

На правах рукописи

ГОЛОВНОВА
Ксения Андреевна

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СИСТЕМ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ,
ДЕТОКСИКАЦИИ, АПОПТОЗА И ПАПИЛЛОМАВИРУС
В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ГОРТАНИ И ГЛОТКИ

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Гумилевский Борис Юриевич – доктор медицинских наук доцент

Официальные оппоненты:

Балдуева Ирина Александровна – доктор медицинских наук, ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий научным отделом онкоиммунологии

Никитин Владимир Юрьевич – доктор медицинских наук, ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, заведующий лабораторией иммунологии Центральной клинико-диагностической лаборатории

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «15» декабря 2015 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, дом 4/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте: <http://www.arcerm.spb.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным мировой статистики доля рака верхних дыхательных путей составляет более 7% в структуре всех злокачественных новообразований. В целом в России, по данным В. И. Чиссова [Чиссов В.И. и др., 2009], стандартизованный показатель заболеваемости раком гортани в России составил 3,13 на 100 000 населения, среди мужчин — 7,28, среди женщин — 0,36; из них 65,8% были в трудоспособном возрасте. Кроме того, онкологические заболевания головы и шеи по приросту смертности занимают одно из первых мест в мире. Во многом эта ситуация объясняется поздней диагностикой и диктует необходимость разработки новых алгоритмов ранней диагностики и определения критериев включения пациентов в группу риска [Кожанов Л.Г. и др., 2008; Gaykalova D.A. и др., 2014].

Известно, что возникновение карцином головы и шеи во многом связано с увеличением канцерогенной нагрузки на организм при курении и алкоголизме. Особую роль в реализации онкогенных рисков играют ферменты цитохрома P450, поскольку метаболизируют канцерогены, переводя их в неактивное состояние. Однако, эти ферменты в силу индивидуальных особенностей функционирования системы детоксикации могут увеличивать канцерогенный потенциал некоторых химических веществ. Поэтому исследование генетических вариантов ферментов цитохрома P450 актуально в аспекте развития различных видов рака [Lang J. и др., 2012; Maurya S.S. и др., 2013; Wu B. и др., 2013]. Кроме того, распространенность курящих людей среди населения России колеблется около 40%, однако не у всех курильщиков развиваются онкологические заболевания головы и шеи, в то время как эти заболевания возникают и у некурящих, что позволяет думать о других факторах, влияющих на неопластическую трансформацию эпителиальной ткани верхних дыхательных путей. Таким образом, механизмы, лежащие в основе развития карцином, включающие сложные взаимодействия иммунной системы, различных супрессоров опухолевого процесса, факторов роста, детоксикационных систем [Кожанов Л.Г. и др., 2008; Elahi M.M. и др., 2009; Киселев В.И., 2011; Corrêa G.T. и др., 2011; Frank A.K. и др., 2011; Bleotu C. и др., 2012; Chansaenroj J. и др., 2012; Ding Q. и др., 2013; Basma H.A. и др., 2013; Ge J. и др., 2013; Shi Q. и др., 2013; Vircan S. и др., 2014], требуют детального изучения.

Существуют данные о влиянии некоторых вирусов на развитие различных злокачественных новообразований. Особое внимание следует уделить вирусу папилломы человека. Если роль ВПЧ в развитии рака шейки матки доказана, то данные, свидетельствующие о роли ВПЧ в канцерогенезе эпителия слизистых оболочек головы и шеи, противоречивы [Stephen J.K. и др., 2012; Tahtali A. и др., 2013]. Распространенность ВПЧ в опухолях головы и шеи колебалась от 17% до 53%, в среднем, составляя около 25%, в то время как у здоровых людей в ротовой полости и глотке ВПЧ встречался в среднем

по миру у 7% обследованных. Различие в частоте встречаемости вируса в эпителиальной ткани у больных и здоровых людей диктует необходимость изучения возможной роли ВПЧ в возникновении карцином головы и шеи. Кроме того, вызывает научный интерес выяснение влияния ВПЧ на патогенез опухолей, а также оценка взаимосвязи между наличием папилломавирусной инфицированности и особенностями иммунорегуляции, определяемой различными генетическими вариантами генов цитокинов. Выяснение этих аспектов возникновения и развития опухолей рта, глотки и гортани позволит персонализировать диагностику и терапию плоскоклеточных карцином такой локализации.

Степень разработанности темы

Рядом отечественных и зарубежных авторов проводилось изучение вклада вируса папилломы человека в развитие плоскоклеточных карцином головы и шеи [Rautava J., Syrjänen S., 2011; Stephen J. K. и др., 2012; Tezal M. и др., 2012; Lechner M. и др., 2013; Mehrad M. и др., 2013; Quintero K. и др., 2013; Wei W. И др., 2013], а также различные аспекты генетической предрасположенности к данной патологии [Иванов А. М., 2009; Цыган В. Н., 2010; Braakhuis B. и др., 2013; Lang J. и др., 2012; Liao G. и др., 2013; Shi Q. и др., 2013; Wang J. и др., 2013; Bhat G. A. и др., 2014; Grimm M. и др., 2014; Gupta S. и др., 2014], однако исследователи не пришли к однозначным выводам. Кроме того, не проводились комплексные исследования, учитывающие связь ВПЧ и различных генетических полиморфизмов генов цитокинов, супрессоров опухолевого роста, ферментов детоксикационной системы.

Цель исследования

Целью настоящей работы является изучение взаимосвязи папилломавирусной инфекции и рака гортани и глотки с учетом иммуногенетических особенностей пациентов, определяемых SNP-мутациями генов ключевых цитокинов, супрессоров опухолевого роста, ферментов детоксикационной системы и выявление прогностически значимых лабораторных маркеров для оценки степени риска и особенностей течения плоскоклеточных карцином головы и шеи.

Задачи исследования

1. Провести исследование опухолевой ткани пациентов с карциномами головы и шеи и образцов буккального соскоба здоровых добровольцев на наличие ДНК вируса папилломы человека методом ПЦР с учетом особенностей данных анамнеза и общеклинических исследований у больных с карциномами головы и шеи.
2. Оценить особенности гистологической картины опухолевой ткани и особенности опухолевого роста при инфекции ВПЧ.
3. Исследовать частоту встречаемости SNP мутаций промоторных участков генов ключевых цитокинов IL10 и TNF α , супрессора опухолевого роста TP53, рецептора к эпидермальному фактору роста, ферментов детоксикационной системы CYP1A1, CYP2E1, GSTP1 у больных с карциномами головы и шеи и у здоровых добровольцев.

4. Оценить роль SNP мутаций промоторных участков генов ключевых цитокинов IL10 и TNF α , супрессора опухолевого роста TP53, рецептора к эпидермальному фактору роста, ферментов детоксикационной системы CYP1A1, CYP2E1, GSTP1 в развитии карцином головы и шеи в присутствии ВПЧ.

5. Выявить прогностически значимые лабораторные маркеры для оценки степени риска и особенностей течения плоскоклеточных карцином головы и шеи и на их основе разработать алгоритм обследования пациентов.

Научная новизна

Впервые показаны особенности развития карцином головы и шеи у пациентов с инфекцией ВПЧ опухолевой ткани, в зависимости от генотипов генов TP53 и IL10. Определена значимость аллельного полиморфизма генов TP53 Pro72Arg, IL10 592C>A, IL10 G1082A, CYP2E1 c1/c2 как факторов риска развития карцином головы и шееразличных локализаций.

Разработан алгоритм обследования при этих патологиях с учетом наличия ВПЧ и различных вариантов генов ключевых цитокинов, супрессоров опухолевого роста, ферментов детоксикационной системы.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенного исследования было дано представление о взаимосвязи вируса папилломы человека и развития рака гортани и глотки, а также выявлены особенности течения карцином головы и шеи в зависимости от полиморфизма ряда генов систем иммунорегуляции, детоксикации, апоптоза, а также от наличия инфицированности вирусом папилломы человека эпителиальной ткани верхних дыхательных путей.

Определены возможные прогностически значимые лабораторные маркеры для оценки степени риска и особенностей течения карцином головы и шеи и на их основе разработан алгоритм обследования при этих патологиях с учетом наличия ВПЧ и различных вариантов генов ключевых цитокинов, супрессоров опухолевого роста, ферментов детоксикационной системы. Показанные особенности течения заболевания в зависимости от генотипов ряда генов позволят индивидуализировать ведение пациента и прогнозировать исход болезни. Результаты исследования могут быть использованы в практической деятельности врачей клинической лабораторной диагностики и онкологов, а рекомендации к оценке риска развития опухолей головы и шеи могут использоваться в кабинетах медицинской помощи при отказе от курения в поликлиниках.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленной цели научной работы были использованы анализ литературы и современные методы статистической обработки данных. Лабораторное исследование выполнено на высокотехнологичном оборудовании. Объектами исследования являлись пациенты с плоскоклеточными карциномами гортани, глотки, ротовой полости; здоровые добровольцы, не имеющие онкологической патологии. Предметом исследования являлись гематологические параметры, инфицированность вирусом папилломы человека и аллельный полиморфизм генов цитокинов,

супрессоров опухолевого роста, ферментов детоксикационной системы у обследуемых пациентов и здоровых добровольцев.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи наблюдается высокая частота распространенности ВПЧ в эпителиальной ткани верхних дыхательных путей, что характеризует важную роль ВПЧ в неопластической трансформации эпителия верхних дыхательных путей, однако опухолевый процесс у пациентов, инфицированных ВПЧ, протекает с меньшей злокачественностью.

2. Среди пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи различной локализации частота встречаемости гетерозиготного генотипа по аллельным вариантам полиморфных локусов гена CYP2E1 (c1/c2) определяет особенности функционирования ферментов системы детоксикации.

3. Вклад иммунорегуляторной системы и системы регуляции роста тканей в развитие карцином головы и шеи характеризуется более высокой частотой гомозиготного генотипа по аллелю Arg гена TP53 (Pro72Arg), а также наличием аллеля А гена IL10 (G1082A) и аллеля А гена IL10 (592C>A). Также показано, что наличие аллеля А гена TNF (G308A) и аллеля А гена IL10 (592C>A) можно рассматривать как прогностически неблагоприятные факторы.

Личный вклад автора

Автором произведен сбор анамнеза и образцов ткани и крови 120 пациентов, наблюдающихся в ГБУЗ «Волгоградский областной онкологический диспансер №1» и ГУЗ «Поликлиника №20» г. Волгограда. Диссертант самостоятельно выполнил все лабораторные исследования на базе лаборатории геномных и протеомных исследований отдела фармакологии Волгоградского медицинского научного центра ВолгГМУ. Автором проанализировано большое количество отечественных и зарубежных источников литературы по теме исследования, обоснованы цель, задачи, научная новизна и практическая значимость исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту и выводы, проведена статистическая обработка. Автором самостоятельно написан текст диссертации, автореферата, опубликованных статей.

Реализация результатов работы

Результаты работы, а именно рекомендации к оценке риска развития плоскоклеточных карцином гортани, глотки и ротовой полости, внедрены в практическую деятельность в кабинете медицинской помощи при отказе от курения в ГУЗ «Поликлиника №20» г. Волгограда (акт о внедрении от 9 июня 2015г.), а также используются в процессе обучения студентов 5-6 курсов медико-биологического факультета, интернов по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» и врачей клинической лабораторной диагностики лечебно-профилактических учреждений цикла общего усовершенствования факультета усовершенствования врачей

ВолгГМУ на кафедре клинической лабораторной диагностики с курсом КЛД ФУВ ВолгГМУ (справка о внедрении от 10 июня 2015г.).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность работы подтверждается достаточным объемом клинических и лабораторных данных, полученных в результате исследования 120 пациентов, использованием современного оборудования, методов исследования и статистической обработки полученных результатов. Статистические методы соответствуют поставленным задачам, выводы и практические рекомендации логически вытекают из полученных результатов исследования.

Результаты работы были представлены на XVI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2011), юбилейной 70-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2012), XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2012), Всероссийской молодежной научной конференции «Современные проблемы биомедицинской инженерии» при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-38-10042 мол_г (Саратов, 2015). Также работа была отмечена грантом программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК», 2012-2013), а также признана лучшим инновационным продуктом для предоставления частным лицам (бизнес-ангелам) по социально значимому проекту «Развитие системы организации работы в регионах России по подготовке и отбору инновационных проектов ранних стадий и привлечению частного капитала к их финансированию» (Москва, 2013).

Апробация диссертации проведена на расширенном заседании кафедр клинической лабораторной диагностики с курсом КЛД ФУВ; молекулярной биологии и генетики; иммунологии и аллергологии; микробиологии, вирусологии и иммунологии с курсом клинической микробиологии; акушерства и гинекологии; урологии, нефрологии и трансплантологии ФУВ; фундаментальной медицины и биологии ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России (протокол № 12 от 16 апреля 2015 года).

Публикации по теме диссертации

По материалам работ опубликовано 11 печатных работ, из них 2 статьи – в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, иллюстрирована 14 рисунками, 62 таблицами и 3 схемами. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 55 отечественных и 160 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на базе кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом КЛД ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ (ректор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Петров В.И., заведующий кафедрой – доктор медицинских наук, Гумилевский Б.Ю.) за период с 2012 по 2014 годы в соответствии с планом научно-исследовательских работ.

В качестве обследуемых были выбраны 84 пациента отделения опухолей головы и шеи ГБУЗ «ВОКОД №1» возрастом от 31 до 81 лет, среди которых женщины составляли 11,9%, мужчины – 88,1%. В исследуемой группе пациенты с раком гортани составили 51,2%, с раком ротовой полости – 38,09%, с раком глотки – 10,71%. Взятие образцов опухолевой ткани произведено по время плановых операций в ВОКОД №1. Также на базе ГУЗ «Поликлиника №20» была сформирована контрольная группа, в которую вошли 36 здоровых добровольцев, не имеющих онкологической патологии, возрастом от 30 до 74 лет, среди которых женщины составляли 11,1%, а мужчины 88,9%. У добровольцев забор крови и образцов буккального соскоба производился во время плановой диспансеризации в 2013г.

Определение основных гематологических параметров осуществлялось на автоматическом гематологическом анализаторе Advia 60 (BayerDiagnostics, Германия). Определение наличия ВПЧ в образцах опухолевой ткани и буккального соскоба проводилось с помощью тест-системы «ВИПАПОЛ комплекс» производства НПО «Литех» (Россия). Генотипирование полиморфизмов промоторных участков генов цитокинов IL10 и TNF α , супрессора опухолевого роста TP53, рецептора к эпидермальному фактору роста, ферментов детоксикационной системы CYP1A1, CYP2E1, GSTP1 осуществляли методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами производства НПО «Литех» (Россия). Обработку экспериментальных данных проводили с помощью встроенных функций программы Excel из пакета Office XP (Microsoft, США), программы «Statistica 6.0» (StatSoft, США). Для сравнения частот признаков в анализируемых группах использовали двусторонний точный критерий Фишера, критерий χ^2 . Для оценки различия средних величин в попарно несвязанных выборках использовали U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми различиями считали таковые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Онкогенный потенциал вируса папилломы человека играет роль в неопластической трансформации слизистых оболочек шейки матки, а также существуют исследования, показывающие влияние ВПЧ на развитие опухолей головы и шеи, однако в этих работах приведены противоречивые результаты. Мы изучали наличие ДНК ВПЧ в образцах опухолевой ткани

пациентов и в образцах буккального соскоба здоровых добровольцев и выявили с помощью точного критерия Фишера статистически значимые различия между этими группами в частоте распространенности ВПЧ. ДНК ВПЧ в образцах буккального соскоба контрольной группы присутствовала в 5,56% случаев. ДНК ВПЧ в образцах опухолевой ткани пациентов встречалась в 27,87% случаев. Причем среди образцов опухолевой ткани у пациентов с карциномами гортани ДНК ВПЧ была обнаружена в 18,18% случаев, у пациентов с карциномами ротовой полости и глотки – в 39,29% случаев. Высокий процент встречаемости ВПЧ у пациентов может свидетельствовать о роли ВПЧ в онкогенном перерождении эпителиальной ткани головы и шеи. Это подтверждается данными литературы [RautavaJ., SyrjänenS., 2011; GillisonM.L. и др., 2012; TezalM. и др., 2012; LiX. И др., 2013].

Об этом свидетельствуют и особенности распространения инфицированных опухолей. Так, у носителей ВПЧ чаще встречаются опухоли с ранними степенями местной распространенности (T1+T2). Это может быть объяснено тем фактом, что, несмотря на возможную роль ВПЧ как фактора, провоцирующего развитие рака, сам вирус распознается иммунной системой, что запускает противовирусный, а значит и противоопухолевый иммунный ответ. Это приводит к снижению коэффициента тяжести заболевания: для носителей ВПЧ он составляет $0,32 \pm 0,12$ ед., для пациентов без ВПЧ – $0,49 \pm 0,21$ ед. Многими исследователями отмечалось, что наличие ВПЧ в опухолевой ткани можно рассматривать как прогностически благоприятный фактор увеличения выживаемости пациентов [MaxwellJ.H. и др., 2009; RautavaJ. и др., 2011; MehradM. и др., 2013; Rittà M. и др., 2013].

Для понимания сложных механизмов развития плоскоклеточных карцином головы и шеи необходимо учитывать не только образ жизни и наличие ВПЧ, но и индивидуальные генетические особенности пациентов. В настоящее время активно изучается роль полиморфных маркеров генов цитокинов, системы врожденного иммунитета, фолатного обмена, детоксикации, свертывающей системы крови в возникновении того или иного заболевания или осложнения [Протасов О.В., 2009; Рудой А.С. и др., 2009; Гумилевский Б.Ю., 2010; Арсентьева Н.А. и др., 2012; Кабурнеева О. Г., 2012; Ковалева Е.С., Гумилевский Б.Ю., 2013; Ракитина Н.С. и др., 2014].

При оценке распределения частот генотипов SNP-мутации в позиции TP53 Pro72Arg у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи и здоровых людей были выявлены статистически значимые различия между этими группами (табл.1).

Таблица 1.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта гена TP53 Pro72Arg

Показатель	Контрольная группа n=36(частота, %)	Исследуемая группа n=58(частота, %)	RR
Аллель			
Pro	36,12	28,45	0,79
Arg	63,88	71,55	1,12
Генотип			
ProPro	11,12	15,52	1,39
ProArg	50,0*	25,86*	0,52
ArgArg	38,88*	58,62*	1,5

*- статистически значимые отличия между исследуемой и контрольной группами (критерий χ^2 , $p < 0,05$).

Белки p53 с остатком Pro и с остатком Arg в положении 72 снижают способность к апоптозу по внутреннему пути и по внешнему пути соответственно. Этим может быть объяснены протективные свойства генотипа ProArg. Оценивание генотипа ArgArg как фактора риска развития онкологических заболеваний подтверждается и рядом исследований [Chansaenroj J. и др., 2013; Malisic. и др., 2013]. При оценке влияния различных генотипов на характер опухолевого роста было выявлено, что у носителей аллеля Pro достоверно чаще встречаются опухоли с T4 степенью распространенности и более высокие степени регионарного метастазирования (N1 и N2). Для карцином гортани факторами риска можно считать гомозиготные генотипы по аллелям Pro и Arg, кроме того, с помощью точного критерия Фишера была показана частая распространенность ВПЧ у пациентов с генотипом ProArg по сравнению с носителями генотипа ArgArg. Данный факт подтверждается данными литературы [Mehrad M. и др., 2013; Rittà M. и др., 2013; Shi Q. и др., 2013] и может свидетельствовать о роли ВПЧ в возникновении рака гортани при протективном генотипе гена TP53.

Роль мутаций рецептора эпидермального фактора роста была показана для некоторых видов рака, особенно для рака легкого. Известно, что при активации EGFR запускаются внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к повышению пролиферации малигнизированных клеток; росту опухоли; стимуляции процессов инвазии, патологического ангиогенеза и метастазирования. При оценке распределения частот генотипов SNP-мутации в позиции EGFR A2073T у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи и здоровых людей различий между группами выявлено не было. При оценке влияния курения на распределение генотипов в этой позиции было показано, что частота курильщиков выше среди пациентов с генотипом TT. Была выявлена более частая распространенность ВПЧ у

пациентов с карциномами гортани с генотипом TT по сравнению с носителями аллеля А. Данные о связи ВПЧ и EGFR противоречивы [MaL. и др., 2014; Mirghani H. и др., 2014], однако можно предположить о возможной роли ВПЧ в индукции мутаций гена EGFR, что согласуется с исследованиями Almadori G. и др., 2001.

Развитие онкологических заболеваний обусловлено также иммунологическими нарушениями. Так интерлейкин 10 является одним из важнейших противовоспалительных цитокинов. При различных опухолях отмечено повышение уровня IL10, при этом считается, что повышение уровня продукции IL10 является плохим прогностическим признаком и сочетается с выраженной прогрессией опухолевого роста [Симбирцев А.С., 2004].

Мы обнаружили частую встречаемость (критерий χ^2 , $p=0,079$) генотипа GG полиморфизма IL10 G1082A у контрольной группы как по сравнению с пациентами с карциномами головы и шеи в целом (табл.2), так и с пациентами с карциномами ротовой полости и глотки.

Таблица 2.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта гена IL10 G1082A

Показатель	Контрольная группа n=36 (частота, %)	Исследуемая группа n=83 (частота, %)	RR
Аллель			
G	62,5	51,81	0,83
A	37,5	48,19	1,29
Генотип			
GG	38,89	24,1	0,62
GA	47,22	55,42	1,17
AA	13,89	20,48	1,47

При оценке распределения частот генотипов SNP-мутации в позиции IL10 592C>A была выявлена высокая распространенность (критерий χ^2 , $p=0,09$) генотипа CC у здоровых добровольцев по сравнению с пациентами с карциномами головы и шеи (табл.3).

Таблица 3.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта гена IL10 592C>A

Показатель	Контрольная группа n=36 (частота, %)	Исследуемая группа n=82 (частота, %)	RR
Аллель			
С	76,38	67,68	0,89
А	23,62	32,32	1,37
Генотип			
СС	55,55	40,24	0,72
СА	41,67	54,88	1,32
АА	2,78	4,88	1,76

Полученные результаты согласуются с литературными данными [CasevГ. и др., 2008; Ni J. и др., 2013; Zhou J. и др., 2013] и могут быть объяснены тем фактом, что аллель С сопряжен со сниженной экспрессией IL10, а наличие аллеля А может приводить к повышению количества IL10 в крови, что вызывает супрессию противоопухолевого иммунитета. При оценке влияния различных генотипов на характер опухолевого роста с помощью точного критерия Фишера было выявлено, что у носителей генотипа СС достоверно чаще встречаются опухоли с T1 и T2 степенями местной распространенности и с ранними (I и II) клиническими стадиями. Снижение экспрессии IL10 у носителей генотипа СС приводит к активации клеточного иммунитета и характеризуется меньшей злокачественностью опухолевого процесса [Torres-Poveda и др., 2012].

С помощью точного критерия Фишера была выявлена частая распространенность ВПЧ у пациентов с карциномами гортани с генотипом СС по сравнению с носителями аллеля А. Данный факт может свидетельствовать о роли ВПЧ в канцерогенезе эпителия гортани при отсутствии иммуносупрессии интерлейкином 10.

Фактор некроза опухолей альфа является провоспалительным цитокином, обладающим цитотоксическим действием, направленным на клетки опухоли либо клетки, пораженные вирусами, иммуномодулирующим действием, вызываемым активацией макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и эндотелиальных клеток. При оценке распределения частот генотипов SNP-мутации в позиции TNFG308A у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи и у пациентов с карциномами гортани и здоровых людей статистически значимых различий обнаружено не было.

При анализе значений коэффициента тяжести заболевания для пациентов с карциномами ротовой полости и глотки установлено, что у носителей аллеля А в позиции TNFG308A по сравнению с носителями генотипа GG заболевание протекает тяжелее. А для пациентов с карциномами гортани с помощью точного критерия Фишера была выявлена

более редкая встречаемость T4 степени местной распространенности опухоли у пациентов с генотипом GG по сравнению с носителями аллеля А. Все это может быть объяснено тем фактом, что замена G на А в положении 308 гена приводит к повышению уровня экспрессии TNF α [Elahi M.M. и др., 2009] и опосредованной супрессии опухолевого роста.

Кроме того, был проведен анализ комбинаций генотипов SNP-мутаций генов IL10, TP53, EGFR, TNF α у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи. В результате сравнения частот комбинаций было показано, что чаще у здоровых добровольцев встречаются генотипы ProArg GG, ProArgAT, ProArg CC для генов TP53 Pro72Arg и TNFG308A, EGFR A2073T, IL10 592C>A соответственно. Также как факторы защиты можно рассматривать комбинации генотипов ATCC для генов EGFR A2073T и IL10 592C>A. Относительный риск для всех этих комбинаций составил 0,38 – 0,5 ед. Достоверно чаще у пациентов с карциномами головы и шеи по сравнению с контрольной группой встречались комбинации генотипов ArgArg AT, ArgArg CA, ArgArg AA для генов TP53 Pro72Arg и EGFR A2073T, IL10 592C>A, IL10 G1082A соответственно. Также как факторы риска можно рассматривать комбинацию генотипов ATCA для генов EGFR A2073T и IL10 592C>A и комбинацию AACA для мутаций IL10 G1082A/IL10 592C>A. Относительный риск для всех этих комбинаций составил 1,64 – 1,79 ед.

Интересен вопрос о возникновении карцином головы и шеи в связи с курением и приемом алкоголя. Ферменты цитохрома P450 метаболизируют канцерогены, переводя их в неактивное состояние, в то же время эти ферменты могут придавать некоторым химическим веществам канцерогенный потенциал. Поэтому исследование генетических вариантов ферментов цитохрома P450 актуально в аспекте развития различных видов рака [Wu B. И др., 2013; Bhat G.A. и др., 2014; Han L.Y. и др., 2014; Roszak A. и др., 2014].

При оценке распределения частот генотипов SNP-мутации в позиции CYP1A1 Ile462Val и GSTP1 Ile105Val у пациентов с карциномами головы и шеи статистически значимых различий обнаружено не было. Для последнего полиморфизма показана более частая встречаемость T1 степени местной распространенности опухоли у пациентов с карциномами гортани с генотипом IleIle по сравнению с носителями аллеля Val, что позволяет рассматривать наличие аллеля Val как неблагоприятный признак для прогноза тяжести ракового заболевания [Pliarchopoulou K. и др., 2012].

Оценка роли полиморфизма CYP2E1 c1/c2 противоречива в трудах многих исследователей. Ряд работ показывает влияние на развитие различных видов рака аллеля c1 [Basma H.A. и др., 2013; Bhat G.A. и др., 2014], другие – аллеля c2 [Sierra-Torres C.H. и др., 2006]. Мы же при оценке распределения частот генотипов SNP-мутации в позиции CYP2E1 c1/c2 у пациентов с карциномами головы и шеи и здоровых людей обнаружили более широкую распространенность генотипа c1c2 в исследуемой группе по сравнению с контрольной (табл. 4). Эти же особенности распределения справедливы и для пациентов с карциномами гортани.

Таблица 4.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта гена CYP2E1 c1/c2

Показатель	Контрольная группа n=36 (частота, %)	Исследуемая группа n=58 (частота, %)	RR
Аллель			
c1	73,6	68,11	0,93
c2	26,4	31,89	1,21
Генотип			
c1c1	66,66	53,46	0,8
c1c2	13,88	29,3	2,11
c2c2	19,46	17,24	0,89

Также был проведен анализ комбинаций генотипов SNP-мутаций генов CYP1A1, GSTP1, CYP2E1 у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи. В результате сравнения частот комбинаций было показано, что чаще у здоровых добровольцев встречаются генотипы IleIle/c1c1 для генов GSTP1 и CYP2E1. Относительный риск для этой комбинации составил 0,56 ед. Чаще у пациентов с карциномами головы и шеи по сравнению с контрольной группой встречались комбинации генотипов IleIle/ c1c2 для генов CYP1A1/CYP2E1, а также IleIle/c1c2 для генов GSTP1/CYP2E1. Относительный риск для всех этих комбинаций составил 1,8 – 2,12 ед.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена значимая роль ВПЧ в развитии опухолевого процесса. Это подтверждается тем, что вирус папилломы выявляется в 5 раз чаще среди пациентов с карциномами головы и шеи по сравнению со здоровыми добровольцами (27,87% в исследуемой группе; 5,55% в контрольной группе). В образцах опухолевой ткани пациентов с карциномами гортани ДНК ВПЧ обнаружена в 18,18% случаев, у пациентов с карциномами ротовой полости и глотки в 39,29% случаев.

2. Модулирующее влияние ВПЧ на опухолевый процесс проявляется в том, что у ВПЧ-инфицированных пациентов в 2,2 раза выше частота опухолей, обладающих медленной прогрессией, коэффициент тяжести заболевания (клиническая стадия/длительность клинического периода, мес.) для носителей ВПЧ он составляет $0,32 \pm 0,12$ ед., для пациентов без ВПЧ – $0,49 \pm 0,21$ ед.

3. Особенности полиморфизма промоторных участков гена TP53 играют роль в развитии и течении опухолевого процесса. Так, в 1,5-1,84 раз чаще генотип ArgArg гена TP53 Pro72Arg встречается у пациентов с карциномами головы и шеи различных локализаций по сравнению с контрольной группой, в то время как в 1,93-2,33 раза генотип ProArg чаще

встречается в контрольной группе. У носителей аллеля Pro чаще встречаются опухоли с T4 степенью и N1-N2 степенями местного метастазирования.

4. При исследовании влияния различных SNP-мутаций генов цитокинов было выявлено, что с большей частотой распространены у здоровых добровольцев генотипы GG гена IL10 G1082A и CC гена IL10 592C>A по сравнению с пациентами с карциномами головы и шеи различных локализаций. У пациентов с генотипом CC гена IL10 592C>A обнаружена высокая частота опухолей с ранними клиническими стадиями и степенями местной распространенности. А для носителей аллеля A гена TNFG308A показано более тяжелое течение карцином различной локализации.

5. Определена более высокая частота инфицированности ВПЧ пациентов с генотипом ProArg гена TP53 и с генотипом CC гена IL10 592C>A, что может свидетельствовать о роли ВПЧ в возникновении рака гортани при протективных генотипах данных генов.

6. При оценке особенностей генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации было показано, что генотип c1c2 гена CYP2E1 c1/c2 в 1,8 – 2,18 раза встречается у пациентов с карциномами головы и шеи различной локализации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для обследования пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи и пациентов группы риска рекомендуется определить:

- Наличие ДНК ВПЧ в эпителиальной ткани буккального соскоба;
- Полиморфизмы генов TP53 (Pro72Arg), IL10 (592C>A и G1082A), CYP2E1 (c1/c2).

Риск оценивать по следующей таблице 5.

Таблица 5.

Основные факторы риска развития плоскоклеточных карцином головы и шеи

Параметр	Значение	Соотношение шансов
TP53 (Pro72Arg)	ArgArg	1:2,23
IL10 (592C>A)	CA, AA	1:1,86
IL10 G1082A	GA, AA	1:2,01
CYP2E1 (c1/c2)	c1c2	1:2,57
ДНК ВПЧ в буккальном соскобе	Наличие	1:7,05

2. Для обследования пациентов с плоскоклеточными карциномами гортани и пациентов группы риска рекомендуется определить:

- Наличие ДНК ВПЧ в эпителиальной ткани буккального соскоба;
- Полиморфизмы генов TP53 (Pro72Arg), CYP2E1 (c1/c2).

Оценку рисков развития плоскоклеточных карцином гортани рекомендуется проводить по следующей таблице 6.

Таблица 6.

Основные факторы риска развития плоскоклеточных карцином гортани

Параметр	Значение	Соотношение шансов
TP53 (Pro72Arg)	ArgArg,ProPro	1:2,33
CYP2E1 (c1/c2)	c1c2	1:2,7
ДНК ВПЧ в буккальном соскобе	Наличие	1:3,78

3. Для обследования пациентов с плоскоклеточными карциномами глотки и ротовой полости и пациентов группы риска рекомендуется определить:

- Наличие ДНК ВПЧ в эпителиальной ткани буккального соскоба;
- Полиморфизмы генов TP53 (Pro72Arg), IL10 (592C>A и G1082A), TNFa (G308A), CYP2E1 (c1/c2).

Оценку рисков развития плоскоклеточных карцином ротовой полости и глотки рекомендуется проводить по следующей таблице 7.

Таблица 7.

Основные факторы риска развития плоскоклеточных карцином ротовой полости и глотки

Параметр	Значение	Соотношение шансов
TP53 (Pro72Arg)	ArgArg	1:3,93
IL10 (G1082A)	GA, AA	1:2,39
ДНК ВПЧ в буккальном соскобе	Наличие	1:11,0

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Одними из дальнейших направлений работы являются продолжение изучения влияния SNP генов цитокинов, факторов врожденного иммунитета, фолатного обмена с расширением спектра оцениваемых SNP-мутаций для составления многофакторных прогностических критериев развития плоскоклеточных карцином головы и шеи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований

1. Головнова К.А. Роль SNP-мутаций генов IL10 и TNF α у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи. Вестник ВолгГМУ – 2015. – №1. – С.111-114.
2. Головнова К.А., Гумилевский Б.Ю. SNP-мутации комплекса иммунорегуляторных молекул при раке головы и шеи разной локализации. - Врач-аспирант, 1.2(68), - 2015. – С.220-224.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

3. Ващенко К.А. (Головнова К.А.) Роль выявления вируса папилломы человека в диагностике и профилактике рака гортаноглотки. Вестник РГМУ. Периодическое медицинское издание. – М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России. – 2012, Специальный выпуск № 1. – 548 с., 239-240.
4. Ващенко К.А. (Головнова К.А.) Изучение влияния вируса папилломы человека на особенности опухолевого процесса при раке гортани. Сборник тезисов по материалам XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине», г.Казань – 2012, 397 стр., 278.
5. Ващенко К.А. (Головнова К.А.), Гумилевский Б.Ю. Эпидемиологические аспекты инфицированности вирусом папилломы человека при раке гортани. профилактическая медицина – 2011: Материалы конференции 24 ноября 2011 года/ Под редакцией д.м.н. А.В.Силина. – Спб.: СЗГМУ им. И.И.Мечникова. – 2011. – 348стр., 71-73.
6. Vashchenko К.А. (Головнова К.А.) The role of genetic predisposition to cancerogenesis of pharyngeal neoplasms in the presence of human papillomavirus infection. Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы юбилейной 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2012. – 658 с., 279-280.
7. Ващенко К.А. (Головнова К.А.) Иммуногенетические аспекты развития рака гортани в присутствии папилломавирусной инфекции. Тезисдоповідей 19-20 квітня 2012 р. 72 Всеукраїнськанауково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «МЕДИЦИНА ТА ФАРМАЦІЯ XXI СТОЛІТТЯ – КРОК У МАЙБУТНЄ», г.Запорозжє, 2012. – 238 стр., 62-63.
8. Ващенко К.А. (Головнова К.А.) О влиянии разных типов вируса папилломы человека на свойства рака гортани. XVI Региональная

- конференция молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2011. – 232 с., 132-134.
9. Головнова К.А. Оценка роли SNP-мутаций генов TP53 Pro72Arg и EGFR A2073T в развитии плоскоклеточных карцином головы и шеи в присутствии папилломавирусной инфекции. XIX Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – 210 с., 140-142.
 10. Головнова К.А. Роль вируса папилломы человека и некоторых генетических полиморфизмов в развитии плоскоклеточных карцином головы и шеи. Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, посвященной 80-летию ВолгГМУ – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2015. – 777 с., 102-103.
 11. Головнова К.А. Новые аспекты ранней диагностики плоскоклеточных карцином головы и шеи. Современные проблемы биомедицинской инженерии: сборник материалов Всероссийской молодежной научной конференции. 6-8 апреля 2015 г. – М.: Прондо, 2015.– 433 с., 147-151.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПЧ – вирус папилломы человека
СYP – цитохром P450
EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
GSTP – глутатион-S-трансфераза P
IL – интерлейкин
SNP – единичный нуклеотидный полиморфизм
TNF- α – фактор некроза опухоли- α
TP53 – ген белка p53