

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ

MOLECULAR BIOLOGY OF HEAD AND NECK CANCER

*Я. Клозар¹, Е. Ротнаглова^{1,2}, Е. Кослабова^{1,2}, Е. Хамсикова²,
М. Салакова², Я. Смахелова², Р. Такези²*

ФАКТОРЫ РИСКА И ПРОГНОЗА ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОЛОВЫ И ШЕИ НА ФОНЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

¹ Карловский университет, Прага, Чешская Республика

² Институт гематологии и переливания крови, Прага,
Чешская Республика

В Чешской Республике отмечается высокая заболеваемость раком полости рта и ротоглотки (МКБ-10: C01—C06, C09—10). Она достигает 12,2 на 100 000 мужчин и 3,1 на 100 000 женщин. В отличие от заболеваемости раком гортани заболеваемость раком полости рта и ротоглотки в последние годы растет. Хорошо известно, что факторами риска злокачественных новообразований головы и шеи являются курение и злоупотребление алкоголем. Эти новообразования являются полиэтиологическими. В их развитии могут также играть роль генетические факторы, особенности питания, образа жизни и профессиональные вредности. То же можно сказать и об онкогенных типах вируса папилломы человека (ВПЧ). Наиболее высокая частота выявления ВПЧ в ткани опухоли отмечена при раке ротоглотки. Цель исследования — выявить онкогенные типы ВПЧ при раке полости рта и ротоглотки, а также различия между ВПЧ-положительными и ВПЧ-негативными больными и оценить факторы прогноза относительно наличия ВПЧ в опухоли. В исследование включены 221 больной раком полости рта и ротоглотки и 196 здоровых лиц. Выявление и типирование ДНК ВПЧ проводили с помощью ПЦР и обратной гибридизации. Совместно анализировали факторы риска, проспективные клинические данные и наличие онкогенных типов ВПЧ в опухолевой ткани. Частота выявления онкогенных типов ВПЧ при раке полости рта была существенно ниже, чем при раке ротоглотки. Частота выявления онкогенных типов ВПЧ зависела также от локализации опухоли ротоглотки и была самой высокой при раке небной миндалины. Как и ожидалось, наиболее значимыми факторами риска оказались курение и злоупотребление алкоголем. Наличие ВПЧ также оказалось значимым фактором риска, особенно при раке небной миндалины. Общая выживаемость и выживаемость, определяемая основным заболеванием, были статистически достоверно выше у ВПЧ-положительных больных. Наиболее значимыми факторами прогноза оказались присутствие ВПЧ в опухоли, прорастание капсулы и размер опухоли.

Работа поддержана грантом NR/9466-3 Агентства по выдаче грантов Министерства здравоохранения Чешской Республики.

*J. Klozar¹, E. Rotnaglova^{1,2}, E. Koslabova^{1,2}, E. Hamsikova²,
M. Salakova², J. Smahelova², R. Tachezy²*

RISK AND PROGNOSTIC FACTORS IN SQUAMOUS CELL HEAD AND NECK CANCER AND HUMAN PAPILLOMA VIRUS INFECTION

¹ Charles University, Prague, Czech Republic

² Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague,
Czech Republic

The incidence of oral/oropharyngeal cancer (ICD-10: C01—C06, C9—10) is relatively high in the Czech Republic: 12.2 cases per 100,000 for men and 3.1 cases per 100,000 for women. In contrast to laryngeal cancer the incidence of these tumors increases in recent years. The well known risk factors of head and neck cancer are tobacco and alcohol. The etiology is multifactorial. Genetic factors, diet, life style and professional factors can also participate in the development of these cancers. High risk (HR) human papillomavirus (HPV) infection also plays an etiological role in a part of these tumors. The highest proportion of HPV-positive tumors is found in oropharynx. The aim of the study is to detect HR HPV and to identify the differences between the HPV-positive and HPV-negative patients. The second aim is to identify tumor prognostic factors regarding HPV-status. Two-hundred twenty-one patient with oral/oropharyngeal cancer and 196 healthy controls were enrolled. HPV DNA detection and typing were performed by PCR and reverse line blot hybridization. Risk factors, prospective clinical data, and the presence of HR HPV in tumor tissue were analyzed together. The prevalence of HPV DNA was significantly lower in oral than in oropharyngeal tumors. The presence of HR HPV was also different among different oropharyngeal locations with the highest prevalence in the tonsils. As expected the exposure to tobacco and alcohol were the most significant risk factors, but HPV presence was also a strong risk factor particularly in tonsillar cancer. HPV-positive patients had significantly better both overall and disease-specific survival rates than HPV-negative patients. The most significant prognostic factors were the presence of HPV in the tumor, extracapsular spread and tumor size.

Supported by grant NR/9466-3 of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

М. Кашлер, С. Гунди, Г. Жекели, Е. Ременар

МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВЫ И ШЕИ В ВЕНГРИИ

Национальный институт онкологии, Будапешт, Венгрия

Цель. Изучить маркеры генетической нестабильности (ГН) для оценки риска и раннего выявления плоскоклеточного рака головы и шеи — одной из трех самых частых причин смерти мужского населения Венгрии от злокачественных новообразований.

Материалы и методы. В 1996—2004 гг. в отделении хирургии головы и шеи Национального института онкологии (Будапешт) прооперированы 432 ранее не получавших лечение больных с гистологически верифицированным плоскоклеточным раком слизистой полости рта, ротоглотки, гортаноглотки и гортани II—IV стадий. Двести восемнадцать из 432 больных соответствовали критериям включения в данное исследование. В него были включены также 62 пациента, получавших стационарное лечение по поводу хронической патологии печени, обусловленной алкоголизмом, у которых не было злокачественных новообразований в анамнезе. Для контрольной группы были отобраны 218 здоровых лиц (из 1316 отобранных для более крупного исследования), соответствующих по возрасту, полу и анамнезу курения 218 онкологическим больным, а также 62 здоровых лица, соответствующих по тем же параметрам 62 больным алкоголизмом. Оценивали частоту спонтанных хромосомных aberrаций и число хроматидных разрывов на клетку, вызванных блеомицином. Оценку проводили в соответствии с требованиями ВОЗ и протоколом, описанным Hsu (1989), соответственно.

Результаты. Частота спонтанных хромосомных aberrаций была статистически достоверно выше у здоровых курильщиков (1,86%) по сравнению с некурящими (1,58%) ($p < 0,05$). Частота aberrаций в группе больных плоскоклеточным раком головы и шеи (2,61%) была на 40% выше, чем у курильщиков в контрольной группе (1,86%). Не было выявлено различий в числе хроматидных разрывов на клетку, вызванных блеомицином, между курильщиками ($1,02 \pm 0,45$) и некурящими ($1,06 \pm 0,49$). Однако их число в группе больных плоскоклеточным раком головы и шеи ($1,15 \pm 0,48$) было статистически достоверно выше по сравнению с обеими контрольными группами ($p < 0,05$). Чувствительность к действию мутагенов в группе больных алкоголизмом ($1,3 \pm 0,67$) оказалась даже выше, чем у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. Кроме того, отмечена высокая чувствительность к действию мутагенов (~ 50%) здоровых лиц, которая оказалась в 2,5 раза выше таковой в Европе и США.

Выводы. Показано, что высокая частота спонтанных хромосомных aberrаций является надежным маркером фенотипа плоскоклеточного рака головы и шеи.

M. Kasler, S. Gundy, G. Szekely, E. Remenar

MARKERS OF GENETIC INSTABILITY OF HEAD AND NECK CANCER PATIENTS IN HUNGARY

National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

Aim. To search markers of genetic instability (GI) for risk assessment and early detection of squamous cell cancer of head and neck (SCCHN), one of three most common cause of death from cancer among Hungarian males.

Material and methods. Four hundred thirty two previously untreated patients with histologically confirmed stage II—IV SCCHN of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx or larynx were operated at the Head and Neck Surgery Department of National Institute of Oncology (Budapest) in 1996—2004. Two hundred eighteen of 432 were eligible to fulfill our criteria to participate in an analysis with matched controls. Sixty two persons treated in hospitals for chronic alcoholic liver disease without known earlier or current history of cancer were also included in the study. Besides we chose 218 healthy controls (out of 1316 selected for larger study) to match 218 cancer patients in age, sex and smoking habits, and 62 healthy controls to match 62 alcoholic patients. Spontaneous chromosome aberrations (%) and bleomycin-induced chromatid breaks / cell (b/c) were assessed, according to the WHO requirements and to the protocol described by Hsu (1989) respectively.

Results. Number of spontaneous chromosome aberrations was significantly ($p < 0,05$) higher in unselected healthy smokers (1.86%) comparing to non-smokers (1.58%). Unselected SCCHN group revealed 40% higher aberration rate (2.61%) than the smoking controls (1.86%). However, no difference was found in bleomycin-induced b/c between smokers (1.02 ± 0.45) and non-smokers (1.06 ± 0.49), but SCCHNs (1.15 ± 0.48) differed significantly ($p < 0,05$) from both groups of controls. In the matched control analysis the mutagen sensitivity of alcoholics (1.3 ± 0.67) was even higher than in SCCHN patients. Additionally, high ratio of mutagen sensitivity (~ 50%) of healthy Hungarians was detected, which is 2.5-fold higher than published so far in Europe and US.

Conclusions. Elevated rate of spontaneous chromosome aberrations proved to be reliable marker of the SCCHN phenotype.

Е. Клишо

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ И ИХ ЭНДОГЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ ИНДУКТОРОМ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОЛОВЫ И ШЕИ

НИИ онкологии СО РАМН, Томск, Российская Федерация

Иммуногистохимическим методом исследована экспрессия матриксных металлопротеаз ММП-1, -2, -9, их эндогенных ингибиторов ТИМП-1, -2 и индуктора экстраклеточных матриксных металлопротеаз (EMMPRIN) в опухолевой ткани у 50 больных плоскоклеточным раком головы и шеи T1—3N0—3M0. Экспрессия ТИМП-1 и ММП-1 опухолевыми клетками и стромой была распределена неравномерно: ММП-1 экспрессировалась преимущественно стромой, а ТИМП-1 — преимущественно опухолевыми клетками ($p < 0,01$). Выявлена связь между экспрессией EMMPRIN на поверхности опухолевых клеток и содержанием ММП-2, -9 и ТИМП-2 в строме ($p = 0,02$). При высокодифференцированном раке экспрессия EMMPRIN стромой была выше, чем при умереннодифференцированном ($p < 0,05$). В отличие от высоко- и умереннодифференцированного рака при низкодифференцированном в строме была выше экспрессия ММП-2 и ТИМП-2 ($p < 0,05$). Экспрессию маркеров изучали в 6 морфологических структурах: (1) структуры с ороговением в центре; (2) клетки шиповатого типа; (3) клетки базалиоидного типа; (4) низкодифференцированные структуры; (5) поверхностный многослойный плоский эпителий; (6) комплексы клеток. Экспрессия EMMPRIN комплексами клеток была достоверно меньше, чем его экспрессия остальными структурами ($p < 0,001$). Наиболее выражена была экспрессия EMMPRIN клетками базалиоидного типа. Она была достоверно выше его экспрессии низкодифференцированными структурами ($p < 0,005$). В свою очередь, экспрессия EMMPRIN клетками шиповатого типа оказалась достоверно выше его экспрессии структурами с ороговением в центре ($p < 0,005$). Экспрессия EMMPRIN мембранами клеток структур с ороговением и клеток шиповатого типа была выше у больных с метастазами в лимфатических узлах ($p < 0,03$), что свидетельствует об участии EMMPRIN в прогрессии опухолей головы и шеи.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-00616).

Е. Тимонина

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ

ГУ ДПО РМАПО Росздрава, РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, Российская Федерация

Для выявления микрометастазов в костном мозге у больных плоскоклеточным раком головы и шеи применены современные методы молекулярной диагностики — исследование экспрессии гена *E48* методом полимеразной цепной реакции с

Е. Клишо

REGULATION OF EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEASES AND THEIR ENDOGENOUS INHIBITORS BY EXTRACELLULAR MATRIX METALLOPROTEASE INDUCER IN SQUAMOUS-CELL HEAD AND NECK CANCER

Cancer Research Institute SD RAMS, Tomsk, Russian Federation

Expression of matrix metalloproteases MMP-1, -2, -9, their endogenous inhibitors TMPI-1, -2 and extracellular matrix metalloprotease inducer (EMMPRIN) was studied immunohistochemically in tumor tissue from 50 patients with squamous-cell head and neck cancer T1—3N0—3M0. Tumor cell and stromal TMPI-1 and MMP-1 expression was distributed unevenly, with MMP-1 expression seen mainly in stroma and TMPI-1 expression mainly detected on tumor cells ($p < 0.01$). EMMPRIN expression on tumor cells was related with stromal MMP-2, -9 and TMPI-2 expression ($p < 0.02$). Stromal EMMPRIN expression was higher in well differentiated than in moderately differentiated carcinomas ($p < 0.05$). Poorly differentiated carcinomas demonstrated higher stromal expression of MMP-2 and TMPI-2 unlike moderately and well differentiated carcinomas ($p < 0.05$). The marker expression was studied in 6 morphological structures, such as (1) structures with central keratinization, (2) prickle cells, (3) basalioid cells, (4) poorly differentiated structures, (5) surface multilayer squamous epithelium and (6) cell clusters. EMMPRIN expression by cell clusters was significantly lower than by the remaining structures ($p < 0.001$). The highest EMMPRIN expression was seen on basalioid cells. It was significantly higher than the marker expression by poorly differentiated structures ($p < 0.005$). In turn, EMMPRIN expression on prickle cells was significantly higher than in structures with central keratinization ($p < 0.005$). EMMPRIN expression on cell membranes of structures with central keratinization and on prickle cells was higher in cases with lymph node metastases ($p < 0.03$), which is indicative of EMMPRIN involvement in progression of head and neck cancer.

The study was supported by the RFFI (grant 08-04-00616).

Е. Тимонина

BONE MARROW MOLECULAR STUDY IN PATIENTS WITH SQUAMOUS-CELL HEAD AND NECK CANCER

RMAPGE, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow, Russian Federation

Modern molecular diagnosis methods involving study of gene *E48* expression by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect bone marrow micrometastases in patients with squamous-cell head and neck cancer. The following techniques were used to increase RT-PCR sensitivity: product devel-

обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). С целью повышения чувствительности ОТ-ПЦР на модельной системе — клеточной линии А431 — использовано следующее: проявление продукта ДНК-красителем SYBR, Саузерн-блоттинг с иммуоферментным (ECL) или иммуофлюоресцентным проявлением (FITC, сканирование на «Typhoon 9440») включенного BRDU, радиомечение ³²P-цитозинном с Саузерн-блоттингом и радиоавтографией. Оптимальным явился радиоактивный метод, однако применение ³²P имеет ряд ограничений. Чувствительность метода с иммуоферментным проявлением соответствует чувствительности метода детекции мРНК с радиоактивной гибридизацией по ³²P. Исследование проведено у 19 больных. У 2 больных РНК была низкого качества (не было сигнала бета-глобина). У 6 из оставшихся 17 больных выявлен продукт экспрессии гена *E48* (35,3%). Наличие микрометастазов в костном мозге (КМ+) определялось при значительном регионарном метастазировании. Двое больных неороговевающим плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта (T4N0M0, КМ– и T4N3M0, КМ+) умерли от прогрессирования заболевания после комплексного лечения (через 6 и 9 мес). В группе КМ+ выявлено 2 рецидива заболевания через 6 мес после лечения. Статистически достоверной корреляции между КМ+ и распространенностью первичной опухоли, ее локализацией, степенью дифференцировки плоскоклеточного рака, а также полом и возрастом больных не выявлено. Накопление клинических наблюдений и опыта диагностики микрометастазов в костном мозге расширит наше представление об истинном распространении плоскоклеточного

рака. Сопоставление с SYBR DNA dye, Southern blotting with enzyme immunodevelopment (ECL) or immunofluorescent development (FITC, scan using a Typhoon 9440) of incorporated BRDU, ³²P-cytosine redilabeling with Southern blotting and radioautography. The radioactive method appeared optimal, though use of ³²P-cytosine has certain limitations. Sensitivity of the technique with enzyme immunodevelopment was compatible with that of mDNA detection with ³²P radioactive hybridization. The study was made in 19 patients. RNA from 2 cases was of low quality (no beta-globin signal). *E48* expression product was detected in 6 of the remaining 17 patients (35.3%). Bone marrow metastases (BM+) were found in cases with marked regional involvement. Two patients with non-keratinizing squamous-cell oral cancer (T4N0M0, BM– and T4N3M0, BM+) died from disease progression after multimodality treatment (at 6 and 9 months). In the BM+ group 2 patients developed disease recurrence at 6 months following treatment. BM+ status was not statistically significantly related to advance or site of the primary, degree of differentiation of squamous-cell carcinoma, patient gender or age. Observation of more clinical cases and greater experience in the diagnosis of bone marrow micrometastasis will enlarge our knowledge of true advance of squamous-cell head and neck cancer.