

УДК: 616. 22-006. 6

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD44V6
В ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОРТАНИ**

Р. Н. Кулагин, С. В. Петров, А. Р. Уткузов

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE EXPRESSION OF CD44V6
IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE LARYNX**

R. N. Kulagin, S. V. Petrov, A. R. Utkuzov

ГОУ ВПО «Казанский медицинский университет Росздрава»

(Ректор – проф. А. С. Созинов)

Республиканский клинический онкологический диспансер

МЗ Республики Татарстан, г. Казань

(Главный врач – проф. Р. Ш. Хасанов)

Материалом для иммуногистохимического исследования служили парафиновые срезы 65 случаев плоскоклеточного рака. Для исследования использовалось антитело CD44v6 (клон VFF-7). Нами обнаружена наименьшая экспрессия исследуемого маркера в подсвязочных и надсвязочных опухолях, а наибольшая – в 4-ой T-стадии. Не выявлена статистическая значимая связь со степенью дифференцировки, клинической стадией заболевания и регионарными метастазами. В группе с рецидивами обнаружено статистическое снижение экспрессии CD44v6. CD44v6 является достоверным маркером опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: рак гортани, иммуногистохимия, CD44v6, прогноз.

Библиография: 24 источника.

65 cases (biopsy and operation material) of squamous laryngeal cancer were analyzed using of monoclonal antibody CD44v6 (clone VFF-7). There was a significant correlation between CD44v6 expression and supraglottic tumors and tumor stage (T). No relationship was observed with histologic differentiation, clinical stage and nodal metastasis. Decreased CD44v6 expression correlated with increased recurrence rates. Our results suggest that CD44v6 expression is an important prognostic factor in laryngeal cancer.

Key words: laryngeal cancer, immunohistochemistry, CD44v6, prognosis.

Bibliography: 24 references.

Плоскоклеточный рак гортани составляет примерно 2% от всех злокачественных заболеваний человека, а среди опухолей головы и шеи занимает первое место и встречается в 95–96% случаев злокачественных новообразований. В настоящее время для оценки клинического поведения заболевания используются традиционные клинико-анатомические критерии: TNM-классификация, гистологическая дифференцировка и наличие метастазов в лимфатические узлы. Однако, даже комплексная оценка стандартных критериев не всегда позволяет оценить биологическое поведение опухоли. По этой причине в мире ведется поиск новых прогностических маркеров.

CD44v6 является одной из изоформ трансмембранного гликопротеина CD44, который кодируется геном, расположенным в хромосомном локусе 11p13. Адгезивные молекулы CD44 осуществляют многие функции, включая хоминг лимфоцитов, стимуляцию ангиогенеза и метастазирование. Исследованию прогностического значения экспрессии CD44v6 в различных опухолях человека посвящено ряд работ, результаты которых противоречивы. По данным одних авторов сверх-экспрессия исследуемого маркера коррелирует с плохим прогнозом при раке толстой кишки, раке головы и шеи, раке пищевода, шейки матки и молочной железы [3,5,9,12,18,21]. Другие показали, что в широком ряде опухолей, включая плоскоклеточный рак гортани, корреляция положительная или отсутствует вовсе [7, 8, 10, 11, 14].

Целью нашего исследования явилось исследование прогностического значения экспрессии CD44v6 в плоскоклеточном раке гортани.



Материалы и методы

Материалом для иммуногистохимического исследования служили парафиновые срезы 65 случаев плоскоклеточного рака, полученных во время операций от больных, леченных в Республиканском клиническом онкологическом диспансере с 1994г. по 2002 г. При оценке каждого случая учитывались возраст больных, локализация и распространение опухоли (Т-стадия), наличие или отсутствие метастазов и рецидивов, гистологическая структура и стадия опухоли в соответствии с системой TNM (табл. 1). Степень последней оценивали по стандартным критериям [1].

Таблица 1

Распределение больных по полу, возрасту, клинической стадии, гистопатологической градации и локализации опухоли в гортани

	Число пациентов	(%)
Всего	65	100
Возраст:		
≤ 40	4	6,2
≤ 60	27	41,5
> 60	34	52,3
Клиническая стадия:		
I стадия	10	15,4
II стадия	20	30,8
III стадия	21	32,3
IV стадия	14	21,5
Распространение опухоли (Т-стадия):		
I стадия	10	15,4
II стадия	27	41,5
III стадия	17	26,1
IV стадия	11	17
Степень дифференцировки опухоли		
G1	18	27,7
G2	20	30,8
G3	27	41,5
Локализация в полости гортани:		
над связками	20	30,8
голосовые связки	22	34
подсвязочное пространство	4	6
трансларингиально*	19	29,2
Рецидивы:		
есть	6	9,2
нет	59	90,8
Регионарные метастазы:		
есть	13	20
нет	52	80

Примечание: * – опухоль занимает два и более отдела в полости гортани.

Для исследования использовалось антитело CD44v6 (клон VFF-7). В каждом случае вычислялся процент окрашенных клеток. Для этого были подсчитаны 1000 клеток в 10 полях зрения с увеличением x400. В качестве системы визуализации применяли стрептавидин-биотиновый метод в наборе LSAB+ (DAKO), пероксидазу проявляли раствором диаминобензидина или аминоэтилкарбазола. Статистическую обработку проводили с помощью критерия Стьюдента.

Результаты

Исследуемая группа включала в себя 63 мужчины и 2 женщины в возрасте от 36 до 78 лет (средний возраст – 59,2). Комбинированному лечению после установления диагноза (облучение + операция) подверглись 40 больных (61,5%). 5-ти летняя выживаемость в исследованной группе составила 46,2%.

В нормальном плоском неороговевающем эпителии экспрессия CD44v6 обнаружена в нижней и средней трети пласта в виде мембранного окрашивания цитолеммы (рис. 1). В дисплазиях окрашивались все слои. В плоскоклеточном раке гортани исследуемый маркер обнаружен во всех случаях (рис. 2). Среднее значение CD44v6 в исследуемых опухолях больше, чем в нормальном эпителии, но статистических различий не обнаружено ($74,78 \pm 2,18$ и $72,96 \pm 2,3$ соответственно). В ряде случаев обнаружено равномерное окрашивание цитолеммы всех опухолевых клеток, в других – прерывистое, но также 100% окрашивание клеток. В высокодифференцированных опухолях (G1) в «раковых жемчужинах» реакция маркера отсутствовала. Отмечена более интенсивная реакция по границе опухолевой инвазии и в клетках или в группах клеток и даже небольших гнездах, лежащих отдельно от опухолевого пласта. Кроме того обнаружено, что клетки, находящиеся в центре опухолевого гнезда (небазальные), окрашивались менее интенсивно, чем клетки, лежащие по периферии (базальные).

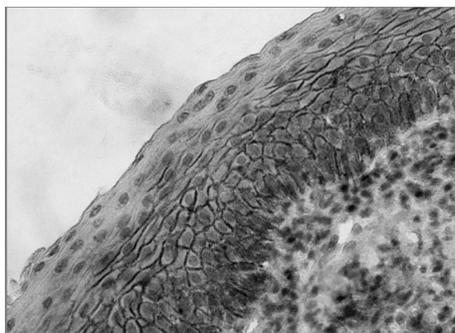


Рис. 1. Экспрессия CD44v6 в нижней и средней трети нормального многослойного плоского эпителии гортани. LSAB+ - метод. Хромоген – диаминбензидин, x400.

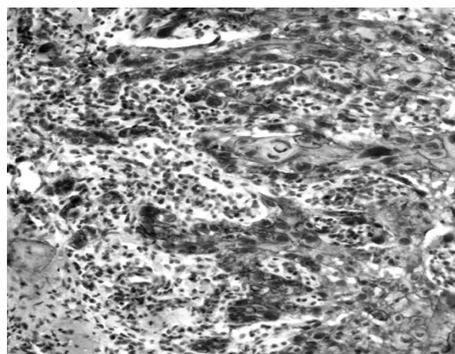


Рис. 2. Мембранная реакция CD44v6 в инвазивном плоскоклеточном раке гортани. LSAB+ - метод. Хромоген – диаминбензидин, x400.

В группе умерших больных средняя экспрессия маркера межклеточной адгезии ниже ($72,15 \pm 3,72$), чем у больных, проживших 5 и более лет ($77,86 \pm 3,1$), но без достоверной корреляции ($p > 0,05$). Экспрессия CD44v6 имела статистически достоверную тенденцию к уменьшению с возрастом в исследуемых группах больных. Наибольший средний процент окрашенных клеток ($87,43 \pm 6,38$) отмечен в группе до 40-ка лет, наименьший ($70,39 \pm 3,77$) – после 60-ти лет. Нами обнаружена наименьшая экспрессия исследуемого маркера в подсвязочных и надсвязочных опухолях. Не выявлена статистическая значимая связь со степенью дифференцировки. Наименьшая средняя экспрессия CD44v6 ($69,61 \pm 4,92$) оказалась в умеренно



дифференцированных, наибольшая ($78,03 \pm 3,27$) – в низкодифференцированных опухолях. Анализ стадий заболеваний так же не показал статистических различий, однако, сверх-экспрессия маркера обнаружена в первой клинической стадии ($81,53 \pm 6,15$). В группе с рецидивами обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение экспрессии CD44v6. У больных с метастазами в шейные лимфатические узлы средний процент окрашенных опухолевых клеток составил в первичной опухоли $68,23 \pm 8,01$, а без метастазов – $76,42 \pm 2,29$ ($p > 0,05$). При сравнении T-стадии обнаружены статистически достоверные различия ($p < 0,05$) между 2-ой и 4-ой стадиями. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Корреляция средней экспрессии CD44v6 с клиничко-анатомическими параметрами, исследуемых опухолей

	Экспрессия CD44v6 M\pmm, %	p
Возраст:		
≤ 40	87,43 \pm 6,38	p1 ^a <0,05
≤ 60	78,44 \pm 3,3	
> 60	70,39 \pm 3,77	
Клиническая стадия:		Не достоверно
I стадия	81,53 \pm 6,15	
II стадия	70,8 \pm 4,63	
III стадия	75,6 \pm 4,8	
IV стадия	74,44 \pm 5,76	
Распространение опухоли (T-стадия):		
I стадия	81,53 \pm 6,15	
II стадия	69,38 \pm 4,23	
III стадия	72,44 \pm 3,96	
IV стадия	85,54 \pm 5,87	p2<0,05
Степень дифференцировки опухоли		Не достоверно
G1	75,67 \pm 4,88	
G2	69,61 \pm 4,92	
G3	78,03 \pm 3,27	
Локализация в полости гортани:		
над связками	67,59 \pm 4,92	
голосовые связки	81,81 \pm 2,89	p3<0,05
подсвязочное пространство	63,78 \pm 14,85	
трансларингиально ^б	76,54 \pm 3,9	
Рецидивы:		
есть	58,53 \pm 7,57	p4<0,05
нет	76,44 \pm 2,29	
Регионарные метастазы:		Не достоверно
есть	68,23 \pm 8,01	
нет	76,42 \pm 2,29	

Примечание: а – p1 – статистические различия экспрессии CD44v6 между больными ≤ 40 лет и > 60 -ти лет, p2 – между T2 и T4 стадиями, p3 – надсвязочными опухолями и опухолями голосовых связок, p4 – в группе больных с рецидивами и без них; б – опухоль занимает два и более отдела в полости гортани.

Обсуждение

Исследование близлежащего к опухоли нормального плоского эпителия гортани показало, что экспрессия CD44v6 обнаруживается в базальном и супрабазальном слоях. Окраска нормальной нижней трети эпителия и всех слоев умеренной и тяжелой дисплазиях описаны рядом исследователей [14, 15, 18]. Увеличение процента окрашенных клеток в предопухолевых процессах и раке *in situ* доказывает сверх-экспрессию CD44v6 на ранних стадиях канцерогенеза. В инвазивном плоскоклеточном раке гортани процент окрашенных опухолевых клеток, в сравнении с нормальным эпителием, очень вариабелен. В нашем исследовании он колебался от 12% до 100%, средний процент окрашенных клеток составлял почти 75%, что несколько превышает средний процент в нормальном эпителии (73%). Наши данные согласуются с R. Gaspar с соавт. [13], однако, [10,17] указывают на снижение среднего процента окрашенных опухолевых клеток по сравнению с нормой без статистических различий.

Прогностическое значение экспрессии CD44v6 в литературе достаточно часто исследовалось в разнообразных опухолях человека. Ряд авторов указывают на то, что экспрессия CD44v6 коррелирует с плохим прогнозом течения заболевания [3,5,9]. Другие, напротив, связывают с хорошим – в аденокарциномах легкого, раке шейки матки и раке головы и шеи [10, 11, 24].

В литературе экспрессию CD44v6 связывают с метастатическим потенциалом, так как впервые был обнаружен в метастазах клеточной линии рака поджелудочной железы крыс [2]. В раке гортани [13, 16] обнаружили сверх-экспрессию CD44v6 в опухолях с метастазами в регионарные лимфатические узлы без статистических различий. Другие авторы [8, 19], напротив, отметили снижение экспрессии исследуемого маркера, а [20], изучив 89 опухолей головы и шеи, показал, что снижение экспрессии CD44v6 коррелирует с развитием метастазов. Это согласуется и с данными M. F. Spafford и соавт [10]. В нашем исследовании средний процент окрашенных клеток плоскоклеточного рака гортани с метастазами в лимфатические узлы шеи ниже, чем в опухолях без метастазов ($p>0,05$).

Ряд авторов [13,18], исследовав первичные опухоли и их метастазы, обнаружили статистически недостоверное увеличение окрашенных клеток в метастазах. Так, K. K. Tanabe и соавт. [23] показали, что экспрессия CD44v6 была обнаружена в 80% опухолей толстой кишки и в 100% метастазов. Полученные результаты также указывают на роль маркера в прогрессии опухоли.

Изучение клинической стадии заболевания (TNM) и распространенности опухоли (T-стадия) показало наличие статистических различий экспрессии CD44v6 между T2 и T4 стадиями ($p<0,05$), причем наименьшие средние значения исследуемого маркера обнаружены во вторых стадиях. Это согласуется с данными [12], которые указывали на корреляцию с клинической стадией заболевания и размером опухоли. Однако, другие авторы [8,10,18] не обнаружили этой связи.

Снижение экспрессии CD44v6 коррелирует со снижением степени дифференцировки в опухолях головы и шеи [19,20]. Подобные результаты показаны при исследовании надсвязочных опухолей гортани [8]. В нашем исследовании наименьший процент окрашенных клеток обнаружен в умеренно дифференцированных опухолях, а наибольший – в низкодифференцированных ($p>0,05$).

В литературе описана разнообразная экспрессия CD44v6 в опухолевых пластах плоскоклеточного рака гортани [10,18]. Было обнаружено окрашивание всех опухолевых гнезд, а так же преимущественно выборочное окрашивание: по краю опухолевых гнезд или базальное окрашивание, в центре гнезд, а так же интенсивное окрашивание отмечено в зонах инвазии. И только G. Guler и соавт. [18] показали статистическое снижение свободного периода выживаемости при окраске небазальных клеток в 90 и более%, что доказывает (по их мнению) сверх-экспрессию CD44v6 в прогрессии рака гортани.

Нами обнаружено, что процент окрашенных клеток CD44v6 статистически ниже в группе больных с рецидивами ($p<0,05$). T. Kawano и соавт. [12] так же показали снижение экспрессии маркера, но без статистических различий.

В наших исследованиях отмечено, что экспрессия исследуемого маркера у умерших больных ниже, чем у пациентов, проживших 5 и более лет ($p>0,05$). Также не обнаружены статистические различия в других исследованиях [8, 10, 16, 17].



Ряд авторов [8, 22] не нашли статистически значимых различий между локализацией опухоли и возрастом. По нашим данным наибольшая средняя экспрессия маркера межклеточной адгезии отмечена в группе больных до 40-ка лет, а опухоли голосовых связок имели статистически достоверно наибольшие показатели CD44v6.

Экспрессию маркера необходимо изучать в дальнейшем, так как CD44v6 в нашем исследовании выявляется в 100% опухолей, а также по данным [4] является индикатором чувствительности к химиотерапии в раке шейки матки, что позволяет предположить о возможном использовании выявления маркера в качестве направленной терапии. Группой австрийских ученых под руководством Х. К. Хайнца и др (Heider K. H. et al.) [6] был предложен новый метод лечения плоскоклеточного рака, который основан на связывании молекулы антитела на эпитопе, кодируемым варибельным экзоном v6 CD44.

Выводы:

1. CD44v6 является достоверным маркером опухолевой прогрессии.
2. Моноклональные антитела против CD44v6 следует использовать в комплексе с рутинными окрасками для предварительной морфологической диагностики плоскоклеточного рака гортани.
3. Наличие реакции против CD44v6-антигена в ткани опухоли необходимо учитывать при назначении комплексного лечения и прогнозирования заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник по классификации злокачественных опухолей / Перевод с английского – С.-Пб.: Медакадемия, 2007. 432 с.
2. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells / U. Gunthert [et al.] // Cell. – 1991. – Vol. 65. – P. 13–24.
3. CD44 is an independent prognostic factor in early-stage cervical cancer / P. Speiser [et al.] // Int. J. Cancer (Pred. Oncol.). – 1997. – Vol. 74. – P. 185–188.
4. CD44 isoform 6 (CD44v6) is a prognostic indicator of the response to neoadjuvant chemotherapy in carcinoma / S. Costa [et al.] // Gynecol Oncol. – 2001. – Vol. 80. – P. 67–73.
5. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival / M. Kaufmann [et al.] // Lancet. – 1995. – Vol. 345. – P. 615–619.
6. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy / K. H. Heider [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. – 2004. – Vol. 53. – P. 567–579.
7. Characterization of CD44v6 isoforms in head and neck squamous cell carcinoma / N. L. van Hal [et al.] // Int. J. Cancer. – 1999. – Vol. 82. – P. 837–45.
8. Clinicopathologic significance of expression of CD44s and CD44v6 isoforms in squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx / J. P. Rodrigo [et al.] // Am J Clin Pathol. – 2002. – Vol. 118(1). – P. 67–72.
9. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6 containing CD44 proteins / J. M. R. Mulder [et al.] // Lancet. – 1994. – Vol. 344. – P. 1470–1472.
10. Correlation of markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma / M. F. Spafford [et al.] // Arch Otorhinolaryngol Head Neck Surg. – 1996. – Vol. 122. – P. 627–632.
11. Expression of CD44 in human lung tumors / M. B. Penno [et al.] // Cancer Res. – 1994. – Vol. 54. – P. 1381–1387.
12. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer / T. Kawano [et al.] // Auris Nasus Larynx. – 2004. – Vol. 31. – P. 35–41.
13. Gaspar R. H., Toyos J. R., Marcos C. A. Quantitative immunohistochemical analyses of the expression of E-cadherin, thrombomodulin, CD44H and CD44v6 in primary tumours of pharynx/larynx squamous cell carcinoma and their lymph node metastases // Analytical Cellular Pathology. – 1999. – Vol. 18. – P. 183–190.
14. Mack B., Gires O. CD44s and CD44v6 Expression in Head and Neck Epithelia // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, N10. – e3360.
15. OPN/CD44v6 overexpression in laryngeal dysplasia and correlation with clinical outcome / S. Staibano [et al.] // Br J Cancer. – 2007. – Vol. 97, N11. – P. 1545–1551.
16. Sikorska B., Danilewicz M., Wagrowska-Danilewicz M. Prognostic significance of CD44v6 and nm23 protein immunoeexpression in laryngeal squamous cell carcinoma // Pol J Pathol. – 2002. – Vol. 53, N1. – P. 17–24.
17. Prognostic significance of the expression of adhesion molecules E-cadherin, CD44s and CD44V6 in supraglottic squamous carcinoma / J. P. Rodrigo [et al.] // Acta Otorrinolaringol Esp. – 2003. – Vol. 53, N10. – P. 745–51.
18. Prognostic value of CD44 variant 6 in laryngeal epidermoid carcinomas / G. Guler [et al.] // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2002. – Vol. 128, N4. – P. 393–7.
19. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells / T. Suokka [et al.] // Cancer Res. – 1997. – Vol. 57. – P. 2281–9.
20. Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma / M. Kanke [et al.] // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2000. – Vol. 126. – P. 1217–23.
21. Significance of immunohistochemical over-expression of CD44v6 as an indicator of malignant potential in esophageal squamous cell carcinoma / T. Nozoe [et al.] // J Cancer Res Clin Oncol. – 2004. – Vol. 130. – P. 334–338.



22. Soluble CD44 standard, CD44 variant 5 and CD44 variant 6 and their relation to staging in head and neck cancer / T. Kawano [et al.] // Acta Oto-Laryngologica. – 2005. – Vol. 125. – P. 392–397.
23. Tanabe K. K., Ellis L. M., Saka H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases / Lancet. – 1993. – Vol. 341. – P. 725–726.
24. Uhi-Steidt M., Huy V. Q., Muller-Holzner E. CD44 splice variant expression in normal and malignant uterine cervical epithelium // Int J Gynecol Cancer. – 1998. – Vol. 8. – P. 460–466.

Кулагин Роман Николаевич – доцент каф. патологической анатомии Казанского ГМУ. 420012, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, 49а. тел: 8-927-407-25-90. Эл почта: rnkulagin@gmail.com; **Петров** Семен Венедиктович – профессор кафедры патологической анатомии Казанского ГМУ, зав. лабораторией иммуногистохимической диагностики опухолей патологоанатомического отделения Республиканского клинического онкологического диспансера (РКОД) МЗ РТ. 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49а. тел. 8-917-273-75-81. Эл почта: semuopr@mail.ru; **Уткузов** Анас Рифатович – доцент каф. челюстно-лицевой хирургии Казанского ГМУ, зав. поликлиникой №1 РКОД МЗ РТ. тел: 8-917-269-57-45. Эл почта: utkuz@rambler.ru

УДК: 616.216.1-002.036.12:615.33|+612.223.12

ПРИМЕНЕНИЕ ОЗОНА И ЛИМФОТРОПНОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ ГНОЙНЫМИ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМИ СИНУСИТАМИ

О. Е. Малышева

APPLICATION OF OZONE AND LYMPHOTROPIC ANTIBACTERIAL THERAPY AT PATIENTS WITH THE CHRONIC PURULENT MAXILLARY SINUSITIS

O. E. Malysheva

ГУЗ «Новгородская областная клиническая больница» г. Великий Новгород
(Главный врач – канд. мед. наук А.И. Хорошевская)

Проведен сравнительный анализ традиционного лечения и лимфотропной антибактериальной терапии в сочетании с озоном у больных хроническим верхнечелюстным синуситом. Под наблюдением находилось 94 пациента, в возрасте от 23 до 74 лет. Сочетанное использование озонотерапии и лимфогенной антибиотикотерапии дает возможность в значительной степени повысить эффективность лечения, сократить сроки госпитализации и уменьшить расходование лекарственных препаратов. Данный метод лечения является современным, высокоэффективным и безопасным.

Ключевые слова: верхнечелюстной синусит, озонотерапия, лимфотропная антибактериальная терапия, традиционное лечение.

Библиография: 18 источников.

The comparative analysis of traditional treatment and lymphotropic antibacterial therapy in a combination with ozone at patients with a chronic maxillary sinusitis is carried out. Under supervision there were 94 patients, at the age from 23 till 74 years. The combined use of ozone therapy and lymphogenic antibiotic therapy makes it possible to greatly improve treatment rates, reduce terms of hospitalization and reduce an expenditure of medicinal drugs. The given method of treatment is modern, highly effective and safe.

Key words: maxillar sinusitis, ozone therapy, lymphotropic antibacterial therapy, classic treatment.

Bibliography: 18 sources.

На сегодняшний день воспалительные заболевания носа и околоносовых пазух относятся к числу наиболее распространенных видов патологии верхних дыхательных путей [7; 8; 11]. На долю верхнечелюстного синусита приходится 56–73% [3; 10]. Несмотря на успехи