеличивалась при уровне экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65, p50, HIF-1 менее 9,6, 7,8 и 9 УЕ/мг белка в лунке, соответственно. Таким образом, экспрессия транскрипционных факторов является важным показателем, связанным с прогнозированием развития лимфогенных метастазов заболевания. Определение этих факторов в ткани ПКГШ позволит вы-

делять группы больных, характеризующихся высокой вероятностью возникновения лимфогенного метастазирования, оптимизировать сроки динамического наблюдения и, в случае прогрессирования заболевания, принять своевременные лечебные меры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клишо Е. В., Кондакова И. В., Чойнзонов Е.Л. и др. Прогностическая значимость определения металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи // Онкохирургия. — 2011. — № 1. — С. 17-22.
2. Чойнзонов Е.Л., Спирина Л.В., Кондакова И.В. и др. Роль внутриклеточных протеиназ в регуляции экспрессии транскрипционных факторов HIF-1, NF-κB и фактора роста сосудов при лимфогенном метастазировании плоскоклеточных карцином головы и шеи // Бюлл. СО РАМН. — 2012. — № 6. — С. 15-21.
3. Чойнзонов Е.Л., Чижевская С.Ю., Мусабаева Л.И. и др. Результаты комбинированного лечения больных раком гортани и гортаноглотки // Сиб. онкол. журнал. — 2012. — № 1 — С. 5-9.
4. Chen Z., Ricker J.L., Malhotra P.S. et al. Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-kappaB and activator protein-1 related mechanisms // Mol. Cancer Res. — 2008. — Vol. 7(7). — P. 1949-1960.
5. Conner J.R., Smirnova I.I., Moseman A.P., Poltorak A. IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-kappaB p50 // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). -2010. — Vol. 107(25). — P. 11477-11482.
6. Eckert A.W., Kappler M., Schubert J. et al. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients // Oral and Maxillofacial Surgery. — 2012. — Vol. 16. — P. 189-196.
7. Fillies T., Werkmeister R., Diest P.J. et al. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor // BMC Cancer. — 2005. — Vol. 5. — P. 84.
8. Hoffmann A., Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling // Immunol. Rev. — 2006. — Vol. 210. — P. 171-186.
9. Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy // Clin. Cancer Res. — 2007. — Vol. 13. — P. 7388-7393.
10. Wong W., Goehring A.S., Kapiloff M.S. et al. mAKAP compartmentalizes oxygen-dependent control of HIF-1alpha // Sci. Signal. — 2008. — Vol. 1 (51). — P. 18.
11. Yan M., XuQ., Zhang P. et al. Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma // BMC Cancer. — 2010. — Vol. 10. — P. 437.

*E.L.Choinzonov, L.V.Spirina, I.V.Kondakova,
D.A.Shishkin, S.Yu.Chizhevskaya*

Expression of the transcription factors NF- κ B and HIF-1 in squamous cell carcinomas of the head and neck: association with disease prognosis

Research Institute of Oncology of the Siberian Branch of
the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk

There was studied an expression of transcription factors NF- κ B p65, NF- κ B p50 and HIF-1 in the tissue of squamous cell carcinomas of the head and neck. An association of development of regional metastasis of the disease with increased expression of the transcription factor NF- κ B p50 was revealed. After treatment there were found relapses within 3 to 47 months in 10 patients, regional lymph node metastases in 3 patients, 12 patients died. Metastasis-free survival of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck depended on the threshold level of an expression of the transcription factors NF- κ B p65, p50, HIF-1 equal to 9.6, 7.8 and 9 CU/mg protein respectively.

Поступила в редакцию 01.07.2013