

Изменения сывороточных маркеров активации и апоптоза при заболеваниях слизистой оболочки полости рта, ассоциированных с дисплазией эпителия.

Слюсарь Н.Н., Лебедев С.Н., Лебедева Ю.В., Красовский П.В.

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России

Актуальность. По данным отечественных исследователей, в настоящее время, злокачественные опухоли ротовой полости нередко стали выявляться среди молодых социально активных людей. В группе риска по этой нозологии все возрастные группы населения и, особенно, лица с заболеваниями слизистой оболочки полости рта (СОПР), в которых морфологически определяется дисплазия эпителия [1]. Проблема таких предраковых заболеваний челюстно-лицевой области ещё далека от своего решения. Рост заболеваемости, высокий процент рецидивов и малигнизации свидетельствует о несовершенстве диагностических и лечебных методов. Поиск новых методов дифференциальной диагностики, прогнозирования рецидивов остается актуальным.

Апоптоз играет важную роль в гомеостазе, обеспечивая физиологическое равновесие и генетическую стабильность организма за счет самоуничтожения измененных клеток. В последние годы большое внимание уделяется изучению апоптоза с точки зрения влияния его на патологические процессы, в том числе при онкологической патологии [3,4,5]. Особая роль отводится исследованиям маркеров семейства фактора некроза опухолей, способных вызвать различные биохимические изменения в клеточных структурах, а именно, индуцирующего апоптоз TNF-зависимого лиганда TRAIL (APO-2L) [8,9,10]. Наряду с мембранными молекулами активации и апоптоза в иммунных реакциях принимают участие и их растворимые формы (s-формы) рецепторов и лигандов, которые обладают иммунорегуляторными свойствами, а их уровни

также отражают процессы активации и элиминации клеток иммунной системы и могут служить маркерами течения патологического процесса. Среди ключевых молекул апоптоза, которые являются рецептором смерти, наибольший интерес представляет sCD95, выступающий как маркер поздней активации и локализующийся преимущественно на Т-лимфоцитах-хелперах, а также sCD30, способного передавать информацию для иммунной системы и связанного с пролиферацией Т и В-клеток и sCD40, соединения влияющего на опосредованный В-клеточный апоптоз и, соответственно, на различные фазы В-клеточного ответа. Эффекторное плечо апоптозного пути представлено семейством внутриклеточных протеаз, называемых каспазами. В наших исследованиях представлена Caspase-1/ICE, отвечающая за протеолитические процессы на ранней стадии апоптоза, способная функционировать как медиатор сигнала смерти. Растворимые мембранные молекулы клеток иммунной системы, особенно маркеры активации и апоптоза, исследуются при аутоиммунных, инфекционных, онкологических заболеваниях[2]. Вместе с тем, отсутствуют данные о количественных изменениях маркеров активации и апоптоза при заболеваниях полости рта, ассоциированных с дисплазией эпителия.

Все вышеизложенное и определило **цель работы** — исследование маркеров активации и апоптоза в сыворотке крови у больных с предопухоловой патологией и карциномами ротовой полости.

Материал и методы исследования. Биохимический анализ сыворотки крови выполнялся у обследованных трех групп сравнения:- у 45 лиц (25 мужчин и 20 женщин в возрасте 45-64 лет) без признаков дисплазии и онкопатологии СОПР, наблюдаемых по поводу травмы челюстно-лицевой области без повреждения эпителиальных покровов ротовой полости, на базе специализированного стоматологического кабинета травматологического пункта городской больницы №1 им. В.В. Успенского г. Твери – группа сравнения 1 (контрольная). Имеющиеся у обследованных в группе хронические

заболевания пищеварительной, бронхолегочной, мочеполовой систем организма находились, на момент исследования, в стадии ремиссии; - у 80 больных с заболеваниями, ассоциированными с признаками дисплазии различной степени эпителиальной ткани СОПР (по МКБ: K13.2-13.7, D00), подтвержденной морфологическим заключением, с преимущественной локализацией элементов поражения на языке и передне-боковых отделах дна полости рта (40 мужчин и 40 женщин в возрасте 45-64 лет) – группа сравнения 2; - у 60 больных с злокачественной опухолью (ЗО) слизистой оболочки языка и дна полости рта (по МКБ: C02, C04) - 30 мужчин и 30 женщин в возрасте 45-64 лет, с установленной первичной карциномой I-II стадией, T₁N₀M₀ -38 больных, T₂N₀M₀ – 22 больных (группа сравнения 3).

Данные, в группах обследованных, были сопоставимы по полу, возрасту, сопутствующей патологии, вредным привычкам, пищевым пристрастиям, а также основным показателям стоматологического статуса – индексам КПУУ_х и КПИ (средне-тяжелая степень поражения тканей пародонта и факторов риска заболеваний пародонта), отсутствию в полости рта несъемных ортопедических конструкций и искусственных опор. Обследованные пациенты не имели признаков ИБС, сахарного диабета, носительства маркеров гепатита В, С, ВИЧ, аллергических, аутоиммунных, инфекционных и паразитарных заболеваний (таблица 1).

Таблица 1. Частота встречаемости сопутствующих заболеваний и анамнестических признаков, а также среднее значение некоторых стоматологических индексов в группах обследованных лиц

Нозологии и показатели	Группа 1, n=45			Группа 2, n=80			Группа 3, n=60		
	абс	М	m	абс	М	m	абс	М	m
Курящие	22	48,9 %	7,45 %	31	38,8% *	5,45 %	33	55%*	6,42 %
Регул. употребл. крепких спиртных	38	84,4 %	5,41 %	66	82,5%	4,25 %	54	90%*	3,87 %

напитков					*				
Пристрастие к острой и горячей пище	41	91,1 %	4,24 %	72	90%*	3,35 %	58	96,7%*	2,3%
Частые ОРЗ, «высыпания» на СОПР и губах (2 и более раз за последний год)	15	33,3 %	7,03 %	30	37,5%*	5,41 %	25	41,7%*	6,36 %
Хронич. бронхиты	19	42,2 %	7,36 %	28	35%*	5,33 %	27	45%*	6,42 %
Заб-ния гормонозависимых органов (жен-щж, мж, щм; муж-щж, простата)	26	57,8 %	7,37 %	54	67,5%*	5,24 %	48	80%*	5,16 %
Хр. эзофагогастроуденит, ремиссия	29	64,4 %	7,14 %	53	66,3%*	5,29 %	50	83,3%*	4,82 %
КПУ(Ух)		18,1	1,04		18,6*	0,81		19,4*	0,99
УИК по П.А. Леусу		0,34			0,32			0,38	
КПИ (П.А. Леус)		2,43			2,13			3,48	
Примечание: *— $p > 0,05$ по сравнению с группой 1, т.к. $M_{2,3} - M_1 < 2(m_{2,3} + m_1)$									

Исследование содержания в сыворотке крови растворимых мембранных маркеров апоптоза — sCD95 (sAPO-1/FAS), растворимого индуцирующего апоптоз TNF-зависимого лиганда TRAIL (APO-2L), свидетелей ранней стадии эффекторного этапа апоптоза — фермента, Caspase-1/ICE, а также sCD30 и sCD40 — маркеров активации, модулирующих также процессы апоптоза, осуществляли посредством иммуноферментного анализа по общепринятым методикам (Kogaetal., 2004; Macher-Goepfenderetal., 2009) с использованием коммерческих наборов (BCMDiagnostis, Великобритания, "HumansAPO-1/FASELISA", "HumanTRAIELISA", "Human Caspase-1/ICEELISA", "HumansCD30 ELISA", "HumansCD40 ELISA", Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Россия). Единицы измерений для лиганда TRAIL – нг/мл, фермента Caspase-1/ICE, а также sCD95 и sCD40– pg/ml, для sCD30– U/ml.

Результаты и обсуждение. Анализ исследуемых биохимических показателей в сыворотке крови больных со злокачественной опухолью и предопухолевыми заболеваниями СОПР позволил установить, что содержание лиганда TRAIL, индуцирующего апоптоз в 1,4 раза ниже уровня, чем значения данного показателя у лиц без онкопатологии. Вместе с тем, показатели лиганда TRAIL в группах сравнения не выходили за пределы референсных значений и статистически не отличались между группами 2 и 3 (таблица 2).

Таблица 2. Содержание сывороточных маркеров активации и апоптоза у обследованных лиц (M±m)

Группы обследованных	TRAIL, (норма 68-130 нг/мл)	sCD30, (норма 21-31 U/ml)	sCD40, (норма 29-34pg/ml)	sCD95, (норма 310-380pg/ml)	Caspase-1/ICE, (норма 45-52 pg/ml)
Группа сравнения 1, n=45	98,6±1,7	25,5±1,7	30,6±2,1	344±20,2	50,4±3,5
Группа сравнения 2, n=80	77,5±3,6*	39,1±2,1*	44,7±2,5*	438±24,6*	37,2±2,1*
Группа сравнения 3, n=60	80,4±4,1*	37,8±2,4*	41,9±2,7*	449±26,3*	38,1±2,4*

* - достоверность различий (p<0,05) в сравнении с группой 1.

Содержание sCD30 в сыворотке крови больных групп 2 и 3, было выше нормы и в среднем, в 1,35 раза выше их значений, чем у лиц группы 1. Тенденция к увеличению количества маркера апоптоза обнаружена и при исследовании sCD40. Причем, коэффициент соотношения маркеров sCD30/sCD40 у больных раком СОПР составлял, в среднем, 0,9, тогда как у лиц без онкопатологии – 0,83.

Содержание sCD95 и Caspase-1/ICE в сыворотке крови больных групп 2 и 3, в среднем, в 1,3 раза выше их уровня, чем у лиц группы 1, (p<0,05). Однако, между группами 2 и 3 у больных не обнаружено достоверных различий количества sCD95 и Caspase-1/ICE. Учитывая регулируемую роль протеаз в иммунном ответе можно констатировать, что снижение их концентрации в сыворотке крови у больных при дисплазии и карциноме СОПР свидетельствует о комплексных ферментных изменениях и, следовательно, нарушении

элиминации иммунных клеток крови, что может приводить к прогрессированию местного диспластического процесса.

На примере пациентов с карциномой подвижной части языка (C02), у которых, с учетом визуализации первичного опухолевого очага и доступности обнаружения регионарного метастатического процесса при первичном обследовании, точно устанавливается стадия (I,II,III,IV) онкологического процесса, было проанализировано содержание маркеров активации и апоптоза в зависимости от стадии злокачественного новообразования (таблица 3).

Таблица 3. Содержание сывороточных маркеров активации и апоптоза у больных карциномой языка в зависимости от стадии заболевания (M±m)

Группы обследованных, C02	TRAIL, (норма 68-130 нг/мл)	sCD30, (норма 21-31 U/ml)	sCD40, (норма 29-34pg/ml)	sCD95, (норма 310-380pg/ml)	Caspase-1/ICE, (норма 45-52 pg/ml)
I стадия, n=6	84,3±2,5	35,5±2,1	41,5±1,7	402±10,8	40,1±1,8
II стадия, n=6	80,6±3,0	36,8±2,0	42,8±3,1	422±9,4	39,4±2,2
III стадия, n=6	72,5±3,1*	40,1±2,2	47,2±2,4	445,2±10,3*	35,2±1,5*
IV стадия, n=6	69,5±2,4*	43,4±1,5*	49,1±1,8*	448,4±11,2*	34,7±1,1*

* - достоверность различий (p<0,05) в сравнении с больными I стадией опухоли

Содержание исследуемых маркеров у больных карциномой языка I стадии статистически не отличалось от их уровня при II стадии. Вместе с тем, обнаружены достоверные различия содержания в крови больных I и III стадией заболевания лиганда семейства TNF, TRAIL - индуцирующего апоптоз, sCD95 и Caspase-1/ICE. Более существенные изменения уровня содержания маркеров обнаружены между I-II и IV стадиями опухоли. Однако, показатели содержания TRAIL, sCD30, sCD40, sCD95 и Caspase-1/ICE у больных карциномой языка III стадии незначительно отличались от их уровня у больных с IV стадией.

Заключение. Количество sCD30, sCD40 и sCD95 в сыворотке крови у больных с дисплазией эпителия СОПР, независимо от гистологического типа изменений, повышено по сравнению с их значениями у лиц без онкопатологии. Содержания в сыворотке крови больных групп 2 и 3 TRAIL и Caspase-1/ICE

снижено по сравнению с их значениями у лиц группы 1. Оценка уровня сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток может быть использована в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия, служить методом иммуномониторинга заболевания и назначенной терапии. Считаем, что определение только комбинации маркеров позволит разработать критерии диагностики, контроля за лечением и прогнозирования заболевания.

Список литературы

1. Заридзе Д.Г., Каприн А.Д., Стилиди И.С. 2018. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России // Вопросы онкологии. № 5. С. 578–591.
2. Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В. 2007. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. №4. С. 249–253.
3. Хараева З.Ф., Иванова М.Р., Шевченко А.А. 2011. Особенности ФНО-индуцированного апоптоза у больных с парентеральными гепатитами и герпетической инфекцией // Фундам. исследования. №7. С. 152-154.
4. Jalving M., de Long S., Koomstra J.J. 2006. Trail induced Apoptosis in human colorectal cell lines and human colorectal adenomas // Clin. Cancer Res. V.12. P. 4350-4356.
5. Holoch P.A., Griffin T.S. 2009. TNF - related apoptosis-inducing ligand (Trail): A new path to anti-cancer therapies // Eur. J. Pharmacol. V. 625 (1-3). P. 63-72.
6. Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A. 2004. Neutrophil-derived TNF - related apoptosis-inducing ligand (Trail): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils // Cancer Research. V. 64. P. 1037-1043.
7. Macher-Goeppinger S., Aulmann S., Tagscherer R.E. 2009. Prognostic value of tumor necrosis factor - related apoptosis-inducing ligand (Trail) and Trail receptors in renal cell cancer // Clin. Cancer Res. V.15. P. 650-659.
8. Mclornan D.P., Barret H.L., Cummins P. 2010. Prognostic significance of Trail signaling molecules in Stage II and III colorectal cancer // Clin. Cancer Res. V.16. P. 3442-3451.
9. Stadel D., Mohr A., Ref C. 2010. Trail-induced apoptosis in preferentially mediated via Trail receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors // Clin. Cancer Res. V.16. P. 5734-5749.
10. Zhang Y., Zhang B. 2008. Trail Resistance of Breast cancer cells is associated with constitutive of death receptors 4 and 5 // Mol. Cancer Res. V.6. P. 1861-1871.