

На правах рукописи

СТУКАНЬ Анастасия Игоревна
КЛИНИКО-ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВПЧ-СТАТУСА,
МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ПРИ
ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ
14.01.12-онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону - 2019

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ УЧРЕЖДЕНИИ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КУБАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ректор – доктор медицинских наук С.Н. Алексеенко)

- Научный руководитель:** доктор медицинских наук
Бодня Вадим Николаевич
- Научный консультант:** доктор медицинских наук, профессор, академик РАН
Порханов Владимир Алексеевич
- Официальные оппоненты:** **Мудунов Али Мурадович** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий хирургическим отделением №11 опухолей головы и шеи
- Кутукова Светлана Игоревна** – кандидат медицинских наук, Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городской клинический онкологический диспансер», врач–онколог 11 онкологического отделения (химиотерапевтического)
- Ведущая организация:** Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.208.083.02 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.rnioi.ru федерального государственного бюджетного учреждения «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан: «___» _____ 2019 г.

Учёный секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
доктор биологических наук, доцент

Е.А. Дженкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает пятое место по распространённости среди раковых заболеваний в мире (Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A., 2015). Общемировая проблема лечения рака этой локализации заключается в выявлении местнораспространённых форм ввиду поздней диагностики и высоких показателях летальности, что диктует необходимость поиска предиктивных и прогностических молекулярных маркеров (Каприн А.Д., 2018, Ferlay J., 2010, Rautava J., Syrjänen S., 2012).

Наиболее важными факторами риска развития ПРГШ являются курение табака и употребление алкоголя. Однако все больше данных указывают на взаимосвязь этого рака с инфицированностью вирусом папилломы человека (ВПЧ) (Worsham M.J. et al., 2014). Установлено, что ВПЧ в большей степени оказывает канцерогенное влияние на развитие орофарингеального плоскоклеточного рака (ОФПКР) у молодых пациентов без традиционных факторов риска (Gillison M.L. et al., 2000, Bajos N. et al., 2010, Abogunrin S. et al., 2014, Jiron J. et al., 2014, Lopez R.V. et al., 2014). Обнаружение ВПЧ 16 типа при орофарингеальном раке достигает 50-90% (Doorbar J., 2012).

Значимым достижением последнего десятилетия явилось клиническое разделение больных ОФПКР на группы по ВПЧ-статусу. Несмотря на то, что вопрос детекции ВПЧ-статуса дискуссионен, на первом этапе всем больным рекомендовано определять суррогатный маркер ВПЧ-статуса p16 для адекватного стадирования заболевания по классификации TNM 8 пересмотра (Lewis J.S. et al., 2017, NCCN Guidelines, 2019).

Степень разработанности темы

Выявлено, что при ВПЧ-позитивном и ВПЧ-негативном ОФПКР имеются различия в нарушении регуляции клеточного цикла и мутационном профиле, что указывает на молекулярно-биологические особенности канцерогенеза в зависимости от этиологии рака (Johnson M.E., 2018). Патогенез ВПЧ-индуцированного канцерогенеза обусловлен воздействием на клеточный геном онкопротеинов ВПЧ E6 и E7, которые функционально инактивируют белки –

супрессоры опухолевого роста p53 и pRb соответственно. Онкопротеины E6 и E7 ВПЧ высокого онкогенного риска приводят к клеточной пролиферации, нарушению регуляции клеточного цикла, увеличению частоты спонтанных и индуцированных мутаций, хромосомной нестабильности клеток организма. Гиперэкспрессия ингибитора циклин-зависимых киназ p16INK4A возникает как попытка контроля клеточной пролиферации. При ВПЧ-негативной опухоли установлены мутации в гене-супрессоре p53, индуцированные химическими канцерогенами, а путь pRb поврежден в результате амплификации гена циклина D и инактивации p16 (Galloway D.A., Laimins L.A., 2015).

Прогноз заболевания у пациентов с ВПЧ-позитивным ПРГШ широко обсуждается в литературе по причине разнонаправленных результатов (Settle K. et al., 2009). Выявлено, что ВПЧ-позитивный статус увеличивает время без прогрессирования и продолжительность жизни в сравнении с ВПЧ-негативным статусом, а также эти пациенты лучше отвечают на химиолучевую терапию (Fakhry S. et al., 2008). С другой стороны, имеются данные о худшем прогнозе пациентов с ВПЧ и об отсутствии корреляции между наличием ВПЧ и достижением клинического ответа (Брауншвейг Т. и соавт., 2013, Kofler B. et al, 2012). В литературе также обсуждается значение сочетанного канцерогенза у больных ВПЧ-позитивным ОФПКР, имеющих анамнез длительного курения. Выявлено, что прогноз этого заболевания хуже, несмотря на ВПЧ-позитивность, что обусловлено выявлением дополнительных мутаций генов, ответственных за клеточный цикл и дифференцировку опухоли (Haigentz M., 2018).

Цель исследования

Изучить биологические основы клинического течения и прогноза плоскоклеточного рака орофарингеальной зоны.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

1. Выявить молекулярно-биологические особенности плоскоклеточного рака орофарингеальной зоны в зависимости от регулятора клеточного цикла, суррогатного маркера ВПЧ-статуса p16.

2. Изучить влияние суррогатного маркера ВПЧ-статуса p16, индекса пролиферативной активности по Ki-67 и маркера апоптоза p53 на клинико-морфологические характеристики больных.

3. Оценить роль молекулярных маркеров клеточного цикла и эпителиально-мезенхимального перехода в метастатическом поражении регионарных лимфоузлов.

4. Проанализировать влияние суррогатного маркера ВПЧ-статуса p16 и молекулярных маркеров на результаты консервативного радикального лечения больных раком орофарингеальной зоны.

Научная новизна

Впервые исследовано влияние суррогатного маркера ВПЧ-статуса p16 на регуляцию клеточного цикла и эпителиально-мезенхимальный переход при плоскоклеточном раке орофарингеальной зоны. Установлены молекулярно-биологические особенности рака этой зоны в зависимости от ВПЧ-статуса. Впервые предложена прогностическая модель выявления ВПЧ-положительного плоскоклеточного орофарингеального рака по клинико-морфологическим параметрам для избирательного ИГХ-тестирования ВПЧ-статуса опухоли. Впервые изучена роль регуляции клеточного цикла при плоскоклеточном раке орофарингеальной зоны и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода в зависимости от суррогатного маркера ВПЧ-статуса p16 в развитии метастатического поражения регионарных лимфоузлов. Впервые проанализировано влияние суррогатного маркера ВПЧ-статуса p16 и маркеров клеточного цикла на непосредственные и отдалённые результаты консервативного радикального лечения больных плоскоклеточным орофарингеальным раком.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявлено, что определение суррогатного маркера ВПЧ-статуса при ОФПКР позволяет разделить больных на ВПЧ-положительную и ВПЧ-негативную группы с разными клинико-морфологическими характеристиками. На этом основании разработан и введён в практику способ выявления ассоциации вируса папилломы человека с раком ротоглотки (приоритетная справка на изобретение № 2019105340/04(010229)). Установлены биологические

особенности ВПЧ-положительного ОФПКР, включающие высокий индекс пролиферативной активности, отрицательную экспрессию E-кадгерина с положительной экспрессией b-катенина. Отмечено, что в 70% случаев ОФПКР имеет положительную экспрессию p53, в частности, гиперэкспрессию p53 вне зависимости от ВПЧ-статуса. Это свидетельствует о возможности сочетанного (вирусного+химического) канцерогенеза в изученной когорте больных ОФПКР. ВПЧ-негативные опухоли более гетерогенны по экспрессии E-кадгерина с наличием положительной и отрицательной экспрессии и имеют слабый и умеренный индекс ПА. Установлена зависимость метастатического поражения регионарных лимфоузлов от суррогатного маркера ВПЧ-положительного статуса, высокого индекса пролиферативной активности по Ki-67, их комбинации и отрицательной экспрессии E-кадгерина. Это может быть использовано в определении показаний к шейной лимфодиссекции при хирургическом лечении, а также для разработки новых стратегий терапии.

Суррогатный маркер ВПЧ-положительного статуса p16 прогнозирует объективный ответ опухоли на консервативную радикальную терапию. Отмечено, что проведение инициальной ПХТ с последующей ДЛТ в сравнении с первичной ДЛТ увеличивало время без прогрессирования у больных ВПЧ-положительным ОФПКР, при высоком индексе ПА, а также при отрицательной экспрессии E-кадгерина. Вероятно, это было связано с воздействием на метастатический потенциал, так как эти маркеры коррелировали с риском регионарного и отдалённого прогрессирования. Экспрессия маркера апоптоза p53 не влияла на ответ опухоли и выживаемость без прогрессирования. Кроме того, больные с суррогатным маркером ВПЧ-положительного статуса, высокой ПА, их комбинацией и отрицательной экспрессией E-кадгерина жили дольше при назначении инициальной ПХТ с последующей ДЛТ в сравнении с больными после первичной ДЛТ. Разработан способ прогнозирования увеличения общей выживаемости больных ОФПКР по комбинации суррогатного маркера ВПЧ-статуса с индексом пролиферативной активности (приоритетная справка на изобретение № 2019104401/14(008369)).

Методология и методы диссертационного исследования

Методы научного познания и последовательное их применение явились методологической основой диссертационной работы, которая выполнялась в дизайне ретроспективного сравнительного исследования с использованием проспективного иммуногистохимического анализа гистологических образцов опухоли для разделения больных на группы, общеклинических, морфологических и статистических методов исследования.

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения

Результаты исследования внедрены в работу ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» Министерства Здравоохранения Краснодарского края и кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России на базе ГБУЗ «НИИ-Краевая клиническая больница №1 им. Профессора С.В. Очаповского» Минздрава Краснодарского края.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Суррогатный маркер ВПЧ-статуса p16INK4A, являясь регулятором клеточного цикла, определяет молекулярно-биологические различия при плоскоклеточном раке орофарингеальной зоны. Биологическими особенностями ВПЧ-позитивного рака с гиперэкспрессией p16INK4A являются высокий индекс пролиферативной активности, потеря экспрессии E-кадгерина с положительной экспрессией b-катенина и высокий потенциал лимфогенного метастазирования. ВПЧ-негативный рак демонстрирует гетерогенность в отношении индекса ПА, экспрессии E-кадгерина и метастатического потенциала. Положительная экспрессия маркера апоптоза p53, которая позволяет предположить мутацию TP53, присуща большинству больных ОФПКР вне зависимости от ВПЧ-статуса. ВПЧ-негативный рак демонстрирует положительную экспрессию p53 в 70% случаев, ВПЧ-позитивный рак - в 72% случаях, что подтверждает возможность сочетанного канцерогенеза (вирусного+химического) этой зоны.

2. Клинико-морфологические различия при ОФПКР обусловлены суррогатным маркером ВПЧ-статуса, который позволяет разделить больных на ВПЧ-позитивную и ВПЧ-негативную группы для создания «портрета» больного ВПЧ-позитивным раком.

Метастатическое поражение регионарных лимфоузлов при плоскоклеточном орофарингеальном раке зависит от регуляции клеточного цикла и эпителиально-мезенхимального перехода. Суррогатный маркер ВПЧ-положительного статуса, высокий индекс пролиферативной активности, их комбинация и отрицательная экспрессия Е-кадгерина связаны с лимфогенным регионарным метастазированием.

3. Суррогатный маркер ВПЧ-положительного статуса p16 прогнозирует объективный ответ на консервативную радикальную терапию. Проведение инициальной ПХТ с последующей ДЛТ в сравнении с первичной ДЛТ увеличивает время без прогрессирования у больных ВПЧ-положительным ОФПКР, при высоком индексе ПА, а также при отрицательной экспрессии Е-кадгерина в опухоли. Вероятно, это связано с воздействием на метастатический потенциал, так как эти маркеры коррелировали с регионарным прогрессированием. Выявленная тенденция отражалась на общей выживаемости - больные с суррогатным маркером ВПЧ-положительного статуса, высоким индексом ПА, их комбинацией и отрицательной экспрессией Е-кадгерина жили дольше при назначении инициальной ПХТ с последующей ДЛТ в сравнении с первичной ДЛТ в рамках консервативной терапии. Экспрессия маркера апоптоза p53 не влияла на результаты консервативного радикального лечения больных орофарингеальным плоскоклеточным раком.

Степень достоверности

Определяется репрезентативной группой больных, включенных в исследование, адекватным формированием групп сравнения, разнообразием методов исследования, современными методами статистической обработки. В диссертационной работе положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации сформулированы грамотно и являются логическим заключением системного анализа полученных результатов.

Апробация результатов

Тезисы исследования опубликованы в материалах конференций: Второй онкологический форум Юга России (Ростов-на-Дону, 31.10-10.11.2016г.); XXI Российский онкологический конгресс (г. Москва, 14-16 ноября 2017 г.); X

Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (23-25 апреля 2017г., г. Сочи).

Доклады по материалам исследования представлены на конференциях: XXII Российский онкологический конгресс (13-15 ноября 2018 г., г. Москва), где результаты представлены в 2 сессиях, доклад на сессии молодых учёных отмечен наградой за 2 место во Всероссийском конкурсе молодых учёных; V Ежегодный конгресс Российского общества специалистов по опухолям головы и шеи (29-30 марта 2019 г., г. Москва), где доклад отмечен дипломом за 3 место в постерной сессии; Всероссийская научно-практическая Школа онкологов и радиологов (24-25 мая 2019г., г. Краснодар).

Апробация диссертации состоялась 10 июня 2019 года на расширенном заседании кафедр онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС и хирургии №1 ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский Государственный Медицинский Университет.

Основные результаты исследования опубликованы в 12 печатных работах, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 1– в журнале, входящем в международные реферативные базы данных. Получены 2 приоритетные справки на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, указателя литературы, включающего 13 отечественных и 161 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 35 таблицами и 39 рисунками.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» паспорта специальности 14.01.12-«онкология».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика пациентов и методы исследований

В исследование включено 104 больных плоскоклеточным раком (ПКР) орофарингеальной зоны, проходивших лечение на базе ГБУЗ КОД №1 г. Краснодара с 2011 года по 2017 гг. Включено 87 мужчин и 17 женщин. Возраст больных варьировал от 36 до 82 лет с медианой 59 лет. Характеристика больных представлена в таблице 1.

Таблица 1 –Характеристика больных, включённых в исследование

Параметр	Количество
	Абс.ч. (%)
Локализация	
Корень языка	23 (22)
Нёбные дужки	29 (28)
Нёбные миндалины	31 (30)
Мягкое небо	8 (8)
Задняя стенка ротоглотки	13 (12)
Морфологические характеристики	
G1/ G2/G3	19 (18)/62(60)/23(22)
Неороговевающий/Ороговевающий ПКР	42 (40)/62(60)
TNM (7 пересмотр)	
T1/T2/T3/T4a	7(6,7)/26(25)/37(35,6)/34(32,7)
N 0/ N 1/ N 2	60(57,7)/20(19,3)/24(23)
M0	104 (100)
Стадия	
I/ II/ III/ IVA	6(6)/18(17)/27(26)/53(51)
Проведённое лечение	
Первичная ДЛТ	45 (44)
Инициальная ПХТ с последующей ДЛТ	40 (37)
Паллиативная ПХТ	10 (10)
Только хирургическое лечение	1 (1)
Комбинированное лечение (хирургическое лечение и ДЛТ)	4 (4)
Биолучевая терапия	1 (1)
Комплексное лечение	1 (1)
Симптоматическое лечение	2 (2)

Иммуногистохимическое исследование выполнялось на парафиновых срезах биопсийных блоков с использованием моноклональных антител к p16 (clone INK4 BioGenex, 1:25), Ki67 (clone SP6 LabVision, 1:400), E-кадгерину (clone EP700Y LabVision, 1:50), b-катенину (clone E247 LabVision, 1:250) и p53 (clone Ab-5(DO-7) LabVision, 1:100).

По рекомендациям Американской Коллегии Патологоанатомов и Национальной Раковой Сети ВПЧ-положительный статус опухоли устанавливался по суррогатному маркеру p16INK4a при окрашивании более 70% опухолевых клеток включительно.

Пролиферативную активность (ПА) опухоли оценивали по экспрессии Ki-67. Низкий индекс ПА – 0–20%, умеренный индекс ПА – 21–50% и высокий индекс ПА – 51–100%.

При изучении экспрессии маркера p53 окрашивание 0–25% опухолевых клеток означало отрицательную экспрессию (ОЭ) p53, более 25% - положительную экспрессию (ПЭ), в том числе 26–50% – слабую экспрессию (СЭ), 51–100% - гиперэкспрессию (ГЭ) p53.

При ИГХ-анализе экспрессии E-кадгерина и β -катенина оценивали локализацию на мембране, в цитоплазме и в ядре (только для β -катенина) клетки, использовалось разделение на группы с отрицательной (-) или положительной (+/++/+++) экспрессией.

Статистический анализ выполнен в статистическом пакете IBM SPSS statistics version 22. Используются описательные статистики, t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни, критерий χ^2 (Кси-квадрат), точный критерий Фишера или с поправкой Йейтса для выявления корреляций с уровнем достоверности $p \leq 0,05$. Рассчитаны относительные риски выявления исходов в зависимости от факторов риска.

Для создания прогностических моделей применялся регрессионный анализ. Интерпретация их прогностической ценности проводилась по площади (АИС) под ROC – кривой, где значения в диапазоне 0,8 - 0,9 и 0,9 - 1,0 свидетельствуют о хорошем и отличном качестве модели соответственно.

Выживаемость оценивалась по методу Каплана-Майера, достоверность различий - по логарифмическому ранговому критерию (Log-rank) или тесту Breslow. Дополнительно применялся однофакторный и многофакторный регрессионный анализ Кокса (Proportional hazard regression model).

ВПЧ-статус, маркеры пролиферации, апоптоза и клеточной адгезии

По ВПЧ-статусу больные распределены в две группы сравнения. Первую группу составили 24% (25 из 104) ВПЧ-позитивных пациентов. Во вторую группу отнесены 76% (79 из 104) больных с ВПЧ-негативным статусом. Средний возраст больных в ВПЧ-негативной группе составил $60,48 \pm 1,027$ лет. Медиана 61 год. Средний возраст больных ВПЧ-позитивной группы составил $52,84 \pm 1,678$ лет. Медиана 54 год. Выявлено, что ВПЧ-позитивные больные достоверно моложе, чем пациенты с ВПЧ-негативным раком ($p < 0,01$). В таблице 2 представлен анализ связи ВПЧ-статуса с клинико-морфологическими характеристиками больных.

Таблица 2 – Корреляция ВПЧ-статуса с клинико-морфологическими характеристиками больных

Признак	ВПЧ- позитивный (n=25)		ВПЧ- негативный (n=79)		p	ОР	95%ДИ
	абс. ч.	%	абс. ч.	%			
Пол							
Женщины	8	32	9	11,4	0,035*	2,408	1,244-4,661
Мужчины	17	68	70	88,6			
Возраст							
≤60 лет	22	88	36	45,6	<0,05*	5,816	1,855-18,23
>60 лет	3	12	43	54,4			
Локализация							
Корень языка	10	40	13	16,5	0,014*	2,348	1,223-4,509
Задняя стенка ротоглотки	0	0	13	16,5	<0,05*	0,000	0,000-NaN
Нёбные миндалины	15	60	17	21,5	<0,001*	3,375	1,704-6,684
Нёбные дужки	0	0	28	35,5	<0,05*	0,108	0,015-0,760
Мягкое нёбо	0	0	8	10	<0,05*	0,000	0,000-NaN
TNM (7 пересмотр)							
T 1-2	8	32	25	32	0,832	1,012	0,487-2,105
T 3-4	17	68	54	68			
N1-2	16	64	28	35,5	0,023*	2,424	1,182-4,971
N0	9	36	51	64,5			
Морфологические характеристики							
G1	4	16	15	19	>0,05	0,852	0,331-2,196
G2	15	60	45	57	0,789	1,1	0,547-2,213
G3	6	24	19	24	0,793	0,998	0,448-2,221
Неороговевающий ПКР	15	60	27	34	0,022*	2,214	1,102-4,449

Ороговевающий ПКР	10	40	52	66			
-------------------	----	----	----	----	--	--	--

Примечание. * – статистически значимые показатели, $p < 0,05$

Средний уровень Ki-67 составил 52,15%, медиана - 55%. Низкая ПА выявлена у 11,2%, умеренная - у 35,5% и высокая ПА - у 53% больных. При ВПЧ-позитивности средний уровень Ki-67 составил 72,28%, медиана - 80%. В случае ВПЧ-негативности - 45,78%, Ме - 40%. Средний уровень индекса ПА по U – критерию Манна-Уитни выше в ВПЧ-позитивных опухолях ($p < 0,05$). При ВПЧ-позитивном статусе 88% образцов опухоли имели высокий индекс ПА. Низкая ПА при этом варианте не встречалась.

ВПЧ-позитивный статус связан с высокой ПА ($p < 0,01$; ОР 10,648, 95% ДИ 2,645-42,870). ВПЧ-негативная опухоль более гетерогенна по индексу ПА – низкий, умеренный и высокий индексы ПА составили 15,2%, 43% и 41,8% случаев соответственно.

Высокий индекс ПА связан с женским полом ($p < 0,05$; ОР = 1,623, 95% ДИ 1,149-2,291), возрастом моложе 60 лет включительно ($p = 0,007$; ОР = 1,726, 95% ДИ 1,129-2,639), неороговевающим раком ($p = 0,038$; ОР = 1,476, 95% ДИ 1,028-2,120), G2 ($p = 0,021$; ОР 1,596, 95% ДИ 1,046-2,435) и метастазами в регионарных лимфоузлах (N+) ($p = 0,015$; ОР 1,790, 95% ДИ 1,096-2,924).

Средний уровень экспрессии p53 составил 56,16%, медиана - 67,50%. ОЭ p53 выявлена у 29,8%, СЭ - у 14,4%, а ГЭ p53 - у 55,8% больных. У 70% больных ОФПКР выявлена предположительная мутация гена TP53 по положительной экспрессии p53. При ВПЧ-позитивности средний уровень экспрессии p53 составил 53,96%, медиана - 60%. В случае ВПЧ-негативности - 56,81%, медиана - 70%. Экспрессия p53 не зависит от ВПЧ-статуса ($p > 0,05$).

При ВПЧ-негативном статусе ОЭ p53 отмечена у 30,4%, СЭ p53 - у 10,6%, ГЭ p53 - у 59% пациентов. При ВПЧ-позитивности ОЭ p53 наблюдалась у 28%, СЭ p53 - у 16%, ГЭ p53 - у 56% больных. ГЭ p53 не зависит от клинико-морфологических параметров, кроме прямой связи с G3 ($p = 0,036$; ОР = 1,539 95% ДИ 1,125-2,107).

Отрицательная экспрессия (ОЭ) Е-кадгерина на мембране опухолевых клеток выявлена у 48%, положительная экспрессия (ПЭ) – у 52% пациентов.

ВПЧ-положительные больные в 100 % случаев демонстрировали ОЭ Е-кадгерина и ПЭ в-катенина (цитоплазматическое и ядерное окрашивание). ОЭ Е-кадгерина выявлена у 38%, а ПЭ маркера установлена у 62% больных ВПЧ-негативным раком. ОЭ Е-кадгерина на мембране опухолевых клеток была связана с метастазами в регионарных лимфоузлах и ВПЧ-положительным статусом ($p < 0,05$).

Прогностические модели ВПЧ-положительного статуса опухоли

По площади под ROC-кривыми (АИС) на рисунке 1 отмечено, что клинико-морфологические признаки по отдельности не удовлетворяют понятиям «отличная» и «хорошая» модель для выявления ВПЧ-положительного статуса опухоли орофарингеальной зоны (АИС менее 0,8).

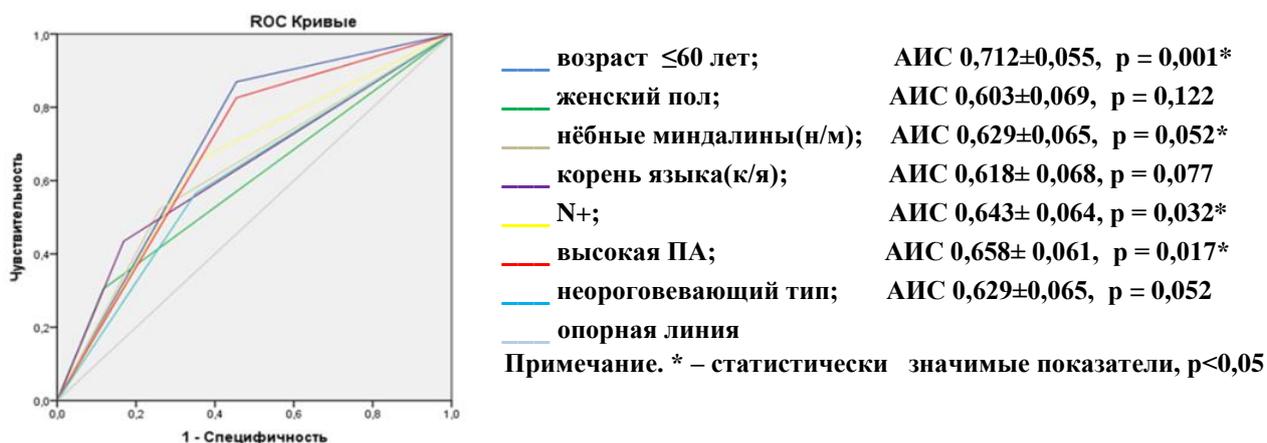


Рисунок 1 – ROC – кривые прогностических моделей ВПЧ-положительного статуса

При анализе комбинаций клинико-морфологических параметров ROC – кривые описывают четыре прогностические модели для выявления ВПЧ-положительности опухоли, полученные в регрессионном анализе ($p < 0,0001$). Наибольшую АИС имеет модель №4 (АИС=0,941). Однако подходящей для диагностического этапа без ИГХ-анализа является модель №1, которая прогнозирует выявление ВПЧ-положительного статуса с чувствительностью (Se) 83,3%, специфичностью (Sp) 71,4% и АИС 0,908 (рисунок 2).

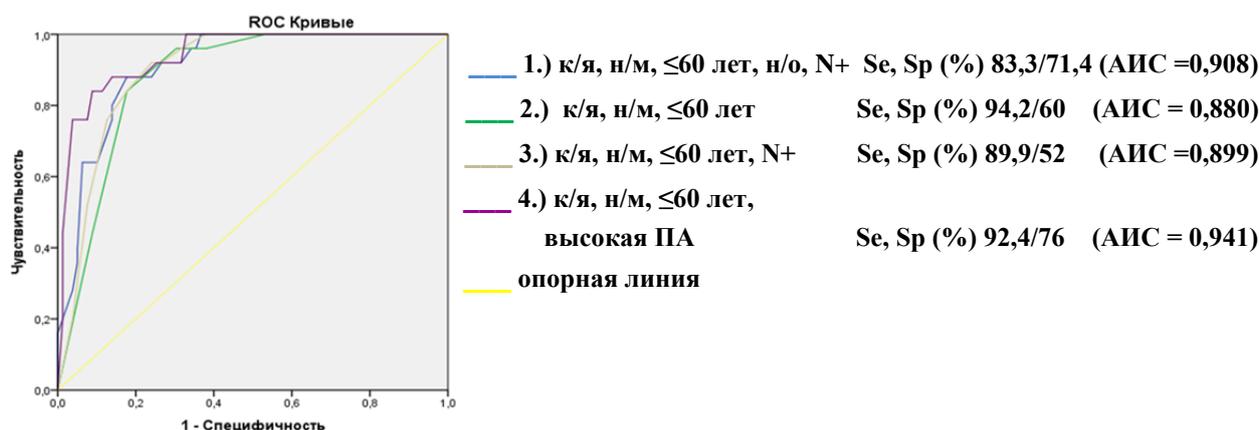


Рисунок 2 – ROC – кривые прогностических моделей ВПЧ-положительного статуса

Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов

В исследовании у 42,4% больных были выявлены метастазы в регионарные лимфоузлы (N+), что не было связано с полом, возрастом, локализацией и степенью дифференцировки ($p > 0,05$). Риск N+ увеличивали ВПЧ-положительный статус ($p = 0,022$; OR = 2,424, 95% ДИ 1,182-4,971), высокая ПА ($p = 0,015$; OR = 1,790, 95% ДИ 1,096-2,924), комбинация ВПЧ-статуса и высокой ПА ($p = 0,006$; OR = 2,012, 95% ДИ 1,344-3,013) и отрицательная экспрессия E-кадгерина ($p < 0,05$; OR 10,392, 95% ДИ 4,006-26,958). При этом отрицательная экспрессия E-кадгерина прогнозирует наличие метастазов в регионарных лимфоузлах с чувствительностью (Se) 91%, специфичностью (Sp) 80% и обладает хорошей прогностической способностью (AUC 0,855). На рисунке 3 представлены ROC-кривые молекулярных маркеров для прогнозирования N+.

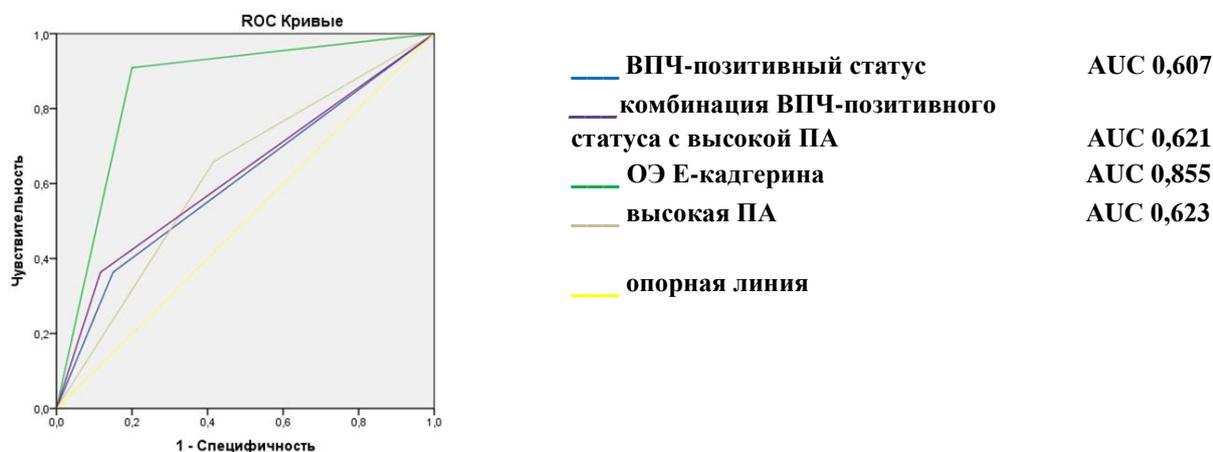


Рисунок 3 – ROC – кривые прогностических моделей N+

Результаты лечения больных ОФПКР

Ретроспективный анализ непосредственных и отдалённых результатов консервативного радикального лечения выполнен у 85 больных, которым проводилось консервативное радикальное лечение в зависимости от распространённости опухолевого процесса – первичная ДЛТ по радикальной программе с облучением зон регионарного метастазирования или инициальная ПХТ с последующей ДЛТ. Медиана наблюдения составила 27 мес., медиана возраста 59 лет. Характеристика больных, включённых в анализ, представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика больных ОФПКР, включенных в анализ результатов лечения

Признак	Абс.ч.
Неороговевающий/Ороговевающий ПКР	33/52
G1/G2/G3	20/56/9
Метод лечения	
ПХТ+ДЛТ/ДЛТ	40/45
Стадия, TNM	
II/III/IV	17/27/41
T1-2/T3-4	31/54
N0/N1-2	52/33
Молекулярный профиль	
ВПЧ-статус (положительный/отрицательный)	24/61
Высокая ПА (есть/нет)	46/39
ПЭ p53 (есть/нет)	59/26
Гиперэкспрессия p53 (нет/есть)	37/48
Экспрессия E-кадгерин (поз./отр.)	39/46

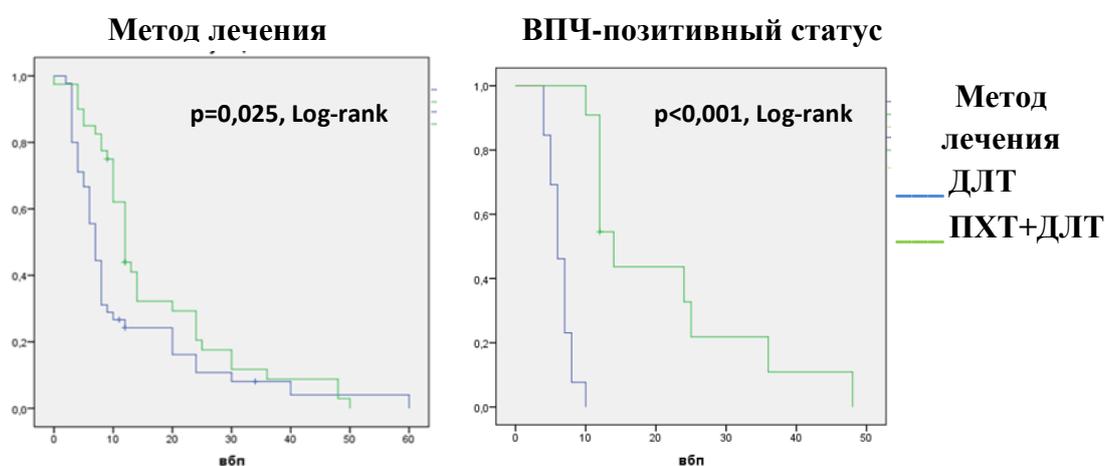
Оценка ответа на лечение осуществлялась методом спиральной компьютерной томографии с контрастированием после 2 курсов инициальной ПХТ с последующим проведением ДЛТ и по окончании курса первичной ДЛТ. Частота объективного ответа составила 80% (68 из 85), стабилизации - 20 % больных (RECIST 1.1). Установлено, что ВПЧ-положительный статус увеличивал вероятность достижения объективного ответа ($p=0,002$; ОР 1,386, 95%ДИ 1,186-1,620) (АИС 0,636).

При анализе выживаемости без прогрессирования событием во всех случаях служило прогрессирование, установленное у 93% (79 из 85) пациентов. Местный рецидив возник у 45% (36 из 79), метастазирование в регионарные лимфоузлы - у 51% (40 из 79) больных, в том числе у 35% (30 из 79) больных

возникли метастазы в шейные лимфоузлы, противоположные стороне поражения. Регионарное прогрессирование было связано с ВПЧ-положительным статусом, отрицательной экспрессией Е-кадгерина и высоким индексом ПА ($p < 0,001$). Отдалённое метастазирование в легкие зафиксировано у 4% (3 из 79) больных, в опухоли которых выявлены ВПЧ-положительный статус, высокий уровень ПА, ОЭ Е-кадгерина и ГЭ р53.

Время без прогрессирования в общей группе пациентов не зависело от ВПЧ-статуса, высокого индекса ПА, экспрессии р53 и Е-кадгерина ($p > 0,05$).

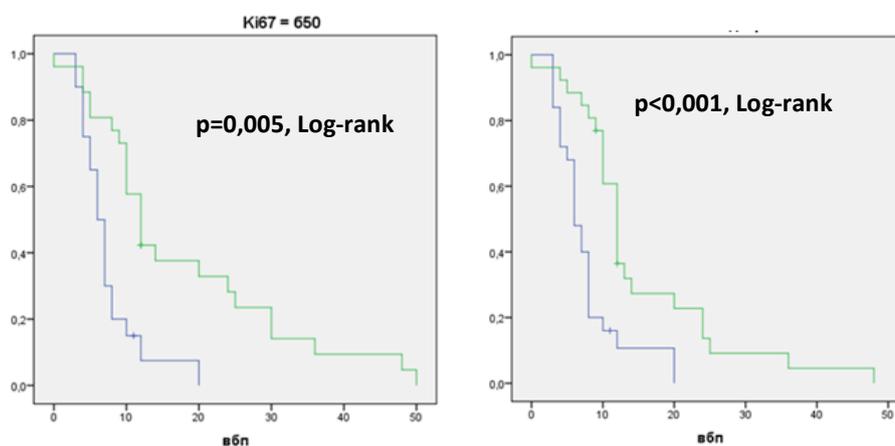
Однако выявлено достоверное увеличение времени без прогрессирования у больных, получивших начальную ПХТ с последующей ДЛТ в сравнении с первичной ДЛТ ($p = 0,025$). В подгрупповом анализе проведение начальной ПХТ с последующей ДЛТ увеличивало время без прогрессирования у больных с ВПЧ-положительным статусом, высокой ПА и отрицательной экспрессией Е-кадгерина ($p < 0,05$) (рисунок 4).



Признак	Общая группа		ВПЧ-положительный статус	
	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ
Метод лечения	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ
Событие	37/40 (93%)	42/45(93%)	10/11(91%)	13/13 (100%)
Ме ВБП (мес.)	12	7	14	6

Ki67>50%

ОЭ Е-кадгерина



Признак	Высокий индекс ПА		ОЭ Е-кадгерина	
	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ
Метод лечения	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ
Событие	24/26 (92%)	19/20 (95%)	21/23(92%)	22/23(96%)
Ме ВБП (мес.)	12	6	12	6

Рисунок 4 - Кривые ВБП с учётом молекулярных маркеров в подгрупповом анализе влияния метода лечения

Метод консервативной терапии не влиял на время без прогрессирования у больных ОФПКР без высокой ПА, при наличии положительной экспрессии Е-кадгерина и в зависимости от экспрессии p53 ($p>0,05$, Log Rank).

Для анализа общей выживаемости (ОВ) была сформирована отдельная группа с целью уменьшения влияния возрастных различий и причин смерти от декомпенсации сопутствующих заболеваний. Включено 66 больных ОФПКР, получивших консервативную радикальную терапию. Средний возраст составил 59 лет, медиана - 57 лет. Медиана продолжительности жизни (ПЖ) - 36 мес. при медиане наблюдения 38 мес. Летальный исход отмечен у 62% больных. В таблице 4 представлена характеристика больных.

Таблица 4 – Характеристика больных, включённых в анализ ОВ

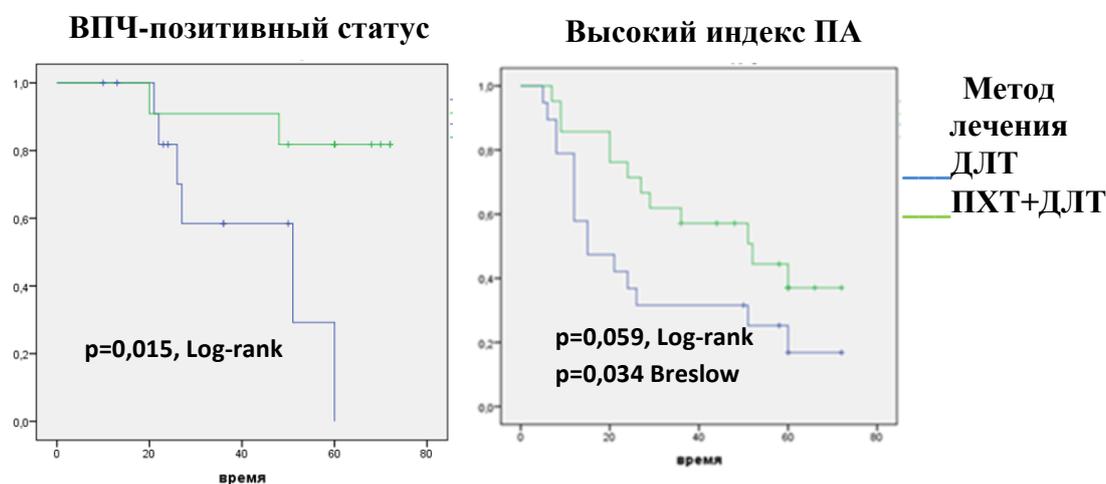
Признак	Абс.ч.
Стадия II/III – IV	12/54
Метод лечения: ДЛТ/ПХТ+ДЛТ	27/39
ВПЧ-статус: позитивный/негативный	21/45
Высокий индекс ПА: есть/нет	39/27
Комбинации суррогатного маркера ВПЧ-позитивного статуса и высокой ПА: есть/нет	19/47

ПЭ p53: есть/нет	48/18
ГЭ p53:есть/нет	36/30
Экспрессия Е-кадгерина: отр./пол.	40/26

Снижение риска смерти было выявлено при наличии ВПЧ-положительного статуса ($p < 0,05$, HR 0,338, 95% ДИ 0,136-0,839), комбинации маркеров ВПЧ-положительного статуса и высокой ПА ($p < 0,05$, HR 0,555, 95% ДИ 0,372-0,826).

На ПЖ не оказывали влияние маркер высокого индекса ПА, экспрессия маркера апоптоза p53 ($p > 0,05$). Вариант консервативной терапии не влиял на ПЖ больных ОФПКР при ВПЧ-негативном статусе, при отсутствии высокого индекса ПА, в отсутствие их комбинации, в случае ПЭ Е-кадгерина ($p < 0,05$) и в зависимости от экспрессии маркера апоптоза p53 ($p > 0,05$).

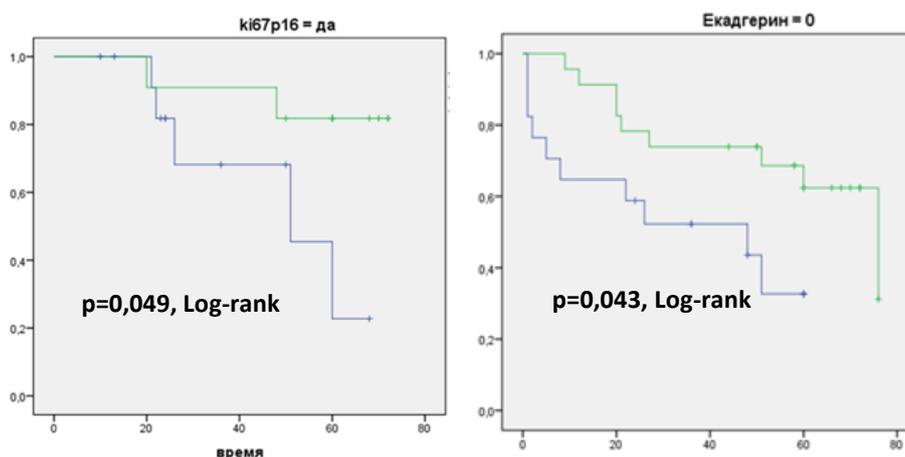
При этом отмечено, что инициальная ПХТ с последующей ДЛТ увеличивали ПЖ при ВПЧ – положительном статусе, при высоком индексе ПА, в случае наличия комбинации маркеров ВПЧ-положительного статуса и высокой ПА и при отрицательной экспрессии Е-кадгерина ($p < 0,05$) (рисунок 5).



Признак	ВПЧ-положительный статус		Высокий индекс ПА	
	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ
Метод лечения	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ
Событие	4/13(31%)	5/8(62%)	15/19(79%)	12/20(57%)
Ме ПЖ (мес.)	Не достигнута	51	15	52

ВПЧ+статус и высокая ПА

ОЭ Е-кадгерина



Признак	ВПЧ-положительный статус и высокая ПА		Отрицательная экспрессия Е-кадгерина	
	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ	ПХТ+ДЛТ	ДЛТ
Событие	4/13(31%)	4/6 (67%)	9/23 (39%)	10/17 (60%)
Ме ПЖ (мес.)	не достигнута	53	76	48

Рисунок 5 – Кривые ОВ с учётом молекулярных маркеров в подгрупповом анализе влияния метода лечения

ВЫВОДЫ

1. Установлен высокий риск выявления суррогатного маркера ВПЧ-положительного статуса при ОФПКР у больных женского пола, при неороговевающем плоскоклеточном раке, локализации опухоли в корне языка и нёбных миндалинах, в возрасте моложе 60 лет включительно и при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах ($p < 0,05$). Рак нёбных дужек, задней стенки ротоглотки и мягкого нёба демонстрируют ВПЧ-негативный статус ($p < 0,05$). ВПЧ-статус не зависит от степени дифференцировки опухоли, размера первичной опухоли ($p > 0,05$).

2. Прогностическая модель на основании сочетания клинико-морфологических факторов предсказывает выявление ВПЧ-положительного статуса плоскоклеточного рака орофарингеальной зоны с чувствительностью 83,3% и специфичностью 71,4% (АИС = 0,908, $p < 0,001$) и может быть использована для избирательного подхода к ИГХ-тестированию ВПЧ-статуса.

3. Выявлено, что высокий индекс ПА коррелирует с женским полом, возрастом младше 60 лет включительно, неороговевающим раком, наличием

метастазов в регионарных лимфоузлах ($p < 0,05$). Высокий индекс ПА установлен у 88% больных ВПЧ-положительным орофарингеальным раком.

4. Экспрессия маркера апоптоза p53 не влияет на клинико-морфологические характеристики больных ОФПКР, кроме связи гиперэкспрессии p53 с низкой степенью дифференцировки опухоли G3 ($p < 0,05$). Уровень экспрессии маркера не зависит от ВПЧ-статуса. ВПЧ-положительные и ВПЧ-негативные больные имели положительную экспрессию p53 в 72% и 70% случаев соответственно.

5. ВПЧ-положительный ОФПКР характеризуется высоким индексом пролиферативной активности ($p < 0,05$), отрицательной экспрессией E-кадгерина ($p < 0,05$) с положительной экспрессией b-катенина и в большинстве случаев имеет положительную экспрессию p53, в частности, гиперэкспрессию маркера, что подтверждает возможность сочетанного канцерогенеза (вирусного+химического) этой области. ВПЧ-негативный рак демонстрирует гетерогенность в отношении индекса пролиферативной активности и экспрессии E-кадгерина.

6. Метастазирование в регионарные лимфоузлы и регионарное прогрессирование в лимфоузлы после проведения консервативной радикальной терапии при орофарингеальном плоскоклеточном раке связано с суррогатным маркером ВПЧ - положительного статуса, высоким индексом ПА по Ki-67, их комбинацией и отрицательной экспрессией E-кадгерина ($p < 0,05$).

7. В опухоли 4% больных ОФПКР с отдалённым прогрессированием в лёгкие были обнаружены комбинация маркеров ВПЧ-положительного статуса и высокого индекса ПА, отрицательная экспрессия E-кадгерина с положительной экспрессией b-катенина.

8. Обнаружено, что суррогатный маркер ВПЧ-положительного статуса p16 являлся предиктором объективного ответа на консервативную радикальную терапию ($p < 0,05$). Проведение инициальной ПХТ с последующей ДЛТ увеличивало время без прогрессирования в сравнении с первичной ДЛТ у больных ОФПКР с ВПЧ-положительным статусом, высоким индексом ПА и отрицательной экспрессией E-кадгерина ($p < 0,05$). Время без прогрессирования у больных ОФПКР не зависело от экспрессии маркера апоптоза p53 ($p > 0,05$).

9. Продолжительность жизни больных ОФПКР была выше при проведении инициальной ПХТ с последующей ДЛТ в сравнении с первичной ДЛТ у больных, имеющих молекулярные маркеры ВПЧ-положительного статуса, высокого индекса ПА, их комбинацию и отрицательную экспрессию Е-кадгерина ($p < 0,05$).

10. В многофакторном анализе Кокса снижение риска смерти прогнозировали ВПЧ-положительный статус ($p = 0,019$; HR 0,338 95% ДИ 0,136-0,839), комбинация маркеров ВПЧ-положительного статуса и высокой ПА ($p = 0,002$; HR 0,555, 95% ДИ 0,372-0,826).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На диагностическом этапе для оптимизации диагностического процесса возможно избирательное выполнение ИГХ-анализа ВПЧ-статуса на основании прогностической модели выявления ВПЧ-положительного статуса по клиничко-морфологическим параметрам. Тестирование можно проводить больным при неороговевающем плоскоклеточном раке небных миндалин или корня языка в возрасте младше 60 лет включительно при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах, вне зависимости от пола и статуса курения. В отсутствие этих факторов предполагается ВПЧ-негативный статус опухоли.

2. ИГХ-анализ ВПЧ-статуса орофарингеального плоскоклеточного рака следует дополнять определением экспрессии маркера апоптоза p53 для исключения сочетанного (вирусного+химического) канцерогенеза. Изучение уровня пролиферации по Ki-67 и Е-кадгерина целесообразно для прогнозирования потенциала регионарного и отдалённого метастазирования.

3. Проведение ПХТ как этапа радикального консервативного лечения необходимо у больных орофарингеальным плоскоклеточным раком при выявлении суррогатного маркера ВПЧ-положительного статуса, высокой ПА и отрицательной экспрессии Е-кадгерина в опухоли с целью улучшения отдалённых результатов лечения. При хирургическом вмешательстве следует учитывать наличие этих молекулярных маркеров как показание для профилактической шейной лимфодиссекции, а также биопсии сторожевого лимфоузла для выявления субклинических метастазов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Заболеваемость раком глотки в Краснодарском крае/ А.И. Стукань, В.Н. Бодня, Е.В. Дулина, А.А. Леонов// Материалы Второго Онкологического форума Юга России. – Ростов – на – Дону, 2016. – С. 104.
2. **Роль вируса папилломы человека в развитии рака ротоглотки/ А.И. Стукань, В.Н. Бодня, Е.В. Дулина, В.И. Александров// Кубанский научный медицинский вестник. - 2016. - №5. - С. 154-157.**
3. **Возможности терапии плоскоклеточного рака головы и шеи в зависимости от молекулярных особенностей опухоли (обзор литературы)/ А.И. Стукань, Р.А. Мурашко, В.Н. Бодня, О.Ю. Чухрай, Е.В. Дулина // Опухоли головы и шеи. - 2017. – №3. – С. 66 –73**
4. Оценка влияния ВПЧ-статуса опухоли и коэкспрессии p16 / Ki67 на клиничко-патоморфологические характеристики плоскоклеточного рака головы и шеи в Краснодарском крае/ А. И. Стукань, О. Ю. Чухрай, В. Н. Бодня// Материалы XXI Российского онкологического конгресса (Москва, 2017). Злокачественные опухоли. – 2017. – Спецвыпуск (3-51). – С. 167.
5. **Актуальные вопросы химиолучевого лечения орофарингеальной плоскоклеточной карциномы: эффективность и токсичность режимов химиотерапии с целью радиомодификации/ А.И. Стукань, Р.А. Мурашко, В.Н. Бодня, Ю.М. Макарова, И.Н. Василенко // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2018. – №3. – С. 61 – 67.**
6. Прогностическая роль классификации AJCC/UICC TNM 8 пересмотра у пациентов с раком ротоглотки в Краснодарском крае/ А.И. Стукань, Р.А. Мурашко, В.А. Порханов, В.Н. Бодня, О.Ю. Чухрай// Евразийский онкологический журнал. (Тезисы на X съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти акад. Н.Н. Трапезникова). – Сочи, 2018. – Т.6, №1. – С. 217.
7. Определение экспрессии молекулярных маркеров как способ выделения патогенетических и прогностических подгрупп больных плоскоклеточным раком головы и шеи/ А.И. Стукань, В.А. Порханов, О.Ю. Чухрай, В.Н. Бодня, Р.А. Мурашко// XXII Российский онкологический конгресс, 13-15 ноября 2018 г., Москва. Ж. Злокачественные опухоли. – 2018. – Т.8, №3 (спецвыпуск 1). – С. 12

8. Молекулярно-генетический профиль плоскоклеточного рака головы и шеи/ А.И. Стукань, В.А. Порханов, В.Н. Бодня, О.Ю. Чухрай, Ю.М. Макарова, И.С. Элизбарян// Медицинский вестник Юга России. – 2018. – № 3 (9). – С. 50–57.

9. Орофарингеальная карцинома, ассоциированная с вирусом папилломы человека: тенденции эпидемиологии и методы выявления вируса в опухоли/ А.И. Стукань, О.Ю. Чухрай, В.А. Порханов, Р.А. Мурашко, В.Н. Бодня, Ю.М. Макарова // Опухоли головы и шеи. – 2018. – №3. – С. 77 – 83.

10. Маркеры апоптоза и пролиферации и их связь с p16+ -статусом опухоли при плоскоклеточном раке ротоглотки и тела языка/ А.И. Стукань, В.А. Порханов, В.Н. Бодня, Р.А. Мурашко// Материалы V Конгресса Российского общества специалистов по опухолям головы и шеи, 29-30 марта 2019 г., Москва. Ж. Опухоли головы и шеи. – 2019. – Т. 9, №1 (спецвыпуск). – С. 48.

11. Клинико-морфологические и прогностические особенности плоскоклеточного рака органов головы и шеи, ассоциированного с вирусом папилломы человека/ А.И. Стукань, О.Ю. Чухрай, В.А. Порханов, В.Н. Бодня, Р.А. Мурашко, И.С. Элизбарян // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2019. – №1. – С.13 –19.

12. Взаимосвязь экспрессии p53 и p16INK4A с клинико-морфологическими характеристиками больных плоскоклеточным раком головы и шеи/ А.И. Стукань, О.Ю. Чухрай, В.А. Порханов, В.Н. Бодня// Архив патологии. – 2019. –№3. – С.12–18.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПРГШ	– плоскоклеточный рак головы и шеи
ОФПКР	– орофарингеальный плоскоклеточный рак
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ДЛТ	– дистанционная лучевая терапия
ПХТ	– полихимиотерапия
ИГХ	– иммуногистохимия

ОР	– относительный риск
ДИ	– доверительный интервал
ROC	– анализ для оценки качества бинарной классификации (Receiver Operating Characteristic)
АИС	– площадь под кривой (Area Under Curve)
ВБП	– выживаемость без прогрессирования
HR	– отношение шансов