

На правах рукописи

КОНОНЕНКО Владимир Иванович

**ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ РАННЕГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ
ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
ПОЛОСТИ РТА**

14.01.14 – стоматология

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Волгоград-2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – д.м.н., профессор Шлык Сергей Владимирович)

Научные консультанты: Член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор **Кит Олег Иванович**;
доктор медицинских наук, доцент
Максюков Станислав Юрьевич

Официальные оппоненты:

Азизян Рубен Ильич - доктор медицинских наук, профессор, заведующий хирургическим отделением № 4 опухолей головы и шеи ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Слетов Александр Анатольевич - доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Семин Дмитрий Юрьевич - доктор медицинских наук, хирург-онколог отделения радиохирургического лечения закрытыми радионуклидами Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба - филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.008.03 по присуждению ученой степени (доктора) кандидата медицинских наук при Волгоградском государственном медицинском университете по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1) и на сайте www.volgmed.ru.

Автореферат разослан « ____ .» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Вейсгейм Людмила Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время рак слизистой оболочки полости рта (СОПР) занимает 11-е место среди всех онкологических заболеваний в мире (Сувырина М.Б. с соавт., 2016), а в Российской Федерации среди мужчин - 7-е место (среди женщин встречается в 5-7 раз реже) (Юркевич Н.В., 2015). Распространенность злокачественных новообразований полости рта в Российской Федерации в 2014 г. составила 25,3 на 100 тыс. населения (Каприн А.Д. с соавт., 2015, 2016). В 2014 г. в Российской Федерации на I - II стадиях заболевания были диагностированы 36,1% злокачественных новообразований полости рта; на III стадии - 32,4% (Каприн А.Д. с соавт., 2015, 2016). Удельный вес больных со злокачественными новообразованиями полости рта с запущенным опухолевым процессом (IV стадия) в 2014 г. составил 29,6 % (Каприн А.Д. с соавт., 2015). Рак СОПР на III-IV стадии сопровождается низким уровнем пятилетней выживаемости (Сувырина М.Б. с соавт., 2015; Сао Н. et al., 2016), составляющей 48,3% (Чиссов В.И. с соавт., 2012). Между тем, выявление заболевания на I-II стадии увеличивает уровень пятилетней выживаемости до 80% (Гельфанд И.М. с соавт., 2016).

Рак СОПР характеризуется долгим бессимптомным течением, поздним обращением в специализированные учреждения, ранним возникновением метастазов в региональные лимфатические узлы и высокой смертностью уже на первом году после постановки диагноза (Пачес А.И., 2000; Чойнзонов Е.Л. и др., 2003). Несмотря на кажущуюся простоту клинической визуализации изменений СОПР, ранняя диагностика рака СОПР затруднительна, поскольку клинические признаки появляются позднее реально возникшей злокачественной трансформации (Guerra E.N. et al., 2016). За последние годы в нашей стране существенно улучшилась оснащенность медицинских учреждений высокоэффективным диагностическим оборудованием, появились новые диагностические методики. Однако, несмотря на рост диагностических возможностей, удельный вес активно выявленных больных раком СОПР на стоматологических осмотрах небольшой, частота диагностических ошибок в отношении дифференцировки предраковых и ранних проявлений злокачественных заболеваний полости рта составляет 58,4-70% (Скородумова Л.О. с соавт., 2012). Удельный вес больных со злокачественными новообразованиями полости рта, выявленных активно, в 2014 г. составил 14,0% от общего числа больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования данной локализации (Каприн А.Д. с соавт., 2015, 2016).

Применяемые в настоящее время диагностические методы достаточно субъективны, так как носят лишь описательный характер качественных изменений в пораженных тканях (Ahn M.J. et al., 2016; Javaid M.A. et al., 2016). Около 25% пациентов имеют скрытые метастазы в лимфатические узлы, которые не проявляются клинически (Kleiner D.E., 2009; Irani S., 2016), поэтому на ран-

них стадиях опухолевого процесса многие клиничко-морфологические прогностические факторы порой малоинформативны.

Агрессивное химиолучевое лечение больных раком СОПР сказывается на иммунном статусе организма и проблеме развития гнойных осложнений в послеоперационный период, что обуславливает необходимость проведения специальных осмотров ротовой полости с профилактическими и лечебными мероприятиями, изучать и совершенствовать методы прогнозирования и лечения гнойных осложнений (Vajaria V.N. et al., 2016; Shridhar K. et al., 2016). Для решения подобных практических задач возникает потребность в дополнительных молекулярных прогностических маркерах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и определять объективный прогноз развития заболевания (Игнатова А.В., 2014 с соавт.; Parkinson E.K. et al., 2016).

Среди потенциальных маркеров онкогенеза в настоящее время выделяют семейство ядерных транскрипционных факторов каппа-В (NF-κB) ответственных за регуляцию свыше 150 генов-мишеней (Sahin K. et al., 2016). В большинстве опухолевых клеток NF-κB постоянно активирован и находится в ядре в отличие от нормальных клеток, где он находится в цитоплазме в неактивном состоянии (Miyayama W. et al., 2016). Активация этого фактора не только защищает клетки от апоптоза, но также увеличивает их пролиферативную активность, инвазивный, метастатический и ангиогенный потенциал (Yang N. et al., 2016). Регуляция NF-κB сигнального пути нарушена во многих опухолях человека, в том числе и при раке СОПР (Спирина Л.В. и соавт., 2010). Содержание в ткани опухоли рака СОПР NF-κB сопряжено с вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов. Кроме того, ядерные факторы транскрипции регулируют экспрессию воспалительных цитокинов, иммунорецепторов и молекул клеточной адгезии. Важность транскрипционных факторов NF-κB в процессах воспаления и механизмах развития злокачественных заболеваний делает его привлекательной мишенью для потенциальных терапевтических средств (Mc Daniel D.K. et al., 2016).

В существующих системах прогнозирования риска злокачественной трансформации, инвазии и метастазирования при раке СОПР отсутствуют сведения о диагностической значимости кислород-зависимых факторов, которые активируются при гипоксии и запускают в дальнейшем транскрипционную коактивацию в клетках (Кирова Ю.И. 2012). Гипоксия ограничивает рост опухоли, при этом, через стимуляцию факторов ангиогенеза ведет к росту новых сосудов и к метастазированию опухолевых клеток (Новиков В.Е. с соавт., 2015). Кроме того, гипоксия может стимулировать транскрипционные факторы, а следовательно способствовать быстрому делению клеток, включая опухолевые, и наоборот, транскрипционные факторы через активацию кислородчувствительного протеина могут стимулировать развитие гипоксии (Лукиянова Л.Д., 2011).

Таким образом, разработка объективного метода определения злокачественного потенциала рака СОПР и риска развития гнойных осложнений после комплексного лечения заболевания с помощью молекулярных, иммунологических и иммуногистохимических маркеров является актуальной. Исследований

с таким дизайном проведено крайне мало, что не позволяет решить поставленную проблему на современном этапе.

Степень разработанности темы

В настоящее время известно, что самым мощным кислородчувствительным протеиновым комплексом, обладающим транскрипционной активностью является гипоксия-индуцибельный фактор (hypoxia-inducible factor — HIF) (Шабанов П.Д. с соавт., 2010; Новиков В.Е. с соавт., 2013; de Lima P., et al. 2014). Он активируется в физиологически важных местах регуляции кислородных путей внутри клетки, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, включая гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз (Левина А.А., 2009; Perez-Sayans M. et al., 2011; Kang F.W. et al., 2013). В тканях с низким парциальным напряжением кислорода в цитоплазме клеток повышается содержание HIF-1 α , что способствует перемещению HIF1 α к ядру, где он активирует несколько генов-мишеней (Lukyanova L.D. et al., 2013). Известно, что HIF-1 α является активатором экспрессии p53 (Sendoel A. et al., 2010). Однако, в исследованиях показано влияние ядерного транскрипционного фактора карра В (NF-kB) на экспрессию HIF-1 α и его активацию даже в условиях нормоксии (Портниченко В.И. и др., 2012; Van Uden P. et al., 2008).

Рак СОПР относится к опухолям, сопровождающимся обширными зонами некроза, в которых имеет место высокая кислотность и выраженный уровень гипоксии (De Lima P.O. et al., 2014). Гипоксия изменяет потенциал факторов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток (Новиков В.Е. с соавт., 2015). Существуют противоречивые данные о возможности использования HIF-1 α в качестве прогностического критерия для оценки риска прогрессии рака СОПР (Fillies T. et al., 2005; Liang X.H. et al., 2011; Santos M. et al., 2012). Большинство авторов склоняются, что повышенный уровень HIF-1 α в тканях опухоли по сравнению с окружающими нормальными тканями коррелирует со степенью распространенности рака СОПР и смертностью (Lin P.Y. et al., 2008; De Lima P.O. et al., 2014). Полученные факты позволяют предположить, что HIF-1 α представляет собой патогенетически значимый фактор в развитии рака СОПР, что определяет перспективность изучения путей модуляции его активности в опухолевых клетках.

HIF-1 α влияет на выживание клеток путем изменения местных механизмов врожденного иммунитета, что может сказаться на сроках послеоперационного заживления раны и на последствиях химиолучевого воздействия (Freeman R.S. et al., 2005; Myllyharju J. et al., 2013). Повышенная активность HIF-1 α способствует синтезу защитных факторов биологических жидкостей и увеличивает их бактерицидную активность, обеспечивает усиление реакций врожденного иммунитета на микробную, в том числе бактериальную, инфекцию (Semenza G.L. et al., 2007). Однако, сопряжение «гипоксия-индуцибельный фактор - опухолевая прогрессия - местный иммунный статус» при раке СОПР не изучено ни

в одном из современных научных исследований. Неизученной остается также взаимосвязь между прогрессированием рака СОПР, гнойными осложнениями специфического комбинированного лечения и исходными особенностями микробной флоры зубного налета.

Определение иммуногистохимических маркеров является одним из способов количественной оценки пролиферации и апоптоза клеток, а также изменений, идентифицирующих активацию онкогенов или генов-супрессоров (Кутукова С.И. с соавт., 2014). Среди множества прогностических признаков прогрессии рака СОПР, таких как bcl-2, HER2/neu, p53 (Леонтьева Е.С. с соавт., 2013; Кочурова Е.В. с соавт., 2015), на сегодняшний день не выявлены маркеры для оценки риска злокачественной трансформации клеток СОПР с высокой диагностической значимостью, что явилось основанием для проведения настоящей работы.

Цель и задачи исследования

Цель работы: Улучшить результаты лечения больных раком слизистой оболочки полости рта путем разработки способов прогноза раннего прогрессирования заболевания на основе изучения молекулярно-биологических изменений опухолевой ткани, ротовой жидкости и микробиологических исследований зубного налета с выявлением патогенетических взаимосвязей развития гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования рака слизистой оболочки полости рта.

Задачи исследования

1. Изучить особенности клинического течения рака слизистой оболочки полости рта при развитии гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.
2. Исследовать особенности экспрессии транскрипционных факторов, факторов неоангиогенеза и апоптоза в ткани опухоли, ротовой жидкости при развитии гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта.
3. Дать оценку значимости исходных особенностей масс-спектров белков, антимикробного и цитокинового профиля ротовой жидкости, параметров облигатно-анаэробных видов бактерий в зубном налете у больных раком слизистой оболочки рта для развития гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.
4. Изучить патогенетические взаимосвязи между опухолевой экспрессией гипоксия-индуцибельного фактора-1 α , его стабилизацией в цитоплазме опухолевых клеток и экспрессией факторов транскрипции, неоангиогенеза и апоптоза в опухоли, концентрацией антимикробного пептида лактоферрина в ротовой жидкости больных раком слизистой оболочки полости рта.
5. У больных раком слизистой оболочки полости рта определить зави-

симось общей выживаемости больных, частоты гнойных осложнений, прогрессирования заболевания от выраженности экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в ткани опухоли.

6. Выявить оптимальное сочетание исходных диагностических исследований для разделения больных раком СОПР на группы риска по развитию гнойных осложнений, стратификации пациентов по степени риска рецидивирования рака СОПР и метастазирования в регионарные лимфатические узлы.

7. Разработать новые патогенетически обоснованные подходы к противоопухолевой терапии рака СОПР, связанные с профилактикой и коррекцией гнойных осложнений путем применения препарата на основе активации врожденных антимикробных механизмов и стабилизации транскрипционной активности гипоксия-индуцибельного фактора-1 α .

Научная новизна исследования

Вследствие проведенного научного исследования впервые:

1. Изучена экспрессия факторов транскрипции HIF-1 α , NF-kB, маркера апоптоза bax в опухолевой ткани в сравнительном аспекте с гистологически неизменной тканью и тканью, граничащей с опухолью, у больных раком СОПР.

2. Определена связь между содержанием в ротовой жидкости ИЛ-8 и лактоферрина, выраженности экспрессии транскрипционных факторов HIF-1 α и NF-kB в ткани опухоли больных раком СОПР с развитием гнойных осложнений комбинированного лечения.

3. В ходе протеомного анализа ротовой жидкости у больных раком СОПР выделен комплекс белков молекулярного профиля слюны, включая гипоксия-индуцибельный фактор-1 α , лактоферрин, с высокой прогностической значимостью для развития гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.

4. Осуществлена оценка связи исходных качественно-количественных характеристик облигатных анаэробов в зубном налете с развитием последующих гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком СОПР.

5. Оценена роль выраженности опухолевой экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α на клиническое течение рака СОПР, транскрипционную и апоптическую активность опухолевых клеток, неоангиогенез.

6. Предложен новый алгоритм лабораторной, морфологической и иммуногистохимической диагностики для прогноза течения рака СОПР с учетом развития гнойных осложнений после комбинированного лечения.

7. У больных раком СОПР разработаны способы терапевтического воздействия, основанные на профилактике и коррекции гнойных осложнений комбинированного лечения путем стабилизации транскрипционной активности HIF-1 α с ограничением транслокации фактора в ядро.

Теоретическая и практическая значимость исследования

- У больных раком СОПР установлен факт прямой зависимости пролиферативного потенциала опухолевых клеток, активности неоангиогенеза, апоптоза, прогрессии опухоли от активности гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в клетках опухоли, что патогенетически обосновывает необходимость лечебного воздействия на стабилизацию гипоксия-зависимого фактора транскрипции.
- Впервые выявлена взаимосвязь экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в клетках опухоли у больных раком СОПР и клинической характеристики заболевания, усиливающаяся с повышением размеров опухоли, стадии заболевания, наличием регионарных метастазов в лимфатические узлы, отдаленных метастазов, гнойных осложнений комбинированного лечения, снижением гистопатологической дифференцировки опухоли, что определяет прогностическую значимость выраженности экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α как фактора прогрессии опухоли.
- Определена прямая связь активации врожденных иммунных механизмов и провоспалительных факторов ротовой жидкости с экспрессией гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в клетках опухоли, что лежит в основе патогенетических механизмов сопряжения развития гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессии опухоли.
- У больных раком СОПР в ходе протеомного анализа ротовой жидкости определены белки молекулярного профиля слюны (гипоксия индуцибельный фактор-1 α , лактоферрин), ассоциированные с развитием гнойных осложнений после комбинированного лечения, что расширяет возможности скрининговой диагностической значимости протеомики слюны.
- Разработаны лечебные способы стабилизации гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в клетках опухоли путем системного и местного применения препарата на основе лактоферрина, что позволяет прогнозировать и предупредить гнойные осложнения комбинированного лечения и снизить способность опухоли к раннему рецидивированию и метастазированию.
- Патогенетически обосновано применение оптимальных сочетаний диагностических тестов для раннего прогнозирования рецидивов и метастазов рака СОПР, гнойных осложнений после комбинированного специализированного лечения.
- Внедрение алгоритма определения риска гнойных осложнений оперативного лечения рака СОПР позволит своевременно определить объем лечебных мероприятий для их профилактики.
- Разработанный алгоритм оценки факторов транскрипции, апоптоза, неоангиогенеза в операционном материале, показателей врожденного иммунитета в ротовой жидкости способствует повышению эффективности раннего прогнозирования рецидивов и метастазов рака СОПР за счет определения наиболее успешных комбинаций тестов.
- Успешная комбинация иммуногистохимических и иммунологических тестов как система контроля риска гнойных осложнений, а также прогрессирующая

ния опухоли обеспечивает своевременность и эффективность профилактических мероприятий.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в соответствии с методологическими принципами доказательной медицины и проведения сравнительного анализа скрининговых, диагностических, прогностических тестов, клинической эффективности терапевтических мероприятий в группах больных по типу «случай-контроль», оценки достоверности относительных величин риска, чувствительности, специфичности.

При проведении исследования были использованы клинические методы (жалобы, анамнез, осмотр, пальпация, общий и биохимический анализы крови, МРТ), морфологические (световая микроскопия, иммуногистохимическое исследование образцов тканей, полученных при биопсии и операции), масс-спектрометрия MALDI-ToF белков ротовой жидкости, метод ПЦР в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, современные статистические способы обработки полученных результатов.

Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Низкая стабилизация гипоксия-индуцибельного фактора-1 α , зависящая от концентрации лактоферрина в ротовой жидкости, транслокация HIF-1 α в ядро из цитоплазмы с последующей активацией транскрипционных ядерных факторов каппа-B, стимуляцией ангиогенеза за счет усиленной экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в опухоли являются патогенетической основой высокого риска прогрессирования рака СОПР.

2. У больных раком СОПР высокий риск развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения патогенетически обусловлен снижением содержания антимикробных белков в ротовой жидкости, повышением титра патогенной микробиоты ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF-A, регулирующего проницаемость сосудов.

3. С проспективной прогрессией злокачественного заболевания у больных раком СОПР сопряжено развитие гнойных осложнений при комплексном лечении, что определяет необходимость активной профилактики осложненного течения комбинированного противоопухолевого лечения, эффективных лечебных мер по купированию гнойно-некротических последствий хирургического вмешательства.

4. У больных раком СОПР с высоким риском гнойных осложнений системное и местное использование препарата на основе антимикробного белка лактоферрина в послеоперационный период позволило профилактировать осложненное течение после операции, снизить пролиферативный и метастатический потенциал клеток опухоли за счет стабилизации гипоксия-

индуцибельного фактора-1 α в цитоплазме.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность проведенного исследования определялась формированием клинического исследования на достаточном количестве пациентов в группах (n=162), наличием групп сравнения, использованием современных методов диагностики и лечения больных, обработкой полученных результатов современными методами статистического анализа.

Результаты проведенной научной работы доложены и обсуждены на межкафедральном заседании федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на Международной научной конференции «Инновационные медицинские технологии» (Сочи, 8-11 октября 2015), Международном конгрессе «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» (Москва, 17-19 ноября 2015), XVII Ежегодном научном форуме «Стоматология 2015», «Новое в стоматологии» (г. Москва, 7 декабря 2015 г.), Ежегодном совещании Американского общества клинической онкологии 16ASCO (Чикаго, 3-7 июня, 2016), IX съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 15-17 июня 2016), II Петербургском форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 22-24 июня, 2016), III Петербургском форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 23-25 июня, 2017).

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты исследования внедрены в клиничко-диагностическую практику лечебных учреждений: отделение опухолей головы и шеи ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, отделения челюстно-лицевой хирургии МБУЗ «Городская больница №20 г. Ростова-на-Дону», ГАУ РО «Стоматологическая поликлиника», стоматологическая поликлиника федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертации внедрены в учебный процесс кафедры онкологии, кафедры стоматологии №3 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 34 научных работ в отечественной и зарубежной печати, в том числе 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ для публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Личный вклад автора в исследование

Автором проведен аналитический обзор источников отечественной и зарубежной литературы, лично разработаны и апробированы методологические и методические основы данного научного исследования. Автор принимал непосредственное участие в клинических исследованиях и лечении больных. Диссертант самостоятельно разработал основные идеи и алгоритм обработки полученных результатов проведенных исследований, проводил их анализ, обобщения и подготовку публикаций. На основании полученных результатов исследования сделаны обоснованные выводы и предложены практические рекомендации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 241 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, четырех результативных глав, заключения, выводов и научно-практических рекомендаций, библиографии, включающей 71 источник на русском и 142 на иностранных языках, всего 213 источников. Работа содержит 47 рисунков и 99 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническую группу составили 162 больных: 141 больной с первичным резектабельным раком СОПР $T_{1-3}N_{0-2}M_0$ и 21 пациент с раком СОПР $T_4N_{1-2}M_{0-1}$. У всех пациентов, включенных в работу, диагноз плоскоклеточного рака СОПР был подтвержден при гистологическом исследовании биопсийного материала. Все пациенты до момента включения в исследование не подвергались специализированному лечению. В зависимости от наличия или отсутствия гнойных осложнений пациенты из клинической группы с раком СОПР $T_{1-3}N_{0-2}M_0$ на фоне стандартного комбинированного лечения, включая хирургическое, были разделены на две группы: основная и группа сравнения. Основную группу ($n=96$) составили больные, у которых после комбинированного лечения развились гнойно-деструктивные осложнения (местные раневые осложнения, некроз мышечного или кожно-жирового лоскута, используемого для пластики, остеомиелит нижней челюсти, флегмона нижней челюсти). У больных группы сравнения ($n=45$) после лечения гнойные осложнения отсутствовали. Пациенты с терминальной стадией и распространенным онкологическим процессом ($T_4N_{1-2}M_{0-1}$) в основную группу и группу сравнения не входили, поскольку имели кардинальные отличия прогрессирования основного заболевания, выживаемости пациентов.

Группу здоровых доноров составили 35 пациентов стоматологических отделений общего профиля, обратившихся по поводу установки зубных имплантатов.

Логическая структура выделения групп пациентов, входящих в исследование, отражена в таблице 1.

Таблица 1

Структура выделения клинических групп пациентов, входящих в исследование

Тип исследования	Группы	Содержание исследования
Одномоментное исследование	<p>Клиническая группа $T_{1-4} N_{0-2} M_{0-1}$ (n=162)</p>	Исходная характеристика экспрессии факторов транскрипции, неоангиогенеза, апоптоза в различных биологических средах, микробиоты и показателей врожденного иммунитета ротовой полости в зависимости от pTNM
Ретроспективное исследование	<p>Основная группа $T_{1-3} N_{0-2} M_0$ (n=96): гнойные осложнения комбинированного лечения присутствуют</p> <p>Группа сравнения $T_{1-3} N_{0-2} M_0$ (n=45): гнойные осложнения отсутствуют</p>	Выявление патогенетических механизмов связи гнойно-деструктивных осложнений комбинированного лечения рака СОПР и прогрессии заболевания. Разработка методов прогноза течения заболевания и лечения гнойных осложнений
Проспективное исследование	<p>Проспективная группа $T_{2-3} N_{0-1} M_0$ (n=50)</p>	Оценка эффективности разработанной нами системы прогноза прогрессирования заболевания. Оценка эффективности оптимизации лечения.

В клинической группе была определена частота и структура гнойных осложнений в зависимости от стадии рака СОПР по TNM и их связь с прогрессированием основного заболевания (сроками и частотой возникновения рецидивов и метастазов) в течение двух лет от начала комбинированного первичного специализированного лечения.

Для выявления патогенетических взаимосвязей между развитием гнойных осложнений и прогрессией рака СОПР и определения новых мишеней для разработки методов эффективного противоопухолевого воздействия в ткани опухоли больных раком СОПР, биоптатах гистологически-неизменной СОПР определяли содержание гипоксия-индуцибельного фактора-1 α , его экс-

прессию и тип окрашивания (цитоплазматический, ядерно- цитоплазматический), активность апоптоза по экспрессии маркеров Вах, пролиферативную активность клеток опухоли по содержанию и экспрессии ядерных транскрипционных факторов NF- κ B p50 и NF- κ B p65, уровень васкулоэндотелиального фактора роста А (VEGF-A) как маркера активности неоангиогенеза; *в ротовой жидкости* больных раком СОПР до операции - содержание антимикробного белка лактоферрина, провоспалительного медиатора интерлейкина-8, факторов ИИФ-1 α и VEGF-A, масс-спектров белков слюны с их идентификацией; *в зубном налете* у пациентов с раком СОПР до операции - качественно-количественные параметры содержания 7 микроорганизмов: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis*, а также качественный анализ масс-спектров зубного налета с идентификацией микроорганизмов.

Обобщение и анализ результатов исследования позволили установить патогенетические взаимосвязи между развитием гнойных осложнений и прогрессией рака СОПР и разработать метод эффективного противоопухолевого воздействия с профилактикой гнойных осложнений.

Критерии включения пациентов в клиническую группу:

- плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта,
- отсутствие ранее проводимого специализированного лечения до включения пациентов в исследование,
- наличие хирургического вмешательства в составе комбинированного онкологического лечения,
- возраст больных до 75 лет включительно.

Критерии исключения больных:

- наличие тяжелой сопутствующей патологии с декомпенсацией дыхательной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной системы,
- наличие злокачественных заболеваний иной локализации,
- больные старше 75 лет.

Для оценки эффективности разработанной нами системы прогноза прогрессирования заболевания, а также анализа эффективности оптимизации лечения была сформирована проспективная группа больных раком СОПР со стадией T₂₋₃N₀₋₁M₀ (n=50).

Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Возраст пациентов с раком СОПР, включенных в исследование, колебался от 28 до 73 лет. В основной группе средний возраст соответствовал – 56,2 \pm 2,5 года, группе сравнения – 55,7 \pm 3,1 лет, клинической группе – 58,9 \pm 2,1 лет, проспективной группе - 57,1 \pm 2,3 лет и среди здоровых доноров 55,5 \pm 2,3 лет. Межгрупповые различия по возрасту отсутствовали (p>0,05). Во всех изучаемых группах число мужчин превышало число женщин. Процентное соотношение между мужчинами и женщинами в основной группе составило 69,8% и

30,2%, в группе сравнения 57,8% и 42,2%, клинической группе 66,0% и 34,0%, проспективной группе 76% и 24%, среди здоровых доноров 60,0% и 40,0%.

Распределение больных клинических групп в зависимости от локализации рака СОПР представлено в таблице 2. Различия по локализации рака СОПР у больных основной группы и группы сравнения отсутствовали ($p > 0,05$).

Таблица 2

Распределение больных клинических групп в зависимости от локализации рака СОПР

Локализация	Основная группа		Группа сравнения		Клиническая группа		p
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Корень языка	3	3,1	1	2,2	5	3,1	>0,05
Подвижная часть языка	21	21,9	10	22,2	32	19,8	>0,05
Дно ротовой полости	49	51,0	23	51,1	83	51,2	>0,05
Щека	5	5,2	2	4,4	8	4,9	>0,05
Альвеолярный отросток нижней челюсти	12	12,5	7	15,6	25	15,4	>0,05
Альвеолярный отросток верхней челюсти	5	5,2	2	4,4	8	4,9	>0,05
Небные дужки	1	1,0	-	-	1	0,6	>0,05
Всего	96	100,0	45	100,0	162	100,0	

Примечание: доверительную вероятность p оценивали с помощью критерия Пирсона

Распределение больных изучаемых групп в зависимости от классификации рака СОПР по TNM представлено в таблице 3. Чаще всего встречались больные с распространенностью опухолевого процесса $T_2N_0M_0$ и $T_3N_1M_0$.

В исследуемых группах у больных раком СОПР умеренная степень дифференцировки преобладала по частоте (табл. 4).

Все пациенты основной и контрольной групп получали комбинированное лечение, включающее хирургическое удаление первичной опухоли. Схема организации комбинированного лечения проводилась с учетом стадии заболевания и стандартам лечения: I-II стадия рака СОПР – дистанционная лучевая терапия + хирургическое лечение; III стадия – химиолучевая терапия + хирургическое лечение; IV стадия – полихимиотерапия + дистанционная лучевая терапия + хирургическое лечение + полихимиотерапия.

Полихимиотерапию проводили цисплатином и 5-фторурацилом двумя курсами.

Дистанционную гамма-терапию осуществляли по методу расщепленного курса лучевой терапии в режиме традиционного фракционирования дозы.

Таблица 3

Распределение больных клинических групп в зависимости от классификации рака СОПР по TNM

Класс по TNM	Основная группа		Группа сравнения		Клиническая группа		Проспективная группа	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
T ₁ N ₀ M ₀	11	11,5	6	13,3	17	10,5	-	-
T ₂ N ₀ M ₀	24	25,0	11	24,4	35	21,6	9	18,0
T ₂ N ₁ M ₀	9	9,4	5	11,1	14	8,6	17	34,0
T ₂ N _{2a} M ₀	4	4,2	2	4,4	6	3,7	-	-
T ₃ N ₀ M ₀	13	15,5	6	13,3	19	11,7	10	20,0
T ₃ N ₁ M ₀	25	26,0	9	20,0	34	21,0	14	28,0
T ₃ N _{2a} M ₀	10	10,4	6	13,3	16	9,9	-	-
T ₄ N ₁ M ₀	-	-	-	-	9	5,6	-	-
T ₄ N _{2b} M ₁	-	-	-	-	7	4,3	-	-
T ₄ N _{2c} M ₁	-	-	-	-	5	3,1	-	-
Всего	96	100,0	45	100,0	162	100,0	50	100,0

Таблица 4

Распределение больных основной группы и группы сравнения в зависимости от степени дифференцировки рака СОПР

Степень дифференцировки	Основная группа		Группа сравнения		Клиническая группа		Проспективная группа	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Низкая (G3)	7	7,3	3	6,7	19	11,7	2	4,0
Умеренная (G2)	58	60,4	26	57,8	96	59,3	32	64,0
Высокая (G1)	31	32,3	16	35,6	47	29,0	16	32,0
Всего	96	100,0	45	100,0	162	100,0	50	100,0

При хирургическом лечении проводились типичные операции на первичном опухолевом очаге с радикальным иссечением клетчатки шеи: одномоментное одностороннее или двустороннее удаление лимфатических узлов регионарного лимфатического коллектора шеи, части языка, ткани дна полости рта, а также расширенно-комбинированные операции. Объем фасциально-футлярного иссечения шейной клетчатки соответствовал уровню регионарных метастазов. Пластику послеоперационного дефекта осуществляли носо-губным, подчелюстным лоскутом, кожно-жировым щечным лоскутом, лоскутом на передних мышцах шеи, с включением грудино-ключично-сосцевидной мышцы, большой грудной мышцы. Частота операций с различными видами пластики в основной группе и группе сравнения не различалась.

Пациенты основной группы и группы сравнения были сопоставимы по возрасту, полу, стадии и распространенности опухолевого процесса, факторам

риска, схеме лечения, объему оперативных вмешательств и послеоперационному ведению.

В проспективной группе больных (n=50) при высоком риске развития гнойных послеоперационных осложнений, определенном по разработанному нами алгоритму, 17 пациентам в послеоперационный период был дополнительно назначен препарат на основе лактоферрина (Лапрот). Препарат вводили в 1-е сутки после операции в разовой дозе 50 мг (суточная доза 50-100 мг) внутривенно, капельно со скоростью 3 мл/мин. Кратность введения и курсовые дозы - 7 инфузий (350-700 мг). Кроме того, наряду с внутривенными инфузиями препарат Лапрот применяли местно в виде 0,1-0,05% раствора для промывания и орошения ран. Медицинская технология «Препарат Лапрот в терапии гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений» разработана в ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена» (Патент 2165769 от 13.07.2000) (Чиссов В.И. с соавт., 2001) и разрешена к применению Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (разрешение на применение № ФС-2007/249 от 29.12.2007), доказаны безопасность и нетоксичность препарата. Остальные больные проспективной группы с высоким риском развития гнойных послеоперационных осложнений (n=16) получали стандартную терапию без оптимизации.

Методы исследования больных включали стандартные общеклинические обследования. Дополнительные научные методы исследования, используемые в работе, базировались на исследовании ротовой жидкости, зубного налета, биоптатов ткани.

Зубной налет снимали универсальным зондом. Кончик зонда с забранным материалом помещали в пробирку «ДНК-ЭКСПРЕСС». Далее методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли качественно-количественное определение микробов с помощью панели «Дентоскрин» (ООО НПФ «Литех» Россия) и амплификатора CFX 96 (БиоРад, США).

При подготовке пробы к масс-спектрометрическому исследованию зубной налет также собирали зондом и помещали в специальный флакон. Далее методом масс-спектрометрии MALDI-ToF-MS проводили качественное определение микробов в зубном налете. Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью базы данных Biotyper 3 (Bruker, Германия).

Ротовую жидкость собирали утром с 8 до 9 утра после 15-минутного отдыха. Чистку зубов осуществляли накануне вечером. Утром пациенты не принимали пищу и не пили воду. Ротовую жидкость в течение 5 мин собирали в бумажный стаканчик путем спонтанного стекания с языка, без сплевывания. Во время сбора смешанной слюны пациенты молчали. Далее из стаканчика для масс-спектрометрического исследования забирали 6 мл ротовой жидкости и помещали в центрифужную трубку. Автоматизированный анализ MALDI-TOF-MS с идентификацией специфических белков ротовой жидкости пациентов проводили с помощью полной интегрированной системы компьютерных программ, включающих flexControl/BioTools 2.1.™/ MASCOT™ (Bruker Daltonics, США).

Кроме того, в ротовой жидкости иммуноферментным методом определяли содержание VEGF-A, HIF-1 α , интерлейкина-8, лактоферрина.

Содержание VEGF-A в ротовой жидкости определяли двухэтапным иммуноферментным методом с помощью тест-систем на основе поликлональных антител к VEGF-A и конъюгатов этих антител с пероксидазой хрена с последующим измерением на фотометре «Multiscan-P 2» (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия) при длине волны 492 нм. Содержание HIF-1 α в ротовой жидкости определяли методом ИФА аналогично предыдущему способу с помощью тест-систем ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 α) (Cloud-Clone Corp.) при длине волны на фотометре 450 нм. Количественное определение интерлейкина-8 и лактоферрина в ротовой жидкости проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов «Интерлейкин-8» (ООО «Цитокин» Россия), «Лактоферрин-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест» Россия) с учетом инструкции.

Были изучены ткани опухоли, взятые во время оперативного вмешательства, которые подвергали дальнейшему замораживанию при температуре -80°C. В супернатанте опухоли больных раком СОПР (10% цитозольных фракциях, приготовленных на 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащим 0,1% Твин-20 и 1% БСА) методом ИФА содержание HIF-1 α определяли с помощью тест-систем ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 α) (Cloud-Clone Corp.), ядерных факторов транскрипции семейства каппа-B (NF-kBp50 и NF-kBp65) путем применения тест-систем Caymanchem (США) и ростового фактора Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) при использовании тест-системы Human VEGF ELISA Kit (BioVision, Incorp.).

Образцы опухолевой ткани для иммуногистохимического исследования (ИГХ) готовили по стандартной методике. Для выявления белка HIF-1 α был применен иммунопероксидазный метод (EnVision/HRP, «Dako Cytomation», Denmark), а для оценки экспрессии HIF-1 α количество позитивных клеток подсчитывали на 1000 клеток. Опухоль считали отрицательной по маркеру, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реакция с антителами или количество окрашенных клеток было менее 10%. Реакция окрашивания оценивалась в 1 балл (слабо выраженная экспрессия), если число клеток было 10-25%, 2 балла (умеренно выраженная экспрессия) – при окрашивании 25-50%, 3 балла (сильно выраженная экспрессия) – более 50%.

При оценке экспрессии маркера апоптоза bax путем ИГХ исследования использовали кроличьи поликлональные антитела к bax (разведение 1:500, «DAKO Corp.»). Для оценки экспрессии маркера применяли следующие критерии: опухоль считали негативной по bax, если в её ткани отсутствовала цитоплазматическая реактивность с антителами или количество окрашенных клеток было <25% и позитивной по bax, если имелась цитоплазматическая реактивность с антителами > 25% клеток опухоли.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). При этом использовали модули расчета объема выборки, частотного анализа с определением отличий от

нормальности распределения по критерию Шапиро-Уилка, описательной статистики, оценивали различие средних величин количественных параметров по параметрическим и непараметрическим критериям согласно распределению путем попарного сравнения и с помощью дисперсионного анализа, различие долей с применением критерия χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность Мантеля-Хэнзеля, применяли корреляционно-регрессионный метод, ROC-анализ, метод построения таблиц сопряженности с расчетом относительных параметров ассоциации признаков.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первые 12 месяцев после окончания комбинированного первичного лечения, включая хирургический этап, у 96 (68%) больных раком СОПР со стадией T₁₋₃N₀₋₂M₀ наблюдали гнойные осложнения, куда были объединены местные раневые осложнения (n=68, 48,2%), в том числе некроз кожно-мышечного лоскута (n=31, 22%), некроз кожно-жирового лоскута (n=29, 20,6%), абсцессы и флегмона ЧЛЮ (n=8, 5,7%), а также остеомиелит нижней челюсти (n=28, 19,9%). Больные, у которых развивались гнойные осложнения первичного комбинированного лечения, составили основную группу (n=96). У больных группы сравнения (n=45) после химиолучевого и хирургического лечения гнойных осложнений не было.

Сравнительный анализ частоты прогрессирования рака СОПР у больных двух групп представлен в таблице 5.

Таблица 5

Частота прогрессирования основного заболевания в течение двух лет у больных основной группы и группы сравнения

Тип прогрессирования	Основная группа, n=96		Группа сравнения, n=45		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Продолженный рост опухоли	25	26,0	4	8,9	0,03
Рецидив опухоли	21	21,9	2	4,4	0,009
Метастазы в региональные лимфоузлы	32	33,3	7	15,6	0,028
Отдаленные метастазы	1	1,0	1	2,2	0,58
Всего с прогрессией	39	40,6	4	8,9	0,0001

Частота прогрессирования опухолевого заболевания была выше ($p < 0,05$) в основной группе в отличие от группы сравнения. Общее число случаев прогрессирования заболевания в основной группе больных раком СОПР было 40,6%, в группе сравнения 8,9%. Сопряжение прогрессирования заболевания и гнойных осложнений у больных раком СОПР было статистически значимым, о чем свидетельствовали высокие значения эмпирического критерия Пирсона ($\chi^2 = 13,1$) и соответствующая доверительная вероятность $p = 0,0003$ (табл. 6).

Таблица 6

Сопряжение прогрессирования заболевания и гнойных осложнений у больных раком СОПР

Прогрессирование заболевания	Гнойные осложнения		Всего
	есть	нет	
есть	39 (40,6%)	4 (8,9%)	43
нет	57 (59,4%)	41 (91,1%)	98
итого	96 (100%)	45 (100%)	
$p (\chi^2)$	$p=0,0003 (\chi^2=13,1)$		
Коэффициент контингенции (сопряжения)	0,292		

Коэффициент контингенции (сопряжения двух признаков) имел высокое значение 0,29 ($p=0,0003$). Относительный риск прогрессирования заболевания в ближайшие два года после окончания первичного комбинированного лечения при наличии гнойных осложнений по сравнению с группой сравнения составил 1,56 ($p<0,0001$). Положительная прогностическая значимость гнойных осложнений в отношении последующей прогрессии рака СОПР была высокой – 90,7%. Таким образом, у больных раком СОПР наличие гнойных осложнений комбинированного лечения было ассоциировано с дальнейшим развитием прогрессирования заболевания.

Суммарно параметры силы сопряжения между признаками прогрессирования рака СОПР и гнойными осложнениями комбинированного лечения представлены в таблице 7.

Таблица 7

Параметры силы сопряжения между признаками прогрессирования рака СОПР и гнойными осложнениями комбинированного лечения

Признак	Коэффициент контингенции	Относительный риск	Положительная прогностическая значимость
Продолженный рост опухоли	0,176 ($p=0,033$)	1,36 ($p=0,003$)	82,21%
Рецидив опухоли	0,195 ($p=0,018$)	1,44 ($p=0,001$)	91,3%
Метастазы в региональные лимфоузлы	0,166 ($p=0,046$)	1,31 ($p=0,012$)	82,05%
Прогрессирование основного заболевания	0,292 ($p=0,0003$)	1,56 ($p<0,0001$)	90,7%

Наиболее выраженная сила сопряжения или ассоциации с развитием гнойных осложнений была установлена для общего числа наблюдений прогрессирования рака СОПР. Из составляющих случаев прогрессирования выше прогностическая значимость была выявлена для рецидивов опухоли.

По итогам изучения качественно-количественного соотношения облигатных и факультативных анаэробных грамотрицательных бактерий в зубном налете, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, было установлено достоверное различие частоты выявления трех бактерий - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*. В основной группе по сравнению с группой сравнения частота качественного выявления *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (100% против 55,6%, $p < 0,001$), *Porphyromonas gingivalis* (97,9% против 62,2%, $p < 0,001$), *Treponema denticola* (95,8% против 55,6%, $p < 0,001$) была выше.

У больных основной группы для всех изучаемых бактерий частота превышений клинически значимой концентрации превышала 80% и составила для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 97,9%, *Treponema denticola* 94,6%, *Porphyromonas gingivalis* 93,6%, *Prevotella intermedia* 90%, *Fusobacterium nucleatum* 85,4%, *Porphyromonas endodontalis* 81,6% и *Tannerella forsythensis* 81,5%. У пациентов группы сравнения частота превышений клинически значимой концентрации была ниже ($p < 0,05$), чем в предыдущей группе, и составила для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis* и *Tannerella forsythensis* 68%, 68%, 64,3%, 40,5%, 61,8%, 40,6% и 51,4%, соответственно.

На следующем этапе у больных раком СОПР были идентифицированы белки ротовой жидкости методом MALDI-ToF-MS. Молекулярная масса большинства пептидов смешанной слюны находилась в диапазоне от 1000 до 7000 Да. При комплексном анализе всех полученных масс-спектров было найдено в среднем 112 пиков белков. У больных основной группы по сравнению с группой сравнения в ротовой жидкости чаще идентифицировали изоформу 2 предшественника интер-альфа трипсिनного ингибитора тяжелой цепи H4 (81,3% против 46,7%, $p < 0,001$), белок SERPINA1(PRO2275) (85,4% против 35,6%, $p < 0,001$), интерлейкин-6 (88,5% против 53,3%, $p < 0,001$), интерлейкин-8 (90,6% против 60,0%, $p < 0,001$), интерлейкин-18 (93,8% против 55,6%, $p < 0,001$), гипоксия индуцибельный фактор-1 (96,9% против 42,2%, $p < 0,001$), трансферрин (82,3% против 33,3%, $p < 0,001$), лактоферрин (97,9% против 48,9%, $p < 0,001$).

Вероятным патогенетическим механизмом, объединяющим воспалительно-деструктивные процессы в ротовой полости и прогрессирование рака СОПР, является активация синтеза ИФ-1 α и повышение его транскрипционной активности. Распределение величин ИФ-1 α в тканевом гомогенате опухоли в зависимости от распространенности опухолевого процесса представлено в таблице 8.

Таблица 8

Распределение величин HIF-1 α в тканевом гомогенате опухоли (УЕ/ мг белка) в зависимости от стадии заболевания по классификации TNM у больных раком СОПР

TNM	n	M	s	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
T1N0M0	17	9,1	3,9	6,6	8,3	10,1
T2N0M0	35	9,6	3,9	6,9	8,4	11,8
T2N1M0	14	12,0	3,6	9,1	10,6	13,9
T2N2aM0	6	13,5	4,2	10,0	12,8	15,7
T3N0M0	19	9,4	2,7	7,1	8,4	12,3
T3N1M0	34	12,0	3,7	9,6	11,2	12,9
T3N2aM0	16	13,7	3,8	11,5	12,9	13,9
T4N1M0	9	14,2	5,4	12,3	14,5	17,8
T4N2bM1	7	15,2	1,9	13,8	15,0	15,7
T4N2cM1	5	15,6	3,1	13,0	14,9	16,8
Критерий Крускала-Уоллиса 19,2 при $p < 0,001$						

У пациентов со стадией заболевания T1N0M0, T2N0M0 и T3N0M0 достоверных различий содержания HIF-1 α в тканевом гомогенате опухоли не наблюдалось (медиана 8,3; 8,4 и 8,4 УЕ/мг белка, соответственно, $p > 0,05$). С наличием метастазирования в регионарные лимфатические узлы шеи и отдаленные регионы содержание HIF-1 α в тканевом гомогенате опухоли повышалось ($p < 0,05$). Дисперсионный анализ с применением непараметрического критерия Крускала-Уоллиса выявил достоверное множественное различие между подгруппами.

В супернатанте ткани опухоли у больных основной группы в отличие от группы сравнения содержание HIF-1 α повышалось на 38,7% ($12,9 \pm 0,7$ УЕ/мг белка против $9,3 \pm 0,6$ УЕ/мг белка, $p < 0,05$), транскрипционного фактора каппа-В р65 на 35,2% ($14,6 \pm 0,9$ УЕ/мг белка против $10,8 \pm 0,8$ УЕ/мг белка, $p < 0,05$), транскрипционного фактора каппа-В р50 на 16,8% ($11,1 \pm 0,9$ УЕ/мг белка против $9,5 \pm 0,4$ УЕ/мг белка, $p < 0,05$), ростового васкулоэндотелиального фактора-А на 21% ($90,3 \pm 1,5$ пг/мг против $74,6 \pm 1,7$ пг/мг, $p < 0,05$). Следовательно, развитие гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком СОПР было связано с повышением транскрипционной активности опухолевых клеток, интенсивности процессов неоангиогенеза.

В ротовой жидкости у больных основной группы в отличие от группы сравнения содержание HIF-1 α не изменялось ($p > 0,05$), а ростового васкулоэндотелиального фактора-А повышалось на 26,8% ($p < 0,05$). При этом, концентрация антимикробного белка лактоферрина была снижена на 42,9% ($p < 0,05$), а ИЛ-8 повышена на 15% ($p < 0,05$). Исходное снижение концентрации лактоферрина в ротовой полости до комбинированного лечения в основной группе при развитии гнойных осложнений сменялось многократным возрастанием содер-

жания лактоферрина в биологической жидкости в 21 раз. По сравнению со здоровыми донорами у больных раком СОПР до лечения содержание ЛФ было выше в 8,4 раза ($p < 0,05$). Результаты оценки корреляционной связи между уровнем HIF-1 α в опухолевом гомогенате и лактоферрином ротовой жидкости позволили выявить достоверный уровень связи ($R = 0,47$, $p < 0,001$).

Известно, что ядерный транскрипционный фактор карра-В является ключевым фактором транскрипции, контролирующим пролиферацию клеток (Чойнзонов Е.Л. с соавт., 2013). Существуют сведения, что как HIF-1 α при гипоксии может повысить транскрипционный потенциал ядерных транскрипционных факторов карра-В (Sahin K. et al., 2016), так и сам фактор NF-kB активирует HIF-1 α даже в условиях нормоксии (Van Uden P. et al., 2008). В связи с этим, расставить приоритеты в причинно-следственной связи между факторами трудно, можно лишь говорить об их взаимосвязанной активации, способствующей росту пролиферативного потенциала опухолевых клеток у больных раком СОПР при развитии гнойных осложнений. Повышение содержания фактора VEGF-A в супернатанте опухоли у больных основной группы, вероятно, было следствием накопления фактора HIF-1 α (Su Y. et al., 2006).

При ИГХ исследовании было установлено, что экспрессия фактора HIF-1 α в биоптате опухоли у больных основной группы была более выраженной на всех стадиях заболевания (табл. 9).

Таблица 9

Характеристика экспрессии HIF-1 α в опухолевой ткани у больных основной группы и группы сравнения с учетом размера опухоли

TNM	Уровень экспрессии HIF-1 α				Всего
	0	1+	2++	3+++	
Основная группа, n=96					
T1N0M0	-	3 (27,3%)*	7 (63,6%)	1 (9,1%)	11 (100%)
T2N0-2M0	-	7 (18,9%)*	25 (67,6%)*	5 (13,5%)	37 (100%)
T3N0-2M0	-	2 (4,2%)*	36 (75%)*	10 (20,8%)	48 (100%)
Группа сравнения, n=45					
T1N0M0	1 (16,7%)	5 (83,3%)	-	-	6 (100%)
T2N0-2M0	1 (5,6%)	12 (66,7%)	3 (16,7%)	2 (11,1%)	18 (100%)
T3N0-2M0	-	12 (57,1%)	6 (28,6%)	3 (14,3%)	21 (100%)

Примечание: * - достоверное отличие между группами при $p < 0,05$.

Таким образом, в основной группе, где развились гнойно-воспалительные осложнения, зависимость транскрипционной активности опухолевых клеток от гипоксии была высокой.

При нормоксии количество фактора HIF1 α в ядре резко ограничено и повышается только в условиях гипоксии, отражая функциональную активность HIF-1-комплекса (Новиков В.Е. с соавт., 2015). HIF1 α может перемещаться из цитоплазмы в ядро, где формирует активный комплекс с бета-субъединицей (Sendoel A. et al., 2010). Тип окрашивания клеток при иммуногистохимическом

исследовании позволял судить о наличии или отсутствии транслокации фактора в ядро. В основной группе ядерно-цитоплазматический тип окрашивания опухолевых клеток при размерах опухоли T1N0M0 наблюдался приблизительно в половине случаев (45,5%), при T2N0-2M0 – резко повышался до 91,9% и при T3N0-2M0 достигал 100%. В группе сравнения ядерно-цитоплазматический тип окрашивания опухолевых клеток встречался достоверно реже: при T1N0M0 имел место в трети случаев (33,3%), при T2N0-2M0 – в половине случаев (50%) и при T3N0-2M0 в 76,2%.

Белки *baх* ускоряют апоптоз и поэтому носят название проапоптозные (Guicciardi M.E. et al., 2003). От интенсивности апоптоза во многом зависит способность организма противостоять развитию опухоли. В группе сравнения при отсутствии гнойных осложнений при малых размерах опухоли экспрессия проапоптического фактора *baх* была выражена в большей мере, чем в основной группе.

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить статистически значимое сопряжение ($p < 0,001$) между экспрессией гипоксия-зависимого фактора и интенсивностью апоптоза (табл. 10).

Таблица 10

Сопряжение между экспрессией HIF-1 α и *baх* в опухолевых клетках у больных раком СОПР

Параметр	Уровень экспрессии				Количество позитивно окрашенных клеток, %
	0 (0-10%)	1+ (10-25%)	2++ (25-50%)	3+++ (более 50%)	
Экспрессия HIF-1 α в опухолевой ткани	2 (1,2%)	42 (25,9%)	88 (54,3%)	30 (18,5%)	41,3 \pm 5,4
Экспрессия <i>baх</i> в опухолевой ткани	39 (24,1%)	36 (22,2%)	56 (34,6%)	31 (19,1%)	39,8 \pm 3,8
$p (\chi^2)$	$p < 0,001 (\chi^2 = 40,9)$				$> 0,05$

Результаты оценки ранговой корреляционной связи между опухолевой экспрессией HIF-1 α и *baх* у больных раком СОПР позволили выявить, что повышение экспрессии HIF-1 α способствовало усилению экспрессии проапоптического фактора *baх* только при небольших размерах опухоли (T1-T2) и при отсутствии поражения лимфоузлов, то есть в начальные стадии заболевания.

В работе был разработан алгоритм прогнозирования развития гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания у больных раком СОПР. Комплекс дополнительного обследования пациентов в

этой целью должен включать исследование ротовой жидкости, зубного налета и биоптата опухоли по схеме, представленной в таблице 11.

Таблица 11

Алгоритм дополнительного обследования больных раком СОПР для раннего прогнозирования гнойных воспалительных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания

Субстрат	Показатель	Метод	Единицы измерения
Ротовая жидкость	Лактоферрин	ИФА	мкг/дл
	Интерлейкин-8	ИФА	пг/мл
	VEGF	ИФА	пг/мл
Зубной налет	Обнаружение <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> панелью «Дентоскрин» (ООО НПФ «Литех» Россия)	Метод ПЦР в режиме реального времени	Качественное обнаружение, количественное определение концентрации (кл/мл)
Биоптат опухоли	Содержание HIF-1 α в супернатанте	ИФА	УЕ/мг белка в лунке
	Содержание NF- κ B p65 в супернатанте	ИФА	УЕ/мг белка в лунке
	Содержание VEGF-A в супернатанте	ИФА	пг/мг
	Экспрессия HIF-1 α в ткани и тип окрашивания клетки	ИГХ	Число HIF-1 α положительных клеток на 1000 клеток, локализация окрашивания
	Экспрессия маркера апоптоза bax	ИГХ	Число HIF-1 α положительных клеток на 1000 клеток

До операции в ротовой жидкости с помощью иммуноферментного анализа необходимо определить содержание антимикробного белка лактоферрина в мкг/дл, провоспалительного цитокина ИЛ-8 в пг/мл и фактора роста сосудов VEGF-A в пг/мл. В зубном налете с помощью панели «Дентоскрин» методом ПЦР в режиме реального времени рекомендуется провести качественно-

количественный анализ спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости. Методика подразумевает не только выявление микроорганизмов, но и оценку количества бактерий в мл, сопоставление фактического результата с клинически значимой концентрацией. В биоптате опухоли, полученном при диагностических мероприятиях либо во время операции, необходимо с помощью иммуноферментного метода в супернатанте оценить содержание HIF-1 α в УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 в УЕ/мг белка в лунке и VEGF-A в пг/мг. Кроме того, с помощью ИГХ рекомендуется проанализировать выраженность экспрессии HIF-1 α в ткани опухоли и тип окрашивания опухолевых клеток (цитоплазматический или ядерно-цитоплазматический), выраженность экспрессии маркера апоптоза bax.

Сопоставление полученных показателей по алгоритмам, изложенным в таблицах 12-14, позволит исходно оценить риск прогрессирования, рецидивирования и метастазирования заболевания, развития гнойных осложнений комбинированного химиолучевого и хирургического лечения.

Заключение о низком риске рецидива заболевания формируется, если у больного со стадией рака СОПР T₁₋₂N₀M₀ в ротовой жидкости содержание лактоферрина выше 0,4 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 α выше 12 УЕ/мг белка в лунке, имеет место снижение концентрации NF-kB p65 ниже 10 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 75 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 α умеренно или сильно выраженная (то есть, число позитивных клеток более 25%), тип окрашивания цитоплазматический или ядерно-цитоплазматический, экспрессия проапоптотического фактора bax сильно выраженная (число позитивных клеток более 25%). Патогенетическое заключения такого обоснования видится в следующем: повышенное содержание фактора HIF-1 α в супернатанте опухоли свидетельствует, что гипоксия сдерживает рост опухоли, HIF-1 α выступает как проапоптотический фактор, обеспечивая высокую интенсивность апоптоза. Стабилизация HIF-1 α за счет высокого содержания лактоферрина ограничивает его транслокацию в ядро, объясняя цитоплазматический тип окрашивания клеток при ИГХ, приводит к ограничению активации транскрипционных факторов NF-kB, фактора роста сосудов VEGF-A, что снижает пролиферативный потенциал опухолевых клеток и рост кровеносных сосудов.

Дифференциальные точки деления концентрации лактоферрина в ротовой жидкости, HIF-1 α , NF-kB p65 и VEGF-A в супернатанте биоптата опухоли были определены методом ROC-анализа. Эти уровни показателей соответствуют выделению группы пациентов с низким риском прогрессирования заболевания с наибольшей диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью.

Изложенный алгоритм был апробирован на проспективной группе. Диагностическая чувствительность представленного алгоритма для заключения о низком риске рецидива заболевания составила 90%, а специфичность 71%, диагностическая точность или эффективность соответствовала 82%.

Таблица 12

Этапы формирования заключения о высоком риске роста опухоли и рецидивирования заболевания

Стадирование заболевания	Больные раком СОПР стадии T ₂₋₃ N ₀₋₂ M ₀		
Субстрат	Ротовая жидкость	Супернатант биоптата опухоли	Биоптат опухоли, ИГХ
<i>Маркер №1</i>	ЛФ	HIF-1α	HIF-1α
Изменение	Снижение	Повышение	Экспрессия 3+, тип окрашивания цитоплазмально-ядерный
Критическая точка	1,9 мкг/дл	14 УЕ/мг белка в лунке	Число позитивных клеток более 50%
<i>Маркер №2</i>		NF-kB p65	
Изменение		Повышение	
Критическая точка		16 УЕ/мг белка в лунке	
<i>Маркер №3</i>		VEGF-A	
Изменение		Снижение	
Критическая точка		80 пг/мг	
Заключение	Высокий риск роста опухоли и рецидивов. Высокий пролиферативный потенциал опухолевых клеток.		
Патогенетическое объяснение	Низкая стабилизация HIF-1α за счет низкого содержания лактоферрина, транслокация HIF-1α в ядро, активация транскрипционных факторов NF-kB, низкая активность ангиогенеза снижает метастатический потенциал.		

Заключение о высоком риске роста опухоли и рецидивов вследствие выраженного пролиферативного потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР T₂₋₃N₀₋₂M₀ в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1α выше 14 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 16 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 80 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1α сильно выраженная (то есть, число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный или фактор HIF-1α уже транслоцирован в ядро и является активатором других транскрипционных факторов (табл. 12).

Патогенетическое заключения такого обоснования заключается в следующем: низкая стабилизация HIF-1α за счет низкого содержания лактоферрина приводит к транслокации HIF-1α в ядро, происходит активация транскрипционных факторов NF-kB. Однако низкая активность ангиогенеза сдерживает ме-

тастатический потенциал. Диагностическая чувствительность алгоритма для заключения о высоком риске роста опухоли и рецидивов составила 82%, а специфичность 72%, диагностическая точность соответствовала 78%.

Заключение о высоком риске прогрессирования заболевания и метастазирования вследствие выраженного метастатического потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР $T_{2-3}N_{0-2}M_0$ в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 α выше 16,5 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 18 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A выше 105 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 α сильно выраженная (то есть, число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный или фактор HIF-1 α уже транслоцирован в ядро и является активатором других транскрипционных факторов (табл. 13).

Таблица 13

Этапы формирования заключения о высоком риске прогрессирования и метастазирования заболевания

Стадирование заболевания	Больные раком СОПР стадии $T_{1-3}N_{0-2}M_0$		
Гнойные осложнения	Присутствуют		
Субстрат	Ротовая жидкость	Супернатант биоптата опухоли	Биоптат опухоли, ИГХ
<i>Маркер №1</i>	ЛФ	HIF-1 α	HIF-1 α
Изменение	Снижение	Повышение	Экспрессия 3+, тип окрашивания цитоплазмально-ядерный
Критическая точка	1,9 мкг/дл	16,5 УЕ/мг белка в лунке	Число позитивных клеток более 50%
<i>Маркер №2</i>		NF-kB p65	
Изменение		Повышение	
Критическая точка		18 УЕ/мг белка в лунке	
<i>Маркер №3</i>		VEGF-A	
Изменение		Повышение	
Критическая точка		105 пг/мг	
Заключение	Высокий риск прогрессирования заболевания и метастазирования. Высокий метастатический потенциал.		
Патогенетическое объяснение	Низкая стабилизация HIF-1 α за счет низкого содержания лактоферрина, транслокация HIF-1 α в ядро, активация транскрипционных факторов NF-kB, стимуляция ангиогенеза, образование новой сосудистой сети, повышение метастатического потенциала.		

Диагностическая чувствительность алгоритма для заключения о высоком риске прогрессирования заболевания и метастазирования составила 91%, а специфичность 67%, диагностическая эффективность соответствовала 81%.

Этапы формирования заключения о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения отражены в таблице 14. Заключение о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений после операции формируется, если у больного со стадией рака СОПР T₂₃N₀₂M₀ в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, провоспалительного цитокина ИЛ-8 – выше 3335 пг/мл, ростового фактора VEGF выше 32 пг/мл, в зубном налете выявляются *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в концентрации выше 10⁴ кл/мл, *Porphyromonas gingivalis* – выше 10⁵ кл/мл, *Treponema denticola* – выше 10⁶ кл/мл. Обращает на себя внимание факт, что диагностически значимым является именно исходное снижение антимикробного пептида лактоферрина до операции еще до развития гнойно-воспалительных осложнений. При развитии гнойно-деструктивных процессов в ротовой полости лактоферрин многократно возрастал до 20-30 мкг/дл.

Таблица 14

Этапы формирования заключения о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения

Субстрат	Ротовая жидкость	Зубной налет
<i>Маркер №1</i>	ЛФ	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Изменение	Снижение	Выявление, превышение КЗК
Критическая точка	1,9 мкг/дл	10 ⁴ кл/мл
<i>Маркер №2</i>	ИЛ-8	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Изменение	Повышение	Выявление, превышение КЗК
Критическая точка	3335 пг/мл	10 ⁵ кл/мл
<i>Маркер №3</i>	VEGF	<i>Treponema denticola</i>
Изменение	Повышение	Выявление, превышение КЗК
Критическая точка	32 пг/мл	10 ⁶ кл/мл
Заключение	Высокий риск развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения	
Патогенетическое объяснение	Снижение антимикробной защиты за счет низкого уровня лактоферрина, повышение титра патогенной микробиоты ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF-A, способствующего повышению провета кровеносных сосудов, их проницаемости, хемотаксису макрофагов и гранулоцитов	

Патогенетическое объяснение разработанного алгоритма видится в следующем: снижение антимикробной защиты за счет низкого уровня лактоферрина, а также повышение титра патогенной микробиоты ротовой полости, уровня провоспалительного медиатора ИЛ-8 и стресс-индуцированного белка VEGF-A, способствующего повышению просвета кровеносных сосудов, их проницаемости, хемотаксису макрофагов и гранулоцитов, способствует в дальнейшем развитию гнойно-деструктивных осложнений комбинированного лечения.

Диагностическая чувствительность алгоритма для заключения о высоком риске развития гнойно-воспалительных осложнений комбинированного лечения составила 83%, специфичность 69%, диагностическая точность соответствовала 76%.

Методика прогнозирования прогрессирования заболевания и риска развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений была апробирована на 50 пациентах проспективной группы раком СОПР со стадией T₂₋₃N₀₋₁M₀. Среди 50 пациентов проспективной группы низкий риск прогрессирования рака СОПР был установлен у 11 (22%), высокий риск роста опухоли и рецидивов – у 15 (30%), высокий риск прогрессирования заболевания и метастазирования – 24 (48%) пациентов, высокий риск развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений – у 33 (66%) больных. Среди 33 пациентов с высоким риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений у 12 (36,4%) больных был одновременно выявлен высокий риск роста опухоли и рецидивов, а у 21 (63,6%) – высокий риск метастазирования.

Из 33 больных с высоким риском развития гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений 17 (51,5%) пациентам в послеоперационный период был дополнительно назначен препарат на основе лактоферрина Лапрот, а 16 (48,5%) больных получали стандартную терапию без оптимизации.

У пациентов, получавших Лапрот, сроки эпителизации тканей ротовой полости были короче на 26,3% ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами без оптимизации терапии. Заживление раны первичным натяжением у больных при оптимизации послеоперационного лечения происходило в 70,6% ($n=12$), что было чаще ($p=0,03$) по сравнению с пациентами без оптимизации терапии (31,3%). Высокая частота заживления раны вторичным натяжением у больных, не получавших Лапрот, была обусловлена частой встречаемостью гнойно-некротических послеоперационных осложнений. Общее число гнойных осложнений среди пациентов, не получавших препарата на основе лактоферрина, было статистически значимо чаще ($p=0,003$) по сравнению с больными, у которых послеоперационная терапия была оптимизирована (75% против 17,6%).

Использование препарата на основе антимикробного пептида лактоферрина позволило снизить частоту встречаемости и число превышений клинически значимой концентрации микробов ротовой полости, ассоциированных с развитием гнойно-деструктивных процессов.

У больных, которым был назначен Лапрот, содержание лактоферрина в слюне возросло в 6,3 раза ($p < 0,001$) с $1,83 \pm 0,21$ мкг/дл до $11,5 \pm 0,36$ мкг/дл, а ИЛ-8 снижался на 75,4% ($p < 0,001$) с $3348 \pm 30,5$ пг/мл до $824 \pm 11,8$ пг/мл. У пациентов, не получавших Лапрот, концентрация лактоферрина слюны статистически значимо не изменялась ($p > 0,05$), а содержание ИЛ-8 снижалось с $3352 \pm 28,1$ пг/мл до $2948 \pm 25,3$ пг/мл на 12% ($p < 0,05$).

Биоптат СОПР был взят у части больных проспективной группы в случае некрэктомии, лечении абсцессов и других гнойно-деструктивных осложнений в послеоперационный период. Это позволило повторно оценить содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани и провести ИГХ исследование у 28 пациентов. До операции содержание транскрипционных и ростовых факторов в гомогенате опухолевой ткани у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений в двух подгруппах не различалось ($p > 0,05$). После лечения с дополнительным назначением Лапрота в опухолевом гомогенате транскрипционные факторы HIF-1 α и NF- κ B p65 снижались на 23,8% ($p < 0,05$) и 30,2% ($p < 0,05$) (рис. 1-2), соответственно, васкулососудистый фактор роста VEGF-A снижался на 15,7% ($p < 0,05$) (рис. 3).

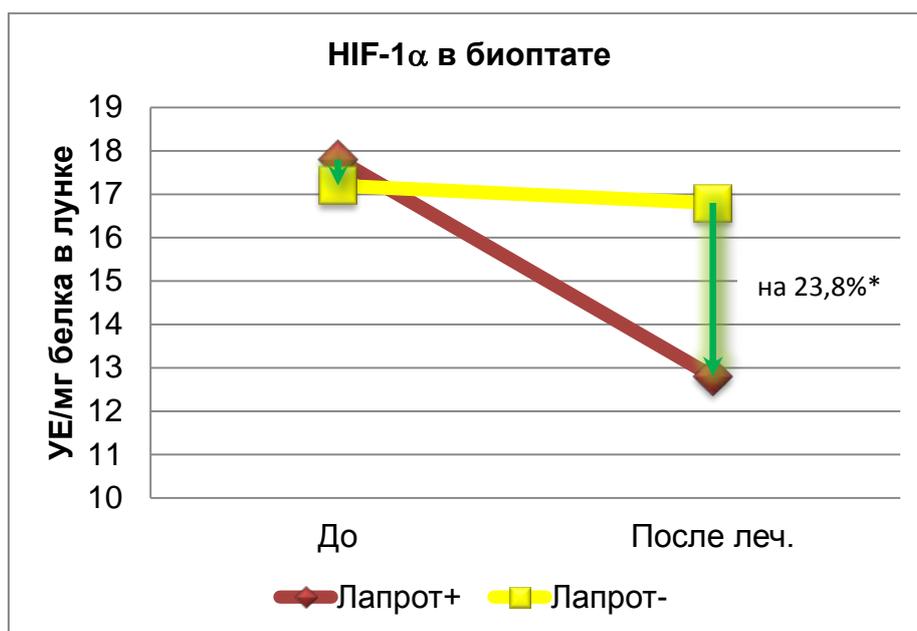


Рис. 1. Динамика гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в опухолевом биоптате у больных при дополнительном назначении и отсутствии применения Лапрота.
* - достоверное отличие у больных Лапрот+ и Лапрот- при $p < 0,05$.

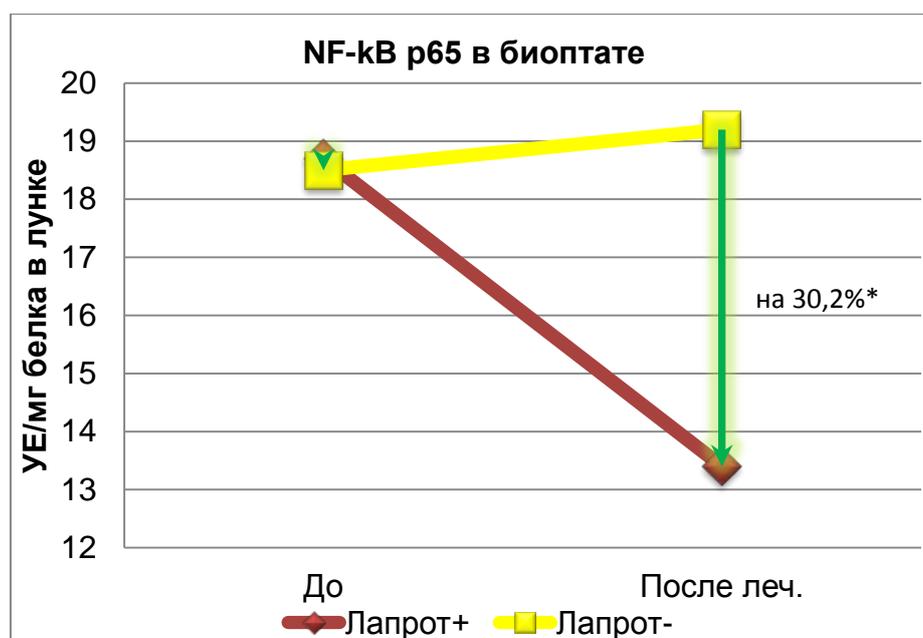


Рис. 2. Динамика транскрипционного фактора NF-kB p65 в опухолевом биоптате у больных при дополнительном назначении и отсутствии применения Лапрота. * - достоверное отличие у больных Лапрот+ и Лапрот- при $p < 0,05$.

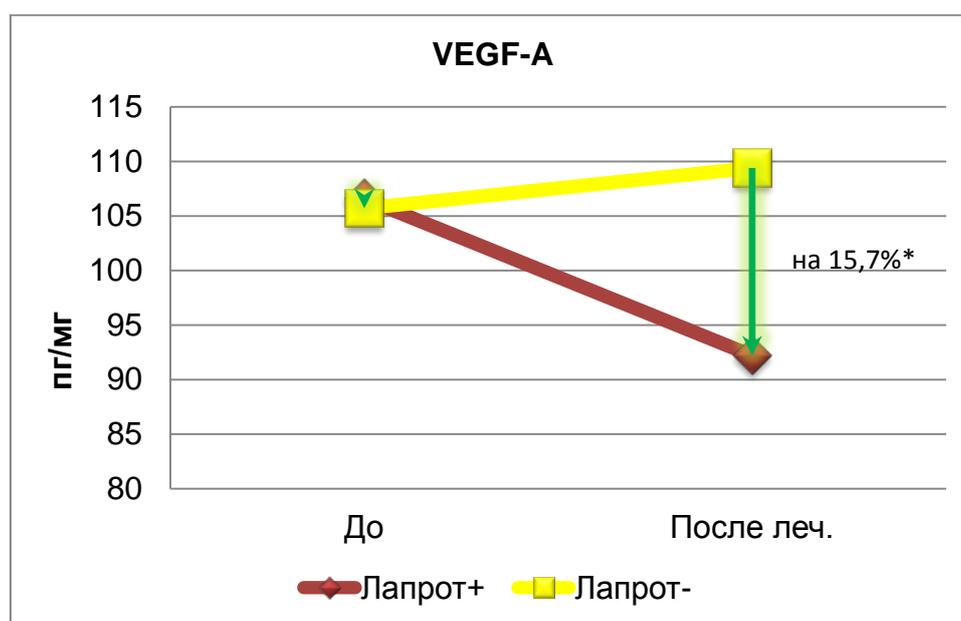


Рис. 3. Динамика в опухолевом биоптате ростового фактора VEGF-A у больных при дополнительном назначении и отсутствии применения Лапрота. * - достоверное отличие у больных Лапрот+ и Лапрот- при $p < 0,05$.

ИГХ исследование экспрессии HIF-1 α в опухолевой ткани у больных при дополнительном назначении и без использования препарата на основе лактоферрина показало, что достоверное снижение выраженности экспрессии с 3+ до 2+ имело место только при дополнительном назначении Лапрота (табл. 15).

Таблица 15

Характеристика экспрессии HIF-1 α в опухолевой ткани у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина

Назначение препарата	Этап	Уровень экспрессии HIF-1 α			Всего
		1+	2++	3+++	
Лапрот+	Исх.	-	1 (7,7%)	12 (92,3%)	13 (100%)
	После леч.	-	9 (69,2%)*	4 (30,8%)*	13 (100%)
Лапрот-	Исх.	-	2 (13,3%)	13 (86,7%)	15 (100%)
	После леч.	-	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100%)

Примечание: * - достоверное отличие между группами при $p < 0,05$.

Оптимизация терапии у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений хотя и не привела к статистически значимому снижению частоты цитоплазменной локализации HIF-1 α в опухолевых клетках, но появилась тенденция к повышению частоты нахождения HIF-1 α в цитоплазме без транслокации в ядро (табл. 16).

Таблица 16

Характеристики типа окрашивания клеток опухоли при ИГХ исследовании экспрессии HIF-1 α в ткани опухоли у больных с высоким риском гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений при дополнительном назначении и без препарата на основе лактоферрина

Назначение препарата	Этап	Тип окрашивания		
		цитоплазменный	ядерно-цитоплазменный	всего
Лапрот+	Исх.	-	13 (100%)	13 (100%)
	После леч.	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13 (100%)
Лапрот-	Исх.	-	15 (100%)	15 (100%)
	После леч.	1 (6,7%)	14 (93,3%)	15 (100%)

Исходно в двух подгруппах цитоплазменная локализация HIF-1 α в опухолевых клетках не встречалась. После лечения в подгруппе Лапрот+ цитоплазменный тип окрашивания клеток встречался в 38,5%, а при отсутствии оптимизации лечения – в 6,7%.

Итак, применение препарата на основе лактоферрина у больных с высоким риском гнойных осложнений позволило снизить частоту гнойно-некротических послеоперационных осложнений за счет усиления антимикробного потенциала слюны, ограничившего число превышений клинически значимой концентрации патогенных микробов ротовой полости, снижения провоспалительного медиатора ротовой жидкости ИЛ-8. При оптимизации терапии после операции снижение числа гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений было сопряжено с ограничением пролиферативного и метастатиче-

ского потенциала: в опухолевом гомогенате снижалась концентрация транскрипционных факторов HIF-1 α и NF-kB p65, васкулососудистого фактора роста VEGF-A, выраженность экспрессии HIF-1 α в ткани, намечалась тенденция к ограничению транслокации HIF-1 α в ядро. Следовательно, при применении препарата на основе лактоферрина кроме иммуномодулирующего, антимикробного развивался еще и противоопухолевый эффект, что важно при профилактике и лечении гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных.

ВЫВОДЫ

1. В первые 12 месяцев после окончания комбинированного первичного лечения у больных раком СОПР T₁₋₃N₀₋₂M₀ гнойные осложнения способствуют прогрессированию основного заболевания. У больных раком СОПР при развитии гнойных осложнений в течение двух лет наблюдения продолженный рост опухоли (26% против 8,9%, p=0,03), рецидив опухоли (21,9% против 4,4%, p=0,009), метастазы в региональные лимфоузлы (33,3% против 15,6%, p=0,028), общее число случаев прогрессии заболевания (40,6% против 8,9%, p=0,0001) наблюдаются достоверно чаще (p<0,05) по сравнению с пациентами без гнойных осложнений.

2. Развитие гнойных осложнений комбинированного лечения больных раком СОПР сопряжено с повышением гипоксия-зависимой транскрипционной активности опухолевых клеток, усилением процессов неоангиогенеза и снижением активности апоптоза, что является патогенетической основой прогрессии опухолевого заболевания. При наличии гнойных осложнений в супернатанте ткани опухоли содержание гипоксия-индуцибельного фактора 1- α повышается на 38,7% (p<0,05), транскрипционного фактора каппа-B p65 на 35,2% (p<0,05), ростового васкулоэндотелиального фактора-A на 21% (p<0,05), наблюдается снижение экспрессии проапоптического фактора bax в ткани опухоли, в ротовой жидкости концентрация ростового васкулоэндотелиального фактора-A повышается на 26,8% (p<0,05).

3. У больных раком СОПР выявление в зубном налете *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в концентрации выше 10⁴ кл/мл, *Porphyromonas gingivalis* – выше 10⁵ кл/мл, *Treponema denticola* – выше 10⁶ кл/мл, снижение содержания в ротовой жидкости лактоферрина ниже 1,9 мкг/дл, повышение провоспалительного цитокина ИЛ-8 выше 3335 пг/мл сопряжено с развитием гнойных осложнений комбинированного лечения, включая хирургическое, с диагностической чувствительностью 83%, диагностической специфичностью 69% и точностью 76% (p<0,001).

4. При раке СОПР HIF1- α способствует активации ядерного фактора транскрипции каппа-B с усилением связи при повышении размера опухоли, наличии метастазов в лимфоузлы и снижении дифференцировки опухолевых клеток. HIF1- α является проангиогенным фактором за счет прямой связи с экспрессией VEGF-A при раке СОПР, усиливающейся при метастазировании в ре-

гиональные лимфоузлы. Стабилизация HIF1- α с ограничением его транслокации в ядро достигается при региональном возрастании уровня лактоферрина в ротовой жидкости. Проапоптическую роль HIF1- α играет только на ранних стадиях заболевания, способствуя усилению экспрессии bax в опухолевой ткани при малых размерах и отсутствии поражения лимфоузлов.

5. Негативная и слабо выраженная экспрессия HIF1- α в опухоли сопряжена с более высокой вероятностью двухлетней послеоперационной выживаемости (76%) больных раком СОПР по сравнению с выживаемостью при умеренной и сильной экспрессии (46%) ($p < 0,05$). Развитие гнойных осложнений комбинированного лечения, метастазирования в регионарные лимфатические узлы сопряжено с повышением в опухолевой ткани экспрессии HIF1- α , транслокацией его из цитоплазмы в ядро опухолевых клеток.

6. У пациентов с раком СОПР определение исходного риска гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования опухолевого заболевания требует проведения оценки содержания лактоферрина, ИЛ-8 и VEGF-A в ротовой жидкости, качественно-количественного анализа в зубном налете спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, содержания HIF1- α , ядерного транскрипционного фактора каппа-B p65 и VEGF-A в супернатанте опухоли, иммуногистохимической оценки выраженности опухолевой экспрессии HIF1- α и типа окрашивания опухолевых клеток, выраженности экспрессии маркера апоптоза bax.

7. Системное и местное применение препарата на основе лактоферрина у больных раком СОПР с высоким риском гнойных осложнений комбинированного лечения позволяет снизить частоту последних за счет усиления антимикробного потенциала ротовой жидкости, снижения провоспалительных цитокинов, ограничения числа патогенных микробов. При этом ограничивается пролиферативный и метастатический потенциал опухолевых клеток: в опухолевой ткани снижается концентрация транскрипционных факторов HIF1- α на 23,8% ($p < 0,05$), транскрипционного фактора каппа-B p65 на 30,2% ($p < 0,05$), VEGF-A на 15,7% ($p < 0,05$), выраженность экспрессии HIF1- α в ткани опухоли.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Алгоритм дополнительного обследования больных раком СОПР для раннего прогнозирования гнойных осложнений комбинированного лечения и прогрессирования заболевания должен включать определение в ротовой жидкости содержания антимикробного белка лактоферрина и провоспалительного цитокина ИЛ-8, фактора роста сосудов VEGF-A, в зубном налете проведение качественно-количественного анализа спектра бактерий, ассоциированных с развитием воспалительно-деструктивных заболеваний ротовой полости, в биоптате опухоли содержание HIF-1 α , NF-kB p65 и VEGF-A в супернатанте, ИГХ оценка выраженности опухолевой экспрессии HIF-1 α и типа окрашивания опухолевых клеток, выраженности экспрессии маркера апоптоза bax.

2. Заключение о высоком риске роста опухоли и рецидивов вследствие выраженного пролиферативного потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР $T_{2-3}N_{0-2}M_0$ в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 19 мкг/дл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 α выше 14 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 16 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A ниже 80 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 α сильно выраженная (число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный.

3. Заключение о высоком риске прогрессирования заболевания с повышением метастатического потенциала опухолевых клеток формируется, если у больного со стадией рака СОПР $T_{2-3}N_{0-2}M_0$ в ротовой жидкости содержание лактоферрина ниже 19 мкг/мл, в супернатанте биоптата опухоли содержание HIF-1 α выше 16,5 УЕ/мг белка в лунке, NF-kB p65 выше 18 УЕ/мг белка в лунке, VEGF-A выше 105 пг/мг, по результатам ИГХ экспрессия фактора HIF-1 α сильно выраженная (число позитивных клеток более 50%), тип окрашивания цитоплазмально-ядерный.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*1. Олесов, Е.Е. Оценка ответственности пациентов с имплантатами за соблюдение гигиены полости рта и диспансерное наблюдение. / Е.Е. Олесов, Е.Ю. Хавкина, Н.И. Шаймиева, В.И. Кононенко, Р.У. Берсанов, С.С. Хубаев // Российский стоматологический журнал. -2013. -№2. –С.50-52.

*2. Олесов, Е.Е. Недостатки планирования стоматологического лечения и протезирования и их причины на современном этапе. / Е.Е. Олесов, Н.И. Шаймиева, А.В. Лесняк, В.И. Кононенко, А.Е. Олесов, Н.Е. Монакова // Кубанский научный медицинский вестник. -2013.-Т.141. -№6. –С.138-140.

3. Олесов, Е.Е. Клинико-экономические аспекты профессиональной гигиены рта. / Е.Е. Олесов, Н.И. Шаймиева, А.Е. Олесов, В.И. Кононенко, Е.П. Юффа // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 2. – С. 131-135.

*4. Шаймиева, Н.И. Медико-экономическая эффективность профессиональной гигиены рта. / Н.И. Шаймиева, В.И. Кононенко, Р.У. Берсанов, Н.Е. Монакова // Стоматология.– 2014.– №3.– С.8-10.

*5. Омельченко, В.П. Возможности масс-спектрометрии MALDI-TOF в прогнозировании гнойно-септических осложнений после хирургического лечения рака слизистой оболочки полости рта. / В.П. Омельченко, В.И. Кононенко, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2. –С.785. URL: www.science-education.ru/129-21908

*6. Кононенко, В.И. Прогнозирование и лечение гнойно-септических осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта путем оценки врожденных факторов иммунной резистентности полости рта. / В.И. Кононен-

ко, О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, А.Ю. Максимов // Аллергология и иммунология. 2015. –Т.16. -№4. –С.389-390.

*7. Кононенко, В.И. Состояние факторов врожденной иммунной защиты ротовой полости, транскрипционной активности опухолевых клеток у больных раком слизистой оболочки полости рта с гнойно-септическими осложнениями. / В.И. Кононенко, О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, А.Ю. Максимов // Стоматология. - 2015. –Т.94. -№6-2. –С.7.

*8. Кононенко, В.И. Прогнозирование гнойно-септических осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта. / В. И. Кононенко, О. И. Кит, Е. Ф. Комарова, А. Ю. Максимов, А. А. Демидова // Научное обозрение. -2015. –№16. –С.214-219.

*9. Кононенко, В.И. Роль транскрипционного фактора, чувствительного к гипоксии, Hupoxia-inducible factor-1 в опухолевой прогрессии при раке слизистой оболочки полости рта. / В.И. Кононенко, А.Ю. Максимов // Институт стоматологии. -2015. -№2. –С.36-38.

*10. Кит, О.И. Молекулярно-генетические маркеры рака слизистой оболочки полости рта. / О.И. Кит, В.И. Кононенко, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова // Уральский медицинский журнал. -2015. №7 (130). –С.87-93.

*11. Кит, О.И. Экспрессия транскрипционных факторов в тканях рака слизистой оболочки полости рта. / О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, В.И. Кононенко, В.В. Позднякова, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова. // Медицинский вестник Северного Кавказа. -2016. –Т.11. -№4. –С.517-520.

*12. Кит, О.И. Оценка взаимосвязи экспрессии гипоксия - индуцибельного фактора -1 α в ткани рака слизистой оболочки полости рта с клиническими характеристиками заболевания. / О.И. Кит, В.И. Кононенко, Е.Ф. Комарова, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, Новикова И.А. // Успехи современной науки. -2016. –Т.1. -№8. -С. 153-157.

*13. Кит, О.И. Влияние развития послеоперационных гнойных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта на локальную и системную экспрессию гипоксия-индуцибельного фактора-1 α . / О.И. Кит, В.И. Кононенко, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, И.А. Новикова // Успехи современной науки. -2016. –Т.3. -№9. –С.6-11.

*14. Кит, О.И. Патогенетические подходы к профилактике и лечению гнойных послеоперационных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта. / О.И. Кит, В.И. Кононенко, Е.Ф. Комарова, В.В. Позднякова, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова // Успехи современной науки и образования. - 2016. –Т.6. -№10. –С.52-54.

15. Komarova, E.F. Relationship between expression of hypoxia-inducible factor-1 α and activity of transcription factors in patients with oral mucosa cancer. / E.F. Komarova, O.I. Kit, A.Yu. Maksimov, V.I. Kononenko, A.A. Demidova. // J. Clin. Oncol. -2016. Suppl; abstr e17528.

16. Maksimov, A.Yu. Prognostic role of saliva mass spectrometry in the development of suppurative-septic complications after surgical treatment of oral muco-

sa cancer. / A.Yu. Maksimov, O.I. Kit, V.I. Kononenko, E.F. Komarova, A.A. Demidova. // J. Clin. Oncol. -2016. -Suppl; abstr e17527.

17. Комарова, Е.Ф. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в ткани рака слизистой оболочки полости рта в зависимости от распространенности злокачественного процесса. / Е.Ф. Комарова, О.И. Кит, А.Ю. Максимов, В.И. Кононенко, А.А. Демидова // II Петербургский форум «Белые ночи» 22-24 июня, 2016. – С.281-282.

18. Комарова, Е.Ф. Взаимосвязь экспрессии гипоксия- индуцибельного фактора-1 α с активностью транскрипционных факторов у больных раком слизистой оболочки ротовой полости. / Е.Ф. Комарова, О.И. Кит, В.И. Кононенко, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова // Евразийский онкологический журнал (Материалы IX съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии). – Т.4, №2. – 2016. – С. 113.

19. Комарова, Е.Ф. Прогностическая роль масс-спектрометрии слюны в развитии гнойно-септических осложнений хирургического лечения рака слизистой оболочки полости рта. / Е.Ф. Комарова, О.И. Кит, В.И. Кононенко, А.Ю. Максимов, А.А. Демидова // Евразийский онкологический журнал (Материалы IX съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии). – Т.4, №2. – 2016. – С. 621.

20. Кононенко, В.И. Оценка применения препарата на основе лактоферрина для профилактики и лечения послеоперационных гнойно-некротических осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта. / В.И. Кононенко, О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, В.В. Позднякова, А.Ю. Максимов, И.А. Новикова, Е.П. Коробейникова, А.А. Демидова // Международный журнал экспериментального образования. -2016. -№10 (часть 2). –С.248.

21. Кононенко, В.И. Клинические аспекты применения стартовой антибактериальной терапии в комплексном лечении и гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. / В.И. Кононенко, Е.В. Нейковская // Актуальные вопросы клинической стоматологии. Сборник научных работ, посвященных 55-летию стоматологических кафедр Ставропольского государственного медицинского университета. Ставрополь. -2015. -С.235-237.

22. Кононенко, В.И. Локальная и системная экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 α при развитии послеоперационных гнойных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта / В.И. Кононенко, О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, И.А. Новикова, А.Ю. Максимов. // Злокачественные опухоли. - 2016. - № 4. Спецвыпуск 1 // Материалы XX Российского онкологического конгресса. Москва, 15-17 ноября 2016 г. - С. 195.

23. Кит, О.И. Факторы транскрипции, неоангиогенеза и апоптоза при гнойных послеоперационных осложнениях у больных с различным течением рака слизистой оболочки полости рта. / О.И. Кит, В.И. Кононенко, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, И.А. Новикова, Е.П. Коробейникова, А.Ю. Максимов. // Злокачественные опухоли. - 2016. - № 4. Спецвыпуск 1 //

Материалы XX Российского онкологического конгресса. Москва, 15-17 ноября 2016 г. - С. 195-196.

24. Кононенко, В.И. Диагностическая значимость масс-спектрометрического исследования слюны у больных раком слизистой оболочки полости рта / В.И. Кононенко, Д.В. Семочкин, Г.В. Антоненко // Актуальные проблемы клинической лабораторной диагностики. URL: <http://econf.rae.ru/article/10510>

25. Кононенко, В.И. Микробиологические аспекты прогнозирования гнойных послеоперационных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта / В.И. Кононенко, Д.В. Семочкин // Вопросы клинической и экспериментальной онкологии . URL: <http://econf.rae.ru/article/10509>

26. Кононенко, В.И. Роль тканевых факторов транскрипции, ангиогенеза и апоптоза в патогенезе гнойных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта. / В.И. Кононенко, О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, И.А. Новикова, А.Ю. Максимов. // II онкологический форум Юга России, посвященный 85-летию Ростовского НИОИ. г. Ростов-на-Дону, 31 октября-1 ноября 2016 г. – С.54.

*27. Кононенко, В. И. Оценка экспрессии факторов транскрипции, неоангиогенеза и апоптоза при послеоперационных осложнениях у больных с различным течением рака слизистой оболочки полости рта / В.И. Кононенко, О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, А.Ю. Максимов, В.В. Позднякова, И.А. Новикова, А.А. Демидова // Кубанский научный медицинский вестник. -2017. -№1 (Т.162). – С.64-67.

*28. Кит, О.И. Патогенетическое обоснование лечебного действия препарата на основе лактоферрина у больных раком слизистой оболочки полости рта / О.И. Кит, В.И. Кононенко, С.Ю. Максюков, Е.Ф. Комарова, В.В. Позднякова, И.Р. Дашкова // Успехи современной науки и образования. -2017. –Т.9. -№4. – С.23-29.

*29. Кит, О.И. Роль факторов транскрипции и ангиогенеза в патогенезе гнойных послеоперационных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта. / О.И. Кит, В.И. Кононенко, С.Ю. Максюков, Е.Ф. Комарова, А.Ю. Максимов, И.Р. Дашкова, В.В. Позднякова, И.А. Новикова, А.А. Демидова // Научный журнал КубГАУ.- 2017. -№128 (04). <http://ej.kubagro.ru/2017/04/pdf/23.pdf>

30. Komarova, E.F. Tumor expression of hypoxia-inducible factor and antimicrobial peptides in oral fluid for prediction of after-surgery suppurative complications in patients with oral mucosa cancer. / O.I. Kit, V.I. Kononenko, A.Yu. Maksimov, V.V. Pozdnyakova, I.A. Novikova, A.A. Demidova // J. Clin. Oncol. -2017. suppl; abstr e17530.

31. Кононенко, В.И. Патогенетическое обоснование лечения гнойных послеоперационных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта / В.И. Кононенко, С.Ю. Максюков, Ш.Г. Кипиани, И.А. Демидов // Главный врач Юга России. -2017. Май (55). –С.33-36.

32. Кононенко, В.И. Патогенетические особенности гнойных послеоперационных осложнений у больных раком слизистой оболочки полости рта / В.И.

Кононенко, С.Ю. Максюков, Ш.Г. Кипиани, Г.А. Антоненко // Главный врач Юга России. -2017. Май (55). –С.5-9.

33. Кит, О.И. Патогенетическое обоснование лечебного действия препарата на основе лактоферрина у больных раком слизистой оболочки полости рта / О.И. Кит, В.И. Кононенко, С.Ю. Максюков, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, И.Р. Дашкова, А.Ю. Максимов // III Петербургский форум «Белые ночи» 23-25 июня, 2017. – С.

34. Кит, О.И. Алгоритм прогнозирования развития рецидивов у больных раком слизистой оболочки полости рта с риском развития гнойных послеоперационных осложнений / О.И. Кит, В.И. Кононенко, С.Ю. Максюков, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова, В.В. Позднякова, И.Р. Дашкова, А.Ю. Максимов // III Петербургский форум «Белые ночи» 23-25 июня, 2017. – С.

* - опубликовано в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России для опубликования материалов докторских и кандидатских диссертаций.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИГХ исследование – иммуногистохимическое исследование

ИЛ – интерлейкин

ЛФ – лактоферрин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОПР – слизистая оболочка полости рта

ЧЛО - челюстно-лицевая область

HIF (hypoxia-inducible factor) – гипоксия-индуцибельный фактор

MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry) - времяпролетная масс-спектрометрия на основе ионизации вещества с помощью матрицы и лазерного излучения

NF-κB (nuclear factor kappa-B cells) - ядерные транскрипционные факторы каппа-В

ROC (Receiver operating characteristic) - график, позволяющий оценить качество бинарной классификации

VEGF (Vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов