

УДК 617.51/.53-006.61-037:577.2

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-61-69>

Для цитирования: Какурина Г.В., Колегова Е.С., Черемисина О.В., Чойнзонов Е.Л. Новые кандидатные маркеры плоскоклеточного рака головы и шеи. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3): 61–69.

## Новые кандидатные маркеры плоскоклеточного рака головы и шеи

Какурина Г.В.<sup>1</sup>, Колегова Е.С.<sup>1,2</sup>, Черемисина О.В.<sup>1</sup>, Чойнзонов Е.Л.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)  
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 2

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Для выявления новых маркеров ранней диагностики и прогноза течения плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ) необходимо изучение молекулярных особенностей этого заболевания.

**Цель исследования.** Сравнительный анализ протеома сыворотки крови больных ПРГШ и здоровых волонтеров, выбор и оценка возможности использования выбранных маркеров для ранней диагностики ПРГШ.

**Материалы и методы.** Протеомный анализ сыворотки крови первичных больных ПРГШ с лимфогенными метастазами, без метастазов и здоровых лиц проводили на масс-спектрометре UltraFlexIII TOF/TOF (Bruker, США). Валидация результатов проводилась методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови 52 первичных больных ПРГШ (T1-4N0-3M0), 10 пациентов с хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани (ХГЗГ) с дисплазией эпителия II–III степени и 10 здоровых лиц. Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0

**Результаты.** Протеом сыворотки крови больных ПРГШ с метастазами, без метастазов и здоровых лиц различен и содержит белки разных классов. Для валидации полученных результатов выбраны САР1 и РРМ1В. Показано, что сывороточный уровень САР1 и РРМ1В различался в группах контроль – ХГЗГ, ХГЗГ – рак ( $p \leq 0,05$ ). У больных ПРГШ (T1-N0-M0) уровень сывороточного САР1 был выше, чем у пациентов с ХГЗГ и здоровых лиц почти в два раза ( $p \leq 0,05$ ). Уровень сывороточного РРМ1В у больных ХГЗГ и ПРГШ (T1-N0-M0) также был выше контрольного ( $p \leq 0,05$ ) и сохранял тенденцию к росту с увеличением стадии. Отмечена положительная связь уровня САР1 в сыворотке крови с наличием метастазов и уровнем РРМ1В.

**Заключение.** Выявлено несколько кандидатных сывороточных маркеров. Показана зависимость сывороточных уровней САР1 и РРМ1В от размера первичного опухолевого очага, уровня САР1 от наличия регионарных метастазов. Определение САР1 в сыворотке крови может быть полезным для ранней диагностики в группе пациентов с ХГЗГ и для прогноза течения ПРГШ.

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак головы и шеи, ранняя диагностика, прогноз, хронические гиперпластические заболевания гортани, дисплазия эпителия, протеинфосфатаза 1В, аденилил циклаза-ассоциированный протеин 1.

✉ Какурина Гелена Валерьевна, e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Рак области головы и шеи относится к числу социально значимых онкологических заболеваний, составляя около 15–20% среди всех злокачественных опухолей, из которых 90% – это плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ). ПРГШ характеризуется высокой агрессивностью, высоким уровнем запущенности и длительным бессимптомным течением. Известно, что клинически опухоль начинает проявлять себя на III–IV стадиях заболевания, когда у пациентов метастазы определяются уже в регионарных лимфоузлах и отдаленных органах. Около 40% больных с данным заболеванием погибают на первом году после постановки диагноза [1].

Процессы метастазирования и рецидивирования злокачественных новообразований, в том числе и ПРГШ, являются основной причиной смерти пациентов, поэтому поиск прогностических маркеров является очень важной задачей. Для понимания сложного процесса развития злокачественной опухоли требуется всестороннее описание изменений на разных уровнях молекулярно-биологической системы [2–7]. На сегодняшний день проведено большое количество исследований и накоплен достаточный материал для понимания процессов опухолевой прогрессии. Однако до сих пор нельзя с полной уверенностью определить риск злокачественной трансформации и биологическое поведение опухоли при ПРГШ. В связи с этим проблема поиска новых критериев прогноза течения этого заболевания требует дальнейшего изучения.

Цель работы – сравнительный анализ протеома сыворотки крови больных ПРГШ и здоровых волонтеров, выбор и оценка возможности использования выбранных маркеров для ранней диагностики ПРГШ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования явилась сыворотка крови больных ПРГШ ( $n = 52$ ), пациентов с хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани с дисплазией эпителия II–III степени (ХГЗГ) ( $n = 10$ ) и практически здоровых лиц ( $n = 10$ ) (табл. 1). В исследование включены больные ПРГШ, поступившие на лечение в отделение опухолей головы и шеи НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН (г. Томск). Материал для исследования забирался до проведения специального лечения. Средний возраст обследованных лиц составил ( $53 \pm 5,3$ ) года.

Т а б л и ц а 1  
Table 1

| Исходные данные по количеству пациентов, вошедших в исследование<br>Baseline data for the number of patients entered into the study |   |  |
|---|---|--|
| Группа<br>Group   | Протеомный анализ<br>Proteomic analysis | Иммуноферментный анализ<br>Enzyme-linked immunoassay |
| Больные ПРГШ<br>Patients with HNSCC   | 20                                      | 52   |
| Пациенты с ХГЗГ<br>Patients with CHLED  | –                                       | 10   |
| Здоровые волонтеры<br>Healthy volunteers  | 10                                      | 10   |

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2–6: ПРГШ – плоскоклеточный рак головы и шеи, ХГЗГ – хронические гиперпластические заболевания гортани с дисплазией эпителия II–III степени.

N o t e. Here and in the tables 2-6: HNSCC – head and neck squamous cell carcinoma, CHLED – chronic hyperplastic laryngopathy with epithelial dysplasia II–III.

Протеомный анализ сыворотки крови 20 первичных больных ПРГШ с гистологически верифицированным диагнозом и 10 здоровых волонтеров проводили на базе ЦКП МТЦ СО РАН. Группа больных ПРГШ с метастазами составила 10 (T2-4N1-3M0), без метастазов 10 человек (T1-2N0-M0). Сыворотку крови получали в соответствии с утвержденным протоколом, замораживали в жидком азоте ( $-195,75$  °C) и хранили при  $-80$  °C. Все образцы обрабатывали с помощью набора Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, США) и очищали от изобилующих белков на колонках Albumin & IgG Depletion SpinTrap (GE Healthcare, США). Концентрацию общего белка во всех образцах измеряли методом Брэдфорда [8] и доводили до 5 мг/мл. Затем сыворотка крови подвергалась денатурирующему гель-электрофорезу по методу Laemmli U.K. в пластинах градиентного 8–16%-го ПААГ в присутствии 0,1% SDS. Обнаружение белковых зон в гелях ПААГ осуществляли методом окраски Coomassie Brilliant Blue R-250 (40% метанола : 5% уксусной кислоты : 0,1 % Coomassie R-250). Анализ изображения гелей проводили с помощью специализированного программного обеспечения Analysis Software PDQuest 8.0.1. системы гель-документирования VersaDoc Imaging System (4000 MP, Bio-Rad). Представленные результаты выражали в баллах в виде  $M \pm m$ . Участки ПААГ-геля, содержавшие интересующие белки, вырезали и подвергали протеолизу согласно метода J. Rosenfeld [9]. Пептидные фрагменты белков концентрировали

и обессоливали на микроколонках C18 ZipTIPS (Millipore Corporation, Billerica, MA) и элюировали на мишень приборной пластины насыщенным раствором матрикса (10 мг/мл СНСА или ТНАР в смеси 50% ацетонитрила и 0,1% ТФУ). Масс-спектры пептидных фрагментов снимали на масс-спектрометре UltraFlexIII TOF/TOF (Bruker, США) в диапазоне молекулярной массы от 200 Да до 4 кДа с матрицей СНСА/ТНАР с точностью до 0,002%.

Идентификацию белков проводили, используя базы данных с применением алгоритма Mascot в программе Biotoools 3.2 (BrukerDaltonics, Германия, <http://www.bdal.de>), базы данных NCBIInr и SwissProt. Определение наиболее вероятной аминокислотной последовательности фрагментированного пептида, не идентифицированного программой Biotoools 3.2, проводили с помощью программы «Секвенирование *de novo*». Достоверность предлагаемых программой последовательностей проверяли путем сравнения экспериментально полученных молекулярных масс фрагментов с теоретически рассчитанными при помощи функции Sequence Editor.

Валидацию выбранных кандидатных маркеров CAР1 и PPM1В проводили в сыворотке крови 52 больных ПРГШ с гистологически верифицированным диагнозом (Т1-4N0-3M0, 46 мужчин; 6 женщин), 10 пациентов с ХГЗГ (7 мужчин, 3 женщины) и 10 практически здоровых лиц. Анализ проводили с помощью наборов ИФА Human protein phosphatase 1В, magnesium-dependent, beta isoform (PPM1В) ELISA Kit (MyBioSource) и Human Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAР1) ELISA kit (Cusabio) на микропланшетном ИФА-ридере Anthos Reader 2020 (Biochrom).

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 6.0. Для проверки значимости различий в группах использовали непараметрические критерии: тест Краскела – Уоллиса и тест Манна – Уитни. Результаты представлены в виде медианы с интерквартильным размахом  $Me(Q_1; Q_3)$ , – количество человек. Значимость различий между группами определяли с помощью критерия Манна – Уитни (U-test). Для оценки взаимосвязей между показателями использовался непараметрический коэффициент ранговой корреляции Спирмена, который считали статистически значимым при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение электрофореграмм сыворотки крови здоровых лиц и больных ПРГШ выявило различия в интенсивности белковых полос в диапазоне массы 10–120 кДа (табл. 2). Сывороточный протеом больных ПРГШ без метастазов и здоровых лиц различался по содержанию белков массой 10, 25, 50 и 75 кДа. Анализ сывороточного протеома больных ПРГШ, имеющих регионарные метастазы, обнаружил белки массой 10, 12, 15, 18, 40, 100 кДа, содержание которых было выше, чем в группах здоровых лиц и больных ПРГШ без метастазов. Идентификация белков методами масс-спектрометрического анализа в выделенных бэндах показала содержание: аполипопротеина А1 и А2, серотрансферрина, протеинфосфатазы 1В, аденилил циклаза-ассоциированного протеина 1, комплемента С3, матриксного экстрацеллюлярного фосфогликопротеина, сывороточного амилоида А и др. (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 2  
T a b l e 2

| Протеомный анализ сыворотки крови здоровых лиц, больных ПРГШ без метастазов и с метастазами в регионарный лимфатический аппарат, баллы, $M \pm m$<br>Proteomic analysis of blood serum in healthy people, patients suffering HNSCC without metastasis and with metastasis to regional lymphatic apparatus, scores, $M \pm m$ |                      |  |  |
|--|----------------------|--|--|
| Идентифицированные белки<br>Identified proteins  | Контроль<br>Controls | Пациенты без метастазов<br>Patients without metastasis | Пациенты с метастазами<br>Patients with metastasis |
| САА, сывороточный амилоид А<br>SAA, serum amyloid A  | 1836,4 ± 375         | 4084 ± 852<br>$p = 0,0061$                             | 14379,4 ± 245<br>$p_1 = 0,00003$                   |
| АРО1, аполипопротеин А1<br>APO1, apolipoprotein A1   | 11027,5 ± 989        | 7981,5 ± 308<br>$p = 0,04$                             | 10658,2 ± 422                                      |
| PPM1В, протеинфосфатаза 1В<br>PPM1В, protein phosphatase 1В  | 10852,8 ± 1455       | 12043,8 ± 807  | 15344,4 ± 473                                      |
| С3, комплемент С3<br>C3, complement C3   | 2315,1 ± 369         | 3087,2 ± 946   | 5229,9 ± 227<br>$p_1 = 0,003$                      |

О к о н ч а н и е т а б л . 2  
E n d o f t a b l e 2

| Идентифицированные белки<br>Identified proteins   | Контроль<br>Controls | Пациенты без метастазов<br>Patients without metastasis | Пациенты с метастазами<br>Patients with metastasis |
|---|----------------------|--|--|
| MEPE, матриксный экстрацеллюлярный фосфо-гликопротеин<br>MEPE, matrix extracellular phosphoglycoprotein   | 5879,6 ± 952         | 3823,2 ± 153   | 6034,9 ± 101                                       |
| TRFE, серотрансферрин<br>TRFE, serotransferrin  | 8800,0 ± 268         | 7140,2 ± 157   | 5520,5 ± 167                                       |
| SAP1+A2M, аденилил циклаза-ассоциированный протеин 1, альфа-2 макроглобулин<br>SAP1+A2M, adenylyl cyclase-associated protein 1, alpha-2-macroglobulin | 3876,8 ± 308         | 5651,5 ± 272<br>$p = 0,02$                             | 7881,8 ± 204<br>$p_1 = 0,016$                      |

П р и м е ч а н и е. Уровень статистической значимости различий с группой контроля ( $p$ ); с группой пациентов без метастазов ( $p_1$ );  $n$  – количество пациентов.

N o t e. Statistical significance point of differences as compared to controls ( $p$ ); to patients without metastasis ( $p_1$ );  $n$  – number of patients.

Основываясь на литературных данных и методах статистического анализа, для дальнейших исследований на первом этапе были выбраны кандидатные маркеры – SAP1 и PPM1B. Было показано,

что уровень SAP1 и PPM1B различался в сыворотке крови, опухолевой ткани и морфологически не измененной ткани (табл. 3). Самый высокий уровень исследуемых белков отмечен в опухолевой ткани.

Т а б л и ц а 3  
T a b l e 3

| Содержание SAP1 и PPM1B в сыворотке крови в различных образцах, взятых у больных ПРГШ<br>Levels of SAP1 and PPM1B in blood serum in different samples taken from the patients with HNSCC |                            |     |                              |     |
|--|----------------------------|-----|------------------------------|-----|
| Показатель<br>Characteristic   | SAP1, пг/мл<br>SAP1, pg/ml |     | PPM1B, нг/мл<br>PPM1B, ng/ml |     |
|  | $Me (Q_1; Q_3)$            | $n$ | $Me (Q_1; Q_3)$              | $n$ |
| Сыворотка крови<br>Blood serum   | 82 (56; 114)               | 52  | 0,74 (0,5; 1,3)              | 45  |
| Опухолевая ткань<br>Tumor tissue   | 878,6 (682,8; 1185)        | 36  | 3,73 (3,4; 4,4)              | 28  |
| Условно нормальная ткань<br>Conditionally healthy tissue   | 408,5 (389; 558)           | 12  | 1,5 (1,2; 1,9)               | 12  |

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 4–6: SAP1 – аденилил циклаза-ассоциированный протеин 1, PPM1B – протеинфосфатаза 1B.  
N o t e. Here and in the tables 4-6: SAP1 – adenylyl cyclase-associated protein 1, PPM1B – protein phosphatase 1B.

В представленной выборке пациентов не выявлено зависимости содержания исследуемых белков от пола пациентов: для мужчин SAP1 87 (57; 115) пг/мл и PPM1B 0,75 (0,55; 1,3) нг/мл; и для женщин SAP1 76,7 (52,9; 81) пг/мл и PPM1B 0,7 (0,59; 1,79) нг/мл.

Для оценки зависимости содержания белков в сыворотке крови от возраста пациентов все больные ПРГШ и ХГЗГ были разбиты на возрастные группы: 21–45, 46–55 и 56–70 лет. Достоверно

различался уровень PPM1B в сыворотке крови более молодых пациентов (21–45 лет) от пациентов старших групп (табл. 4).

Анализ уровня SAP1 в сыворотке крови в группах практически здоровых, больных ХГЗГ и больных ПРГШ с разной стадией заболевания показал достоверное различие во всех представленных группах в зависимости от тяжести патологии (медианный тест  $\chi^2 = 17,22462$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,0006$ ; Kr–W test:  $H(4, N = 70) = 30,0000$ ).

Т а б л и ц а 4  
T a b l e 4

| Содержание SAP1 и PPM1B в сыворотке крови в зависимости от возрастной группы пациентов<br>Levels of SAP1 and PPM1B in blood serum depending on the age group of patients |                          |                 |                          |                  |                          |                    |
|--|--------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|
| Белок<br>Protein   | 21–45 лет<br>21–45 years |                 | 46–55 лет<br>46–55 years |                  | 56–70 лет<br>56–70 years |                    |
|  | $n$                      | $Me (Q_1; Q_3)$ | $n$                      | $Me (Q_1; Q_3)$  | $n$                      | $Me (Q_1; Q_3)$    |
| SAP1, пг/мл<br>SAP1, pg/ml   | 6                        | 62,6 (47; 78)   | 18                       | 77,4 (42,8; 115) | 28                       | 83,7 (53,7; 100,7) |

О к о н ч а н и е т а б л . 4  
E n d o f t a b l e 4

| Белок<br>Protein             | <i>n</i> | 21–45 лет<br>21–45 years | <i>n</i> | 46–55 лет<br>46–55 years            | <i>n</i> | 56–70 лет<br>56–70 years            |
|------------------------------|----------|--------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|
| PPM1B, нг/мл<br>PPM1B, ng/ml | 6        | 0,45 (0,28; 0,6)         | 14       | 0,68 (0,5; 1,07)<br><i>p</i> = 0,02 | 25       | 0,7 (0,47; 1,34)<br><i>p</i> = 0,02 |

П р и м е ч а н и е: *p* – уровень статистической значимости различий с группой больных в возрасте 21–45 лет.  
N o t e: *p* – statistical significance point of differences as compared to patients aged 21–45 years old.

При межгрупповом сравнении выявлено, что содержание САР1 в сыворотке крови практически здоровых лиц было ниже в 1,6 раза, чем у больных ХГЗГ, и в 3,5 раза ниже, чем у больных ПРГШ со стадией заболевания Т1-Н0-М0 (табл. 5). Самый высокий уровень белка отмечал-

ся в группе больных ПРГШ со стадией заболевания Т1-Н0-М0 и Т4-Н0-3М0. Также отмечены достоверные различия в содержании сывороточного САР1 в группах больных ПРГШ без метастазов и с метастазами в регионарный лимфатический аппарат (табл. 6).

Т а б л и ц а 5  
T a b l e 5

| Содержание САР1 и РРМ1В в сыворотке крови в группах здоровых лиц, больных ПРГШ и ХГЗГ, <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i><br>Levels of САР1 and РРМ1В in blood serum of healthy people, patients with HNSCC and CHLED, <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i> |          |  |  |
|---|----------|--|--|
| Группы больных<br>Patient group   | <i>n</i> | САР1, пг/мл<br>САР1, pg/ml   | РРМ1В, нг/мл<br>РРМ1В, ng/ml   |
| Контрольная группа<br>Controls  | 10       | 25,0 (24,8; 25,5)  | 0,268 (0,15; 0,42)   |
| ХГЗГ<br>CHLED   | 10       | 41,0 (25; 73,0)<br><i>p</i> <sub>0</sub> = 0,002                                   | 0,403 (0,36; 0,46)<br><i>p</i> <sub>0</sub> = 0,03                                 |
| ПРГШ<br>(Т1-Н0-М0)<br>HNSCC (Т1-Н0-М0)  | 14       | 87,7 (78; 114,0)<br><i>p</i> <sub>0</sub> = 0,001<br><i>p</i> <sub>1</sub> = 0,002 | 0,61 (0,4; 1,24)<br><i>p</i> <sub>0</sub> = 0,006<br><i>p</i> <sub>1</sub> = 0,04  |
| ПРГШ<br>(Т2-Н0-2М0)<br>HNSCC<br>(Т2-Н0-2М0)   | 14       | 77,7 (40,7; 90)<br><i>p</i> <sub>1</sub> = 0,04                                    | 0,74(0,36; 0,9)<br><i>p</i> <sub>0</sub> = 0,02                                    |
| ПРГШ<br>(Т3-4Н0-3М0)<br>HNSCC<br>(Т3-4Н0-3М0)   | 24       | 85 (49,8; 125,5)<br><i>p</i> <sub>1</sub> = 0,003                                  | 1,1 (0,59; 1,7)<br><i>p</i> <sub>0</sub> = 0,003<br><i>p</i> <sub>1</sub> = 0,0002 |

П р и м е ч а н и е. Уровень статистической значимости различий с контрольной группой (*p*<sub>0</sub>), с группой ХГЗГ (*p*<sub>1</sub>).  
N o t e. Statistical significance point of differences as compared to controls (*p*<sub>0</sub>), to patients with CHLED (*p*<sub>1</sub>).

Т а б л и ц а 6  
T a b l e 6

| Содержание САР1 и РРМ1В в сыворотке крови в группах больных ПРГШ в зависимости от наличия метастазов в регионарный лимфатический аппарат, <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i><br>Levels of САР1 and РРМ1В in blood serum of patients with HNSCC depending on the presence of metastasis in the regional lymphatic apparatus, <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i> |          |   |          |   |                   |
|--|----------|---|----------|---|-------------------|
| Белок<br>Protein   | <i>n</i> | Больные с метастазами<br>Patients with metastasis | <i>n</i> | Больные без метастазов<br>Patients without metastasis | <i>p</i> (U-test) |
| РРМ1В, нг/мл<br>РРМ1В, ng/ml   | 10       | 1,02 (0,397; 1,79)                                | 20       | 0,74 (0,534; 1,2)                                     | 0,06              |
| САР1, пг/мл<br>САР1, pg/ml   | 16       | 109 (75; 213)                                     | 22       | 69,5 (43; 90)   | 0,007             |

Содержание РРМ1В в сыворотке крови также различалось в зависимости от тяжести патологического процесса (медианный тест = 10,3,  $df = 3$ ,  $p = 0,01$ ; Kr–W test:  $H(3, N = 36) = 0,000$ ;  $p = 1,0$ ) (табл. 5). В сыворотке крови на стадии T1-N0-M0 выявлено увеличение содержания РРМ1В в два раза ( $p = 0,006$ ) в отличие от контрольной группы и в 1,5 раза ( $p = 0,02$ ) по сравнению с группой больных ХГЗГ.

Уровень гистологической организации опухоли по данным проведенного исследования значительно не отражался на содержании САР1 и РРМ1В в сыворотке крови в представленной выборке больных ПРГШ. Однако при межгрупповом сравнении уровень изучаемых белков в сыворотке крови пациентов ХГЗГ был достоверно ниже, чем в группах больных ПРГШ с разной степенью дифференцировки опухоли. Была установлена прямая и умеренная корреляционная связь между содержанием РРМ1В и САР1 в сыворотке крови больных ПРГШ ( $r = 0,7$ ;  $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, полученные результаты показали зависимость содержания САР1 и РРМ1В в сыворотке крови от стадии заболевания и наличия метастазов у больных ПРГШ представленной выборки. Установлено, что сывороточный протеом больных ПРГШ содержит белки различных классов, участвующих в разных биологических процессах. В сыворотке крови больных ПРГШ содержатся как мажорные белки, некоторые из них уже используются как маркеры, например сывороточный амилоид А (маркер воспаления) и аполипопротеин А1 (маркер риска сердечно-сосудистых заболеваний), так и минорные белки (САР1, РРМ1В и др.), которые можно предложить в качестве маркеров ПРГШ.

Показана зависимость содержания САР1 и РРМ1В в сыворотке крови от наличия лимфогенных метастазов у больных ПРГШ и тяжести заболевания. Наблюдаемое постепенное нарастание уровня РРМ1В в сыворотке крови может говорить об увеличении интенсивности процессов опухолевой трансформации и прогрессии. Результаты работы свидетельствуют о возможности использования САР1 и РРМ1В как дополнительного критерия для ранней диагностики ПРГШ и мониторинга групп больных хроническими заболеваниями гортани с морфологически подтвержденной дисплазией слизистой оболочки.

Несмотря на участие РРМ1В в регуляции различных базовых клеточных процессов [10–15], работ по изучению роли этого белка в онкогенезе в литературе крайне мало. Так, на клеточных линиях рака мочевого пузыря показана возмож-

ность использования РРМ1В в качестве одного из потенциальных диагностических маркеров при раке мочевого пузыря [13]. РРМ1В участвует в регуляции нескольких мишеней: ингибитора NF-κB, ИККβ, АМРК, CDK2, CDK6, JNKK1, p38 и TAK1, некроптозокиназы RIP3 [12, 15]. Модулируя активность перечисленных белков-мишеней, РРМ1В может участвовать в сложных сигнальных путях опухолевого роста. Увеличение уровня РРМ1В при развитии и прогрессии ПРГШ может быть связано с активацией NF-κB по альтернативному пути или быть отражением запуска более сложных сигнальных каскадов, участвующих в опухолевой трансформации и росте.

Белок САР относится к белкам, участвующим в реализации клеточной подвижности, играет важную роль в организации цитоскелета клетки, широко экспрессируется в клетках млекопитающих. Его гомологи, САР1 и САР2, явились предметом для исследования их роли в различных патологических состояниях за последние 10 лет [16–19]. В настоящий момент исследований о зависимости между экспрессией и (или) содержанием САР1 и развитием патологического процесса весьма мало. Показано участие САР1 в патогенезе немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, молочной железы, плоскоклеточного рака пищевода [19–22]. Исследований о роли САР1 в развитии и прогрессии ПРГШ в литературе не встречаются. Также в мировой литературе нет данных о вкладе РРМ1В и САР1 в развитие ПРГШ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлено несколько кандидатных сывороточных маркеров. Показано различие сывороточных уровней САР1 и РРМ1В в зависимости от размера первичного опухолевого очага, уровня САР1 от наличия регионарных метастазов. Полученные данные об увеличении содержания САР1 и РРМ1В в сыворотке крови и тканевом материале имеют как теоретическое значение для понимания процессов опухолевой трансформации и прогрессии, так и в практическом плане дают возможность в дальнейшем разработать новый критерий для ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ. Для выяснения прогностической значимости уровня САР1 и РРМ1В необходимы дополнительные исследования с увеличением числа больных в группах.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН (протокол 15 от 21.11.2017).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят глубокую благодарность канд. биол. наук, мл. науч. сотруднику Т.Г. Дужак и д-ру хим. наук, профессору, руководителю группы фотохимических реакций в лаборатории магнитных и спиновых явлений МТЦ СО РАН Ю.П. Центалович за предоставленную возможность выполнения данной работы.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Плоскоклеточный рак головы и шеи: молекулярные основы патогенеза. Чойнзонов Е.А., Кондакова И.В., Спирина Л.В., Лебедев И.Н., Гольдберг В.Е., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А., Уразова Л.Н., Какурина Г.В., Бычков В.А., Хричкова Т.Ю., Мельников А.А. М.: Наука, 2016: 224. [Head and neck squamous cell carcinoma: Molecular basis of pathogenesis. Choinzonov E.L., Kondakova I.V., Spirina L.V., Lebedev I.N., Gol'dberg V.E., Chizhevskaya S.Yu., Shishkin D.A., Urazova L.N., Kakurina G.V., Bychkov V.A., Khrichkova T.Yu., Mel'nikov A.A. M.: Nauka Publ., 2016: 224 (in Russ.)].
2. Колегова Е.С., Кондакова И.В., Завьялов А.А. Малые белки теплового шока и убиквитин-протеасомная система при злокачественных опухолях. *Вопросы онкологии*. 2016; 3: 401–405. [Kolegova E.S., Kondakova I.V., Zav'yalov A.A. Small heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome system in malignant tumors. *Voprosy onkologii – Problems of Oncology*. 2016; 3: 401–405 (in Russ.)].
3. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.А. Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи. *Вопросы онкологии*. 2012; 58 (1): 26–32. [Kakurina G.V., Kondakova I.V., Choinzonov E.L. Prognosing head and neck squamous cell carcinoma metastases. *Voprosy onkologii – Problems of Oncology*. 2012; 58 (1): 26–32 (in Russ.)].
4. Шашова Е.Е., Астахова Т.М., Плеханова А.С., Богомягкова Ю.В., Люпина Ю.В., Сумеди И.Р., Слонимская Е.М., Ерохов П.А., Абрамова Е.Б., Родоман Г.В., Кузнецов Н.А., Кондакова И.В., Шарова Н.П., Чойнзонов Е.А. Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карцином молочной и щитовидной желез. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156 (8): 209–211. [Shashova E.E., Astakhova T.M., Plekhanova A.S., Bogomyagkova Y.V., Lyupina Y.V., Sumedi I.R., Slonimskaya E.M., Erokhov P.A., Abramova E.B., Rodoman G.V., Kuznetsov N.A.,

- Kondakova I.V., Sharova N.P., Choinzonov E.L. Changes in proteasome chymotrypsin-like activity during the development of human mammary and thyroid carcinomas. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 156 (2): 242–244 (in Russ.)].
5. Кондакова И.В., Загребельная Г.В., Чойнзонов Е.Ц. Влияние NO-генерирующих соединений на опухолетоксическое действие доxorубина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 137 (6): 664–666. [Kondakova I.V., Zagrebelnaya G.V., Choinzonov E.Ts. Impact of NO-generating compounds on tumorotoxic effect of doxorubicin. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004; 137 (6): 585–587 (in Russ.)].
6. Krishnan A.R., Zheng H., Kwok J.G., Qu Y., Zou A.E., Korrapati A., Li P.X., Califano J.A., Hovell M.F., Wang-Rodriguez J., Ongkeko W.M. A comprehensive study of smoking-specific microRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral. Oncology*. 2017; 72: 56–64.
7. Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. Роль актинсвязывающих белков в клеточном движении в норме и при опухолевом росте. *Молекулярная медицина*. 2011; 6: 14–18. [Bochkareva N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. The role of actin binding proteins in normal and tumor cell motility. *Molekulyarnaya meditsina*. 2011; 6: 14–18 (in Russ.)].
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.
9. Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J.C., Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem*. 1992; 203 (1): 173–179.
10. Sun W., Yu Y., Dotti G., Shen T., Tan X., Savoldo B., Pass A.K., Chu M., Zhang D., Lu X., Fu S., Lin X., Yang J. PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha induced IKKbeta NF kappaB activation. *Cell Signal*. 2009; 2–1 (1): 95–102.
11. Takeuchi T., Kobayashi T., Tamura S., Yokosawa H. Negative regulation of protein phosphatase 2Cbeta by ISG15 conjugation. *FEBS Lett*. 2006; 580 (18): 4521–4526.
12. Wang H., Chen Y., Han J., Meng Q., Xi Q., Wu G., Zhang B. DCAF4L2 promotes colorectal cancer invasion and metastasis via mediating degradation of NFkb negative regulator PPM1B. *Am. J. Transl. Res*. 2016; 8 (2): 405–418.
13. Yang J., Yuan D., Li J., Zheng S., Wang B. MiR-186 down-regulates protein phosphatase PPM1B in bladder cancer and mediates G1-S phase transition. *Tumour Biol*. 2016; 37 (4): 4331–4341.
14. Zuo S., Xue Y., Tang S., Yao J., Du R., Yang P., Chen X. 14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components

- of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF-alpha-induced time course-dependent NF-kappaB activity. *J. Proteome Res.* 2010; 9 (7): 3465–3478. DOI: 10.1021/pr9011377.
15. Chen W., Wu J., Li L., Zhang Z., Ren J., Liang Y., Chen F., Yang C., Zhou Z., Su S.S., Zheng X., Zhang Z., Zhong C.Q., Wan H., Xiao M., Lin X., Feng X.H., Han J. Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nat. Cell Biol.* 2015; 17 (4): 434–444. DOI: 10.1038/ncb3120.
  16. Bertling E., Hotulainen P., Mattila P.K., Matilainen T., Salminen M., Lappalainen P. Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Molecular Biology of the Cell.* 2004; 15 (5): 2324–2334.
  17. Hua M., Yan S., Deng Y., Xi Q., Liu R., Yang S., Liu J., Tang C., Wang Y., Zhong J. CAP1 is overexpressed in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation. *Int. J. Mol. Med.* 2015; 35 (4): 941–949.
  18. Lee S., Lee H.C., Kwon Y.W., Lee S.E., Cho Y., Kim J., Lee S., Kim J.Y., Lee J., Yang H.M., Mook-Jung I., Nam K.Y., Chung J., Lazar M.A., Kim H.S. Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1 Is a Receptor for Human Resistin and Mediates Inflammatory Actions of Human Monocytes. *Cell Metabolism.* 2014; 19 (3): 484–497.
  19. Li M., Yang X., Shi H., Ren H., Chen X., Zhang S., Zhu J., Zhang J. Downregulated Expression of the Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Reduces Migration in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2013; 43 (9): 856–864.
  20. Yamazaki K., Takamura M., Masugi Y., Mori T., Du W., Hibi T., Hiraoka N., Ohta T., Ohki M., Hirohashi S., Sakamoto M. Adenylate cyclase associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Lab. Invest.* 2009; 89 (4): 425–432.
  21. Liu X., Yao N., Qian J., Huang H. High expression and prognostic role of CAP1 and CtBP2 in breast carcinoma: associated with E-cadherin and cell proliferation. *Med. Oncol.* 2014; 31 (3): 878. DOI: 10.1007/s12032-014-0878-7.
  22. Tan M., Song X., Zhang G., Peng A., Li X., Li M., Liu Y., Wang C. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer. *Oncol. Rep.* 2013; Oct.; 30 (4): 1639–1644. DOI: 10.3892/OR.2013.2607.

Поступила в редакцию 09.11.2017

Подписана в печать 15.05.2018

Какурина Гелена Валерьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4506-9429.

Колегова Елена Сергеевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-9122-3274; 89234407523.

Черемисина Ольга Владимировна, д-р мед. наук, зав. эндоскопическим отделением, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-7234-4708.

Чойнзонов Евгений Ахмацыренович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН; зав. кафедрой онкологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-3651-0665.

(✉) Какурина Гелена Валерьевна, e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru.

УДК 617.51/.53-006.61-037:577.2

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-61-69>

For citation: Kakurina G.V., Kolegova E.S., Cheremisina O.V., Choinzonov E.L. Molecular features of head and neck squamous cell carcinoma. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2018; 17 (3): 61–69.

## Molecular features of head and neck squamous cell carcinoma

Kakurina G.V.<sup>1</sup>, Kolegova E.S.<sup>1</sup>, Cheremisina O.V.<sup>1</sup>, Choinzonov E.L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of Russian Academy of Science (RAS) 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

### ABSTRACT

**Relevance.** To identify new markers of early diagnosis and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) it is necessary to study the molecular features of this disease.



**Purpose.** The aim of the study was to analyze blood serum protein spectrum in patients with HNSCC and in healthy volunteers using the methods of mass spectrometry and to evaluate the selected serum protein markers as candidates for early detection of HNSCC.

**Materials and Methods:** The blood serum of HNSCC patients before therapy with metastases, without metastases and healthy volunteers was studied by proteomic methods. Validation of the results of proteomic analysis was carried out by ELISA in serum of 52 patients with HNSCC (T1-4N0-3M0), 10 patients with chronic hyperplastic laryngitis, dysplasia DII-DIII and 10 healthy volunteers. The statistical analysis was carried out using Statistica 6.0. Software package.

**Results.** Blood serum proteome of HNSCC patients with metastases, without metastases and healthy volunteers are different and contain proteins of different classes. Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) and protein phosphatase 1B (PPM1B) were selected to validate the obtained results. It was shown that the serum level of CAP1 and PPM1B differed in control and dysplasia groups and dysplasia and cancer groups ( $p \leq 0,05$ ). In patients with HNSCC (T1N0M0) the serum CAP1 and PPM1B levels were higher than in patients with dysplasia and healthy individuals ( $p \leq 0,05$ ). It was noted the positive correlation of the CAP1 level in the serum with the presence of metastases and the PPM1B level.

**Conclusion.** Candidates for serum markers of HNSCC prognosis were identified. The difference in serum levels of CAP1 and PPM1B depending on the prevalence of primary tumors and the difference in serum level of CAP1 depending on the presence of regional metastases was shown. Determination of CAP1 level in the serum can be useful for early diagnosis and prognosis of HNSCC.

**Key words:** chronic hyperplastic laryngitis and pharyngitis, epithelial dysplasia, squamous cell carcinoma of head and neck, adenylyl cyclase-associated protein 1, protein phosphatase 1B.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

#### SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

#### CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the named after Cancer Research Institute, TNRMC RAS (Protocol No. 15 of 21.11.2017).

Received 09.11.2017

Accepted 15.05.2018

**Kakurina Gelena V.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Kolegova Elena S.**, Junior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Cheremisina Olga V.**, DM, Head of the Endoscopy Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Choinzonov Evgeny L.**, DM, Professor, Academician of RAS, Director of TNRMC, Cancer Research Institute, TNRMC RAS; SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Kakurina Gelena V.**, e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru.