

Оригинальная статья

@ Енгибарян М.А., Костоев И.С., Максимов А.Ю., Проходная В.А., Кононенко В.И., Максюков С.Ю., 2021

УДК: 616.316.5-006

DOI: 10.52420/2071-5943-2021-20-3-54-61

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ОКОЛОУШНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.А. Енгибарян<sup>1</sup>, И.С. Костоев<sup>1</sup>, А.Ю. Максимов<sup>1</sup>,  
В.А. Проходная<sup>2</sup>, В.И. Кононенко<sup>2</sup>, С.Ю. Максюков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

**Введение.** Комплекс транскрипционных белков семейства NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) заслуженно привлекает внимание как фактор, способный определить течение злокачественного заболевания. Перспективность его изучения в совокупности с экспрессией провоспалительного гена IL6 у больных раком околоушной железы (ОСЖ) связана с разработкой модуляции лечения злокачественного заболевания и оценкой риска течения болезни. **Цель исследования** — определить влияние экспрессионной активности провоспалительного гена интерлейкина-6 и транскрипционного гена NFκB1 на выживаемость больных раком ОСЖ. **Материалы и методы.** Проведено когортное ретроспективное исследование на двух группах. В эпидемиологическую группу больных были включены 140 человек из онкологического регистра Ростовской области. Клиническая часть работы проведена на 25 больных раком ОСЖ обоего пола в возрасте от 50 до 80 лет. Срок наблюдения за больными после радикального хирургического вмешательства — 18 лет. В клинической группе исходно методом ПЦР реального времени в опухолевой и условно здоровой ткани оценивали экспрессионную активность генов NFκB1 и IL6. Выживаемость пациентов анализировали с помощью метода Каплана-Мейера. **Результаты.** По результатам анализа выживаемости в эпидемиологической группе вероятность того, что больной раком ОСЖ переживет первый год после постановки диагноза, составляла 95,7%, три года — 82,4%, пять лет — 70,9% и 10 лет — 31,2%. При сравнительном изучении уровней экспрессии генов в опухолевых образцах ткани по сравнению с условно здоровой тканью установлено повышение ( $p < 0,001$ ) относительного показателя как для гена IL6 (в 5,7 раза), так и для гена NFκB1 (в 7,9 раза). **Обсуждение.** Анализ наших данных показал возможность использования комплексной оценки экспрессии генов NFκB1 и IL6 в клетках опухолевых образцов ткани рака ОСЖ, полученных при операции, для прогноза выживаемости больных в отдаленный период после хирургического лечения. **Заключение.** Доказанным прогностическим фактором, определяющим течение заболевания у больных раком ОСЖ, выступал экспрессионный профиль гена NFκB1 в опухолевой ткани, что необходимо учитывать при формировании прогноза заболевания. Самостоятельного влияния на выживаемость больных раком ОСЖ выраженность экспрессии гена IL6 в опухолевых клетках не имела, но способствовала усилению функциональной активации гена транскрипции NFκB1.

**Ключевые слова:** рак околоушной слюнной железы, экспрессия генов, выживаемость больных, прогноз.

**Цитирование:** Генетические факторы влияния на выживаемость больных раком околоушной слюнной железы / М. А. Енгибарян, И. С. Костоев, А. Ю. Максимов [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 3. – С. 54-61. – Doi: 10.52420/2071-5943-2021-20-3-54-61.

**Cite as:** Genetic factors influence the survival rate of parotid salivary gland cancer patients / M. A. Engibaryan, I. S. Kostoev, A. Ju. Maksimov [et al.] // Ural medical journal. – 2021. – Vol. 20 (3). – P. 54-61. – Doi: 10.52420/2071-5943-2021-20-3-54-61.

Рукопись поступила: 13.04.2021. Принята в печать: 24.06.2021

## GENETIC FACTORS INFLUENCE THE SURVIVAL RATE OF PAROTID SALIVARY GLAND CANCER PATIENTS

M.A. Engibaryan<sup>1</sup>, I.S. Kostoev<sup>1</sup>, A.Ju. Maksimov<sup>1</sup>,  
V.A. Prohodnaja<sup>2</sup>, V.I. Kononenko<sup>2</sup>, S.Ju. Maksjukov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>2</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Introduction.** The complex of transcriptional proteins of NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) family deservedly attracts attention as a factor capable of determining the course of malignant disease. Its promising study in combination with the expression of proinflammatory gene IL6 in patients with parotid cancer (PSG) is associated with the development of modulation of malignant disease treatment and risk assessment of the disease course. **Aims** — to determine the effect of the expression activity of the proinflammatory interleukin-6 gene and the NFKB1 transcriptional gene on the survival rate of patients with parotid cancer. **Materials and methods.** A cohort retrospective study was conducted in two groups. The epidemiological group of patients included 140 people from the cancer registry of Rostov region. The clinical part of the work was carried out on 25 patients with PSG cancer of both sexes aged 50 to 80 years. Follow-up period of the patients after radical surgery was 18 years. Expression activity of NFKB1 and IL6 genes was estimated by real-time PCR in tumor and conditionally healthy tissue. Patient survival rate was analyzed using Kaplan-Meier method. **Results.** According to the results of the survival analysis in the epidemiological group, the probability that an PSG cancer patient would survive the first year after diagnosis was 95.7%, three years — 82.4%, five years — 70.9% and 10 years — 31.2%. A comparative study of gene expression levels in tumor tissue samples compared to conditionally healthy tissue revealed an increase ( $p < 0.001$ ) in the relative index for both the IL6 gene (5.7 times) and the NFKB1 gene (7.9 times). **Discussion.** Analysis of our data showed the possibility of using the complex evaluation of NFKB1 and IL6 gene expression in the cells of tumor samples of PSG cancer tissue obtained during surgery to predict the long-term survival of patients after surgical treatment. **Conclusions.** The expression profile of NFKB1 gene in tumor tissue was a proven prognostic factor determining the course of the disease in patients with PSG cancer, which should be taken into account when forming the prognosis of the disease. The expression of IL6 gene expression in tumor cells had no independent effect on the survival rate of PSG cancer patients, but contributed to the functional activation of NFKB1 transcription gene.

**Keywords:** salivary parotid cancer, gene expression, patient survival, prognosis.

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время молекулярно-генетические методы все шире входят в практику современной онкологии [1]. Заболеваемость злокачественными опухолями слюнных желез относительно низка по сравнению с другими видами рака головы и шеи. На их долю приходится более 0,5% всех злокачественных новообразований и примерно 3-6,5% всех случаев опухолей головы и шеи [2]. В основном рак поражает околоушную или поднижнечелюстную слюнные железы [3]. Поскольку эти опухоли медленно растут, то обнаруживаются на поздних стадиях, когда радикальное хирургическое лечение провести затруднительно, полностью удалить опухоль не представляется возможным. К химиотерапии и лучевой терапии рак больших слюнных желез резистентен [4]. В связи с совокупностью данных обстоятельств существуют затруднения в лечении рака околоушной слюнной железы (ОСЖ) поздних стадий, когда складывается жизнеугрожающая ситуация. Таким образом, необходимо разработать новые терапевтические стратегии молекулярной таргетной терапии для лечения злокачественных опухолей слюнных желез.

Комплекс транскрипционных белков семейства NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) определяют ответ опухолевых клеток на экзогенные и эндогенные сигналы, в том числе физические, стрессорные

воздействия, инфекцию, воспаление [5]. Белки на N-конце имеют высококонсервативный участок RHD (Rel homology domain), обуславливающий комплексирование в гомо- или гетеродимеры, транспорт в клеточное ядро. В норме последовательность NF $\kappa$ B-связывающего сайта узнается на ДНК и происходит взаимодействие фактора с белками-ингибиторами семейства I $\kappa$ B. Напротив, C-концевой домен лабильный и отвечает за активацию транскрипции либо ее ингибирование [6]. Активация NF $\kappa$ B-сигнального пути происходит в присутствии провоспалительных цитокинов, бактериальных липополисахаридов, вирусов, ведет к усилению клеточной пролиферации за счет усиленной передачи информации с ДНК на РНК, подавлению апоптоза [7]. Являясь центральным звеном транскрипции для генов иммунного ответа, NF $\kappa$ B заслуженно привлекает внимание как фактор, способный определить течение злокачественного заболевания [8]. Перспективность его изучения в совокупности с экспрессией провоспалительного гена IL6 позволит понять, насколько модуляция функционирования данного сигнального пути является необходимой при лечении рака больших слюнных желез [9].

**Цель исследования** — определить влияние экспрессионной активности провоспалительного гена интерлейкина-6 и транскрипционного гена NFKB1 на выживаемость больных раком ОСЖ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При организации исследования были сформированы две группы: эпидемиологическая (n=140) и клиническая (n=25), в которые включили пациентов с раком ОСЖ I-IV стадий заболевания. В эпидемиологическую группу были включены все больные из онкологического регистра Ростовской области с диагнозом рака ОСЖ с 2002 по 2020 гг. Клиническая часть работы проведена на 25 больных раком ОСЖ обоего пола в возрасте от 50 до 80 лет, у которых проводили генетическое исследование на опухолевой ткани, полученной при операции, а затем проспективно в течение пяти лет с 2015 по 2020 гг. анализировали выживаемость пациентов. Проспективное наблюдение за пациентами в клинической группе позволило оценить влияние генетических факторов на выживаемость больных раком ОСЖ.

Критерии включения пациентов в эпидемиологическую группу: рак околоушной слюнной железы (МКБ С07), проживание пациента в Ростовской области, наличие информации в онкологическом регистре региона о дате постановки диагноза, дате операции и сведения о наличии или отсутствии летального исхода больного с указанием причины смерти при ее наступлении. Критерии исключения из эпидемиологической группы: переезд пациента в другую область и потеря наблюдения за больным.

Критерии включения в клиническую группу: рак околоушной слюнной железы (МКБ С07), отсутствие до момента исследования специализированного лечения онкологического заболевания. Критерии исключения из клинической группы: пациенты в стадии обострения воспалительных заболеваний полости рта; с тяжелой общесоматической патологией (ВИЧ, СПИД, гепатит, декомпенсация соматических заболеваний).

Эпидемиологическое исследование проведено в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону). Клиническая часть работы проведена совместно в ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России.

Срок наблюдения за больными раком ОСЖ после радикального хирургического вмешательства в эпидемиологической группе — 18 лет, в клинической группе — 5 лет.

Основной исход исследования: изучали выживаемость больных раком ОСЖ и число, а также сроки наступления летальных исходов после выполнения радикального хирургического вмешательства. Оценивали влияние генетических факторов на риск развития летальных исходов.

Возраст пациентов эпидемиологической группы колебался от 29 до 89 лет, в среднем составлял  $62,6 \pm 1,1$  года (медиана — 62,5 года, межквартильный диапазон — 53-76 лет). Женщин было 65 (46,4%), мужчин 75 (53,6%). В городах Ростовской области проживали 108 (77,1%) пациентов с раком ОСЖ, в сельских районах — 32 (22,9%) пациента.

Средний возраст пациентов клинической группы составлял  $71,3 \pm 1,7$  года (медиана — 70 лет, межквартильный диапазон — 56-77 лет), размах от 50 до 80 лет. По полу наблюдали 9 женщин (36%) и 16 мужчин (64%). По гистологическому типу у 17 (68%) пациентов был выявлен мукоэпи-

дермоидный рак, у 8 (32%) больных — ацинозно-клеточный рак.

Клиническое обследование всех пациентов проходило по стандартному протоколу: визуальный контроль, пальпация, УЗИ слюнных желез и лимфатических узлов шеи, тонкоигольная аспирационная биопсия из опухоли, цитологическое исследование биоптатов, компьютерное и магнитно-резонансное томографическое исследование головы и шеи, компьютерная томография грудной полости.

Операционные биоптаты слюнной железы для генетического анализа замораживали в жидком азоте ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) и в течение часа доставляли в лабораторию. Из полученных образцов ткани готовили препараты толщиной 8 мкм.

Фрагменты ткани помещали в пробирку с 350 мкл буфера набора для лизиса клеток и связывания общей РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), включая 1% бета-меркаптоэтанол. Экстракцию, выделение и элюирование общей РНК проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT<sup>TM</sup> RNA Assay Kit (Invitrogen, США) на флуориметре Qubit<sup>TM</sup> (Invitrogen, США).

Для получения комплементарной ДНК (кДНК) 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с помощью метода RT-PCR и набора реагентов с обратной транскриптазой Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Германия) и использованием  $10 \mu\text{M}$  р(dN)8 рандомных гексамерных праймеров (TIB MOLBIOL, Германия). Перед транскрипцией РНК денатурировали в течение 5 мин. при  $65^{\circ}\text{C}$  с последующим охлаждением на льду. Обратная транскриптаза Omniscript была инактивирована при нагреве реакционной смеси в течение 5 мин. при  $93^{\circ}\text{C}$ . кДНК хранилась при  $-20^{\circ}\text{C}$  до RT-qPCR-анализа. кДНК разводили 1:5 перед использованием в качестве ПЦР-матрицы.

При проведении ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии генов IL6 и NFkB1 использовали систему ABI Prism (Applied Biosystems, США), включающую готовые праймеры и TaqMan зонды. Зонды TaqMan были мечеными флуоресцентным красителем FAM 5'-(6-карбоксихлорофлуоресцеин) с гасителем красителя TAMRA (6-карбокситетраметилпродамин) на тимидиновой основе вблизи 3'-конца. Реакционная смесь содержала: ПЦР-буфер [200 мМ Трис-HCl (pH 8,4), 500 мМ KCl], 4,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ dNTP, 0,5 U платиновая Taq ДНК-полимераза (Invitrogen, Германия), 0,2 мкМ каждого праймера, 120 нМ специфического зонда TaqMan и 1 мкМ 6-карбоксихлорофлуоресцеина (Molecular Probes, Нидерланды). В качестве матрицы для ПЦР использовали 2 мкл предварительно разбавленной кДНК в конечном объеме 25 мкл. Условия цикла были следующими: первичная денатурация  $94^{\circ}\text{C}$  — 3 мин; 45 циклов:  $94^{\circ}\text{C}$  — 20 с, отжиг и элонгация праймера при температуре, специфичной для каждого гена, в течение 30 с. При определении экспрессии каждого гена ПЦР-РВ проводили трехкратно. В качестве референсного использовали ген ACTB.

Для проведения ПЦР реального времени использовали термоциклер Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США), специализированное программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1).

Относительная экспрессия генетических локусов вычислялась следующим образом:

– рассчитывали медиану Ct по трем повторам для целевого локуса и референсного ACTB;

– рассчитывали величину  $\Delta Ct$  по стандартному методу [10];  
 – определяли относительную экспрессию генетического локуса (RE) по формуле  $2^{-\Delta Ct}$ .

Вывод об изменении экспрессии гена делали, сравнивая показатели относительной экспрессии генетических локусов в опухолевой и условно здоровой ткани. Для этого вычисляли медиану REоп опухолевых образцов и медиану REк контрольных (условно здоровая ткань) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной экспрессии генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани матки:  $K=RE_{оп}/RE_{к}$ .

Исследование было одобрено Локальным независимым этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 6 от 12 ноября 2019 г.). Все пациенты клинической группы подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

Принципы расчета размера выборки: размер выборки рассчитывали для статистической мощности 80%, нормальность распределения вариант в выборке оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США). Результаты представлены в виде медианы, межквартильного диапазона между 25 и 75 перцентилем [Q25-Q75], средневыворочного значения и ошибки средней. В работе использованы методы описательной статистики — оценка центральной тенденции, размаха, вариабельности. По методу Каплана-Мейера оценивали функцию выживаемости. Метод позволил оценить долю пациентов, у которых не произошло летального исхода и вероятность отсутствия события (остаться в живых) к определенному моменту времени от начала наблюдения (операции). Такую вероятность называют выживаемостью, функцию зависимости выживаемости от времени — функцией выживаемости. Графическим представлением метода Каплана-Мейера являются кривые выживаемости: по оси ординат откладывают вероятность наступления событий, а по оси абсцисс — время. Кривая выживаемости представляет собой серию горизонтальных, снижающихся ступеней, величина снижения которых отражает кумулятивную долю пациентов, у которых к конкретному моменту времени летальный исход не произошел. В работе с помощью логистического метода регрессии Кокса проведен ана-

лиз влияния экспрессии генов (предикторы) на выживаемость больных в течение пяти лет после операции. Стандартизированный коэффициент регрессии  $\beta$  (Beta) отражал кратность соотношения между вероятностью наступления летального исхода и изменением величины предиктора на условную единицу. Размер условной единицы зависит от дисперсии или разброса анализируемых показателей. Между стандартизированным коэффициентом регрессии  $\beta$  и вероятностью события пропорциональная связь. Статистическая значимость отличия стандартизированного коэффициента регрессии  $\beta$  от нуля (отсутствие влияния) оценивалась по статистике Вальда (Wald) и доверительной вероятности  $p$ . Чем выше значение статистики Вальда, тем ниже значение  $p$ . Отношение шансов или  $\exp(B)$  позволяла определить, насколько изменяется риск события при наличии предиктора. Если  $\exp(B) > 1$ , то предиктор повышал вероятность наступления события (летального исхода), а если  $\exp(B) < 1$ , то предиктор имел протективное влияние на выживаемость.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди пациентов эпидемиологической группы отмечалось следующее распределение по стадиям болезни: 1 стадия — 13 (9,3%), 2 стадия — 50 (35,7%), 3 стадия — 44 (31,4%) и 4 стадия — 33 (23,6%) больных. Методом таблиц жизни 15-летний период наблюдения был разделен на 12 интервалов по 1,4 года. На этапе от 2,8 до 4,2 лет процентная доля выживших пациентов составила 79,3%, а от 4,2 до 5,6 лет — от 74,3%. За 10 лет доля выживших соответствовала 52,1%.

В клинической группе 1 стадия рака ОСЖ имела место у 3 (12%), 2 стадия — у 12 (48%), 3 стадия — у 6 (24%) и 4 стадия — у 4 (16%) больных.

Метод Каплана-Мейера позволил оценить динамику кумулятивной выживаемости пациентов при продолжительном наблюдении. Вероятность того, что больной раком ОСЖ переживет первый год после постановки диагноза, составляла 95,7%, три года — 82,4%, пять лет — 70,9% и 10 лет — 31,2% (рис. 1).

Общая выживаемость больных раком ОСЖ зависела от стадии заболевания ( $\chi^2=48,2$ ;  $p<0,0001$ ) (рис. 2). При 1 стадии рака ОСЖ медиана составила 10,4 года (межквартильный диапазон 9,8-13,2), при 2 стадии — 8,8 года (межквартильный диапазон 7,9-11,7), 3 стадии — 5,6 года (межквартильный диапазон 3,8-7,9 года) и при 4 стадии — 2,4 года (1,7-6,6 года).

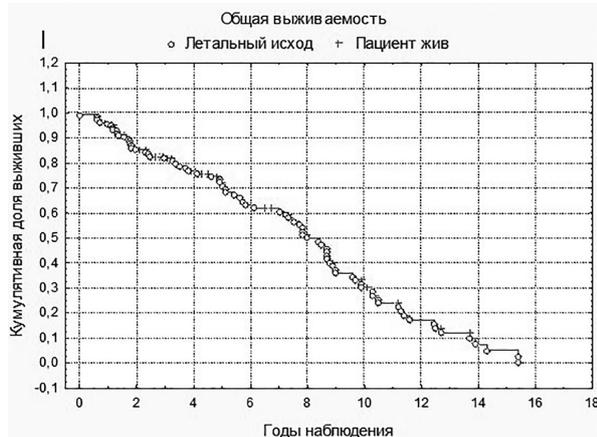


Рис. 1. Динамика общей выживаемости больных раком ОСЖ по методу Каплана-Мейера

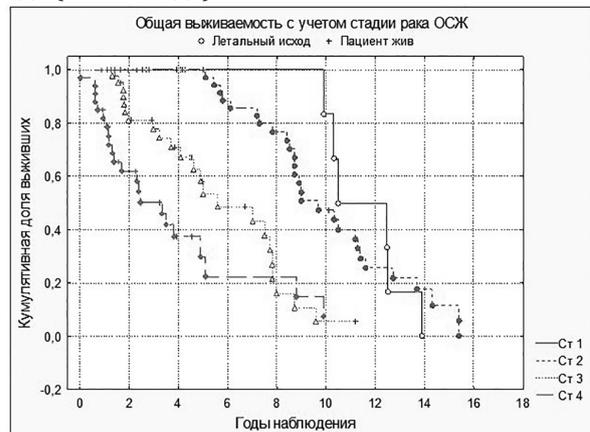


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов с раком ОСЖ с учетом стадии заболевания по методу Каплана-Мейера

В эпидемиологической группе чаще наблюдались такие признаки, как пожилой возраст (старше 65 лет) (45%), курение (37,1%), сиалоаденит в анамнезе (24,3%), токсичные вещества в профессиональной деятельности (сотрудники салонов красоты, парикмахеры, работники, контактирующие с никелевой и силиконовой пылью) (20%).

Активация экспрессии генов позволяет опухолевым клеткам контролировать собственную структуру и функцию, являясь основой дифференцировки, адаптации и морфогенеза [25]. С помощью генетических исследований в клинической группе были выявлены особенности экспрессии генов IL6 и NFKB1 в опухолевых клетках рака ОСЖ. Величины относительной экспрессии генов в опухолевых клетках ОСЖ по сравнению с условно здоровой тканью у пациентов клинической группы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Относительная экспрессия генов (К) в опухолевых клетках ОСЖ по сравнению с условно здоровой тканью

Ген	Медиана К (REоп/REк)	Межквартильный диапазон [25-75]	p
IL6	5,7	4,1-6,8	0,00001
NFKB1	7,9	6,2-8,9	0,00001

При сравнительном анализе уровней экспрессии генов в опухолевых образцах ткани, по сравнению с условно здоровой тканью, установлено повышение ( $p < 0,05$ ) относительного показателя как для гена IL6 (в 5,7 раза), так и для гена NFKB1 (в 7,9 раза).

Далее было изучено влияние экспрессионной активности изучаемых генов в опухолевой ткани, а также их сочетанного изменения на общую выживаемость пациентов с раком ОСЖ. Это позволило провести оценку прогностической значимости изменения функциональной активности каждого гена, так и их совокупности. Для выполнения этой задачи проводили регрессионный анализ Кокса.

Наиболее выраженное прямое влияние на летальность больных раком ОСЖ оказывало усиление экспрессионной активности гена NFKB1, а также сочетанное повышение экспрессии одновременно генов NFKB1 и IL6 (табл. 2).

Таблица 2

Параметры регрессионного анализа Кокса влияния экспрессии генов NFKB1 и IL6 на общую выживаемость больных раком ОСЖ, скорректированные по стадии заболевания и полу пациентов

Показатели	Влияние относительной экспрессии гена	Влияние экспрессии гена с учетом коварианты стадии рака	Влияние экспрессии гена с учетом коварианты стадии и пола
<b>NFKB1</b>			
$\beta$ -стандартизированный показатель, $M \pm m$	2,79 $\pm$ 0,46	2,12 $\pm$ 0,51	2,41 $\pm$ 0,46
exp(B)	7,2	6,5	6,3
Wald (p)	21,1 (p<0,001)	18,13 (p<0,001)	15,74 (p<0,001)
$\chi^2$ (p)	18,13 (p<0,001)	15,04 (p<0,001)	13,25 (p<0,001)
<b>IL6</b>			

$\beta$ -стандартизированный показатель, $M \pm m$	1,61 $\pm$ 0,38	0,75 $\pm$ 0,52	0,61 $\pm$ 0,55
exp(B)	3,4	2,1	1,8
Wald (p)	4,0 (p=0,002)	2,4 (p=0,09)	1,9 (p=0,18)
$\chi^2$ (p)	5,2 (p=0,03)	1,9 (p=0,11)	1,5 (p=0,16)
<b>NFKB1* IL6</b>			
$\beta$ -стандартизированный показатель, $M \pm m$	3,47 $\pm$ 0,48	3,07 $\pm$ 0,60	2,79 $\pm$ 0,55
exp(B)	9,5	7,6	6,9
Wald (p)	23,0 (p<0,001)	20,3 (p<0,001)	18,9 (p<0,001)
$\chi^2$ (p)	19,6 (p<0,001)	14,5 (p<0,001)	14,1 (p<0,001)

Поправка на коварианты (стадия рака и пол больных) не изменяли статистическую значимость влияния экспрессионной активности гена NFKB1 на выживаемость пациентов. Напротив, в отношении влияния экспрессии гена IL6 в опухолевых клетках коварианты снижали предикторную значимость фактора. Так, при учете стадии заболевания, стадии и пола, значения  $\beta$ -стандартизированного показателя (0,75 $\pm$ 0,52 и 0,61 $\pm$ 0,55 соответственно) и exp(B) (2,1 и 1,8 соответственно) при изучении влияния экспрессии гена IL6 на выживаемость снижались с потерей статистической значимости ( $p > 0,05$ ) и снижением критерия Вальда по сравнению с оценкой влияния фактора без учета ковариант ( $\beta$ -стандартизированный показатель=1,61 $\pm$ 0,38, exp(B)=3,4). То есть стадия заболевания и экспрессия гена IL6 совместно (зависимо) изменяли общую выживаемость, параметры регрессионного анализа характеризовали ослабление влияния гена IL6 на течение болезни при учете стадии заболевания.

Средняя величина  $\beta$ -стандартизированного показателя с ошибкой средней (2,79 $\pm$ 0,46) имела высокое значение (табл. 2), что отражало высокую силу прямого влияния экспрессии гена NFKB1 на выживаемость больных раком ОСЖ. Повышение экспрессии гена NFKB1 усиливало риск летального исхода больного с раком ОСЖ в 7,2 раза (exp(B)=7,2). При учете стадии заболевания риск летального исхода при наличии данного признака несколько снижался, но все равно был высоким (exp(B)=6,5). Следовательно, усиление экспрессии гена NFKB1 в опухолевой ткани по сравнению с условно здоровой тканью относилось к независимым предикторам, способствующим прогрессированию заболевания с летальным исходом. Статистическую значимость влияния гена оценивали по статистике Вальда. Доверительная вероятность p (Wald) составила 0,000004, то есть изучаемая независимая переменная вносила значимый вклад в предсказательную способность регрессионной модели.

Влияние экспрессии гена IL6 было слабее по сравнению с геном NFKB1, хотя одновременное повышение экспрессии двух генов приводило к усилению предикторной значимости генетических факторов для прогноза выживаемости больных после операции. Так, при анализе влияния одновременно двух факторов — экспрессии генов NFKB1 и IL6 — на общую выживаемость больных отмечалось повышение значения  $\beta$ -стандартизи-

рованного показателя ( $3,47 \pm 0,48$ ) и  $\text{exp(B)}$  (9,5) по сравнению с однофакторным анализом и учетом экспрессии отдельно гена NFkB1 ( $\beta$ -стандартизированный показатель =  $2,79 \pm 0,46$ ,  $\text{exp(B)} = 7,2$ ) и гена IL6 ( $\beta$ -стандартизированный показатель =  $1,61 \pm 0,38$ ,  $\text{exp(B)} = 3,4$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам рандомизированных контролируемых исследований общая трехлетняя выживаемость после комбинированной терапии рака ОСЖ составляет около 85%, пятилетняя — 74-79% [15, 16]. В нашем исследовании по результатам статистических данных онкологического регистра Ростовской области были выявлены сходные величины общей выживаемости для больных раком ОСЖ. Так, общая кумулятивная выживаемость пациентов при раке ОСЖ за первый год после постановки диагноза составляла 95,7%, за три года — 82,4%, за пять лет — 70,9% и за 10 лет — 31,2%. Отсутствие различий можно объяснить использованием рандомизированного подхода в исследовании, то есть анализом результатов течения заболевания всех пациентов Ростовской области после постановки диагноза рака ОСЖ, начиная с 2002 года.

По данным американского онкологического регистра, пятилетняя выживаемость больных со злокачественными новообразованиями СЖ находится в прямой зависимости от стадии рака: при I стадии — это 96%, II — 77%, III — 73%, а при IV — 37% [17]. В нашем исследовании с помощью метода Каплана-Мейера, основанного на анализе вероятности наступления летальных исходов во времени, был использован не частотный, а временной подход к изучению. В результате были установлены значения медианы дожития пациентов с различными стадиями заболевания, что расширило сведения о выживаемости больных раком ОСЖ на когортном уровне.

На современном этапе открыты группы молекулярно-генетических факторов, которые экспрессируются секреторными, миоэпителиальными, гладкомышечными и эпителиальными клеткам больших слюнных желез [18]. Иммуногистохимические исследования проводятся наряду с генетическими при оценке экспрессии соответствующих генов, обеспечивающих секрецию белковых факторов в слюнных железах. Однако в опухолевых клетках профиль экспрессии белковых факторов и генов различных сигнальных путей изменяется. Молекулярно-генетические сдвиги в опухолевой ткани могут обеспечивать различное течение злокачественного заболевания и иметь прогностическое значение для оценки риска развития летальных исходов больных [19, 20].

Как известно, транскрипция является частью экспрессии генов и заключается в построении РНК по комплементарной ей ДНК. Еще одним этапом экспрессии выступает трансляция или построение белков по информационной РНК. В результате экспрессии генов наследственная информация от генов переходит к белкам. Ген NFkB1 кодирует синтез универсального фактора транскрипции NF-kB1, регулирующего экспрессию генов клеточного цикла, иммунного ответа и апоптических процессов [21, 22]. В норме активность гена NFkB1 находится под строгим контролем, но в раковых клетках ввиду мутаций генов контроль нарушается [23].

Экспрессия гена NFkB1 активно изучалась в раковых клетках гематологических опухолей [24],

раке слизистой оболочки полости рта [25,26], опухолей головы и шеи [27], раке желудка [28], множественной миеломе [29]. Сведения об экспрессии гена NFkB1 как универсального регулятора транскрипции посредством синтеза соответствующего белка в опухолевых клетках при раке ОСЖ отсутствуют. В нашем исследовании было установлено, что относительная экспрессия гена NFkB1 в опухолевых клетках ОСЖ по сравнению с условно здоровой тканью составила 7,9 [межквартильный диапазон 6,2-8,9], что свидетельствовало о высокой экспрессионной активности гена. Усиление экспрессии гена NFkB1 в опухолевых клетках при злокачественном поражении ОСЖ имело независимое от стадии заболевания влияние на выживаемость пациентов. Следовательно, доказанным прогностическим фактором, определяющим вероятность развития летального исхода, у больных раком ОСЖ выступает экспрессионный профиль гена NFkB1 в опухолевой ткани, что необходимо учитывать при формировании прогноза заболевания.

Цитокины являются одними из участников регуляции биологического роста опухолей и способности клеток к пролиферации [11]. При опухолевых заболеваниях среди цитокинов важную роль отводят ИЛ-6 [11, 12]. В исследовании Andreassen S. et al. было установлено, что сигнальный путь интерлейкин-6/JAK-киназа и STAT3 имели решающее значение для активации онкогена при формировании злокачественных опухолей СЖ, но также могут быть активными и в доброкачественных новообразованиях, таких как плеоморфная аденома [14]. Опухолевые клетки способны синтезировать цитокины в качестве аутокринных факторов роста. Так, клетки злокачественных опухолей секретируют ИЛ-6, высокая концентрация данного провоспалительного медиатора является препятствием для проведения эффективной иммунотерапии [13]. Усиленная секреция ИЛ-6 опухолевыми клетками способствует активации транскрипционных механизмов, ответственных за пролиферацию и рост злокачественных клеток [14]. Активация выработки ИЛ-6 приводит к супрессии Т-клеточного звена иммунитета, что клинически выражается иммунодефицитом и способствует развитию злокачественного процесса в органе [13]. В работе в сравнении с условно здоровой тканью установлено повышение ( $p < 0,05$ ) относительного показателя экспрессии гена IL6 в опухолевых клетках у больных раком ОСЖ в 5,7 раза.

Фактор транскрипции NF-kB наряду с регуляцией апоптоза участвует в активации воспаления в ткани посредством влияния на NF-kB-регулируемые медиаторы воспаления — интерлейкины (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18), хемокины [30]. И наоборот, усиленная секреция ИЛ-6 опухолевыми клетками способствует активации транскрипционных механизмов, ответственных за пролиферацию и рост злокачественных клеток [31]. В нашем исследовании было доказано, что выраженность экспрессии гена IL6 в опухолевых клетках способствовала усилению функциональной активации гена транскрипции NFkB1.

Таким образом, анализ наших данных показал возможность использования комплексной оценки экспрессии генов NFkB1 и IL6 в клетках опухолевых образцов ткани рака ОСЖ, полученных при операции, для прогноза выживаемости больных в отдаленный период после хирургического лечения.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Повышение экспрессионной активности транскрипционного гена NFκB1 в опухолевой ткани является неблагоприятным фактором, способствующим снижению выживаемости больных раком околоушной слюнной железы. Экспрессия провоспалительного гена интерлейкина-6 в опухолевой ткани у больных раком околоушной слюнной железы усиливала функциональную активность транскрипционных процессов в опухоли, но самостоятельной прогностической значимости не имела. Одновременный учет величин экспрессии

генов NFκB1 и IL6 в опухолевых клетках приводит к усилению предикторной значимости генетических факторов для прогноза выживаемости больных раком ОСЖ после операции.

**Источник финансирования**

Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

**Конфликт интересов**

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Epigenetic markers of esophageal cancer: DNA methylation / O. I. Kit, D. I. Vodolazhskiy, E. N. Kolesnikov, N. N. Timoshkina // *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry*. – 2017. – Vol. 11 (1). – P. 55-61.
2. Дрегалкина, А. А. Частота встречаемости доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желёз / А. А. Дрегалкина, А. А. Богданова, С. А. Мартынова // *Актуальные проблемы современной науки*. – 2017. – № 5 (96). – С. 191-3.
3. Нуоров, Р. Р. Доброкачественные и злокачественные новообразования околоушных слюнных желез / Р. Р. Нуоров, О. Н. Абдухимов, Д. Б. Юсупова // *International scientific review*. – 2017. – № 8 (39). – С. 71-3.
4. Комбинированное лечение рака околоушной слюнной железы / А. С. Балканов, О. А. Быченков, А. М. Сипкин, Л. Е. Гаганов // *Альманах клинической медицины*. – 2017. – № 45 (4). – С. 309-13.
5. Dysregulation of NF-κB in glandular epithelial cells results in Sjogren's-like features / X. Wang, A. Shaalan, S. Liefers [et al.] // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13 (8). – P. e0200212.
6. NF-κB Expression and Outcomes in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis / D. Wu, L. Zhao, L. Huang [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol. 94 (40). – P. e1687.
7. Harada, K. PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors / K. Harada, T. Ferdous, Y. Ueyama // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18. – P. 156.
8. Prognostic factors for radiotherapy in parotid carcinoma – own material / S. Lalova, V. Parvanova, K. Popov, I. Gergov // *Rentgenologiya i Radiologiya*. – 2017. – Vol. 56 (4). – P. 255-60.
9. Salivary and serum interleukin-6 levels in oral premalignant disorders and squamous cell carcinoma. diagnostic value and clinicopathologic correlations / T. Dineshkumar, B. K. Ashwini, A. Rameshkumar, P. Rajashree // *Asian Pac. J. Cancer Prev*. – 2016. – Vol. 17. – P. 4899-4906.
10. Дифференциальная экспрессия 15-ти генов в глиальных опухолях различной степени злокачественности / О. И. Кит, А. А. Пушкин, Э. Е. Росторгуев [и др.]. – Текст : электронный // *Современные проблемы науки и образования*. – 2019. – № 5. – С. 66. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29039>.
11. Interleukin-6 in oral diseases: a review / L. Nibali, S. Fedele, F. D'Aiuto, N. Donos // *Oral Diseases*. – 2012. – Vol. 18 (3). – P. 236-243. – <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01867.x>
12. Selvam, N. P. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer / N. P. Selvam, J. Sadaksharam // *Asia Pac. J. Clin. Oncol*. – 2015. – Vol. 11. – P. 236-241. – <http://doi.org/10.1111/ajco.12330>.
13. Lee, S. K. Prognostic value of expression of molecular markers in adenoid cystic cancer of the salivary glands compared with lymph node metastasis: a retrospective study / S. K. Lee, M. S. Kwon, Y. S. Lee // *World J Surg Oncol*. – 2012. – Vol. 10. – P. 266. – <http://doi.org/10.1186/1477-7819-10-266>.
14. Activation of the interleukin-6/Janus kinase/STAT3 pathway in pleomorphic adenoma of the parotid gland / S. Andreasen, M. Hamilton, T. Morten, G. Lennart // *APMIS*. – 2015. – Vol. 123 (8). – P. 706-15. – <http://doi.org/10.1111/apm.12407>.
15. Long-term outcomes and quality of life of 186 patients with primary parotid carcinoma treated with surgery and radiotherapy at the Daniel den Hoed Cancer Center / A. Al-Mamgani, P. Rooij, G. M. Verduijn, C. A. Meeuwis // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. – 2012. – Vol. 84 (1). – P. 189-195. – <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.11.045>.
16. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland treated by surgery and postoperative radiation therapy. Clinicopathologic correlates of outcome / A. M. Chen, V. H. Lau, D. G. Farwell, Q. Luu // *Laryngoscope*. – 2013. – Vol. 123 (12). – P. 3049-55. – <https://doi.org/10.1002/lary.24238>.
17. Salivary gland cancer overview / American Cancer Society. – 2012. – <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003074.pdf>.
18. Shah, J. P. Head and neck surgery and oncology / J. P. Shah, S. G. Patel, B. Sing // *Salivary Tumors*. – 2008. – P. 240-250.
19. Бова, Ф. С. Патогенетическая значимость перитуморальных тканевых, гипоксия-зависимых и молекулярно-генетических механизмов развития раннего рецидивирования, мониторинг и оптимизация прогнозирования заболевания у больных локализованным раком предстательной железы : автореф. ... дис. докт. наук. – Ростов-на-Дону. – 39 с.
20. Бова, Ф. С. Локализованный рак предстательной железы: транскрипторные механизмы раннего рецидивирования // *Врач*. – 2019. – № 2 (30). – С. 41-3. – <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-02-07>.
21. Транскриптомная активность эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки / О. И. Кит, Д. И. Водолазский, Д. С. Кутилин [и др.] // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. – 2016. – № 115. – С. 294-304.
22. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-κB and JNK / T. Hagemann, J. Wilson, H. Kulbe, [et al.] // *J. Immunol*. – 2005. – Vol. 2 (175). – P. 1197-1205. – <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.1197>.
23. Staudt, L. M. Oncogenic activation of NF-κB // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2010. – Vol. 2 (6). – P. A000109. – <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000109>.
24. Овсепян, В. А. Возможная роль полиморфизма гена NFκB1 в патогенезе хронического лимфолейкоза / В. А. Овсепян, А. А. Шубенкина, Е. Н. Зотина // *Вестник гематологии*. – 2017. – Vol. 2 (13). – P. 61-62.
25. 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 [и др.] // *Кубанский научный медицинский вестник*. – 2017. – № 1 (162). – С. 64-68.
26. 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 [и др.] // *Злокачественные опухоли*. – 2016. – № 4S1 (21). – С. 195-6.

27. Li, L. Genetic association between nfkb1a and nfkb1 gene polymorphisms and the susceptibility to head and neck cancer: a meta-analysis / L. Li, Z.-T. Zhang // Disease markers. – 2019. – № 2019. – P. 6523837. – <http://doi.org/10.1155/2019/6523837>.
28. Копийность генов GSTP1, NFKB1 и локуса HV2 митохондриальной ДНК при некоторых гистологических типах рака желудка / О. И. Кит, Д. И. Водолажский, Д. С. Кутилин [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1. – С. 918-21.
29. Voce. D. J. NFKB1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor / D. J. Voce, A. M. Schmitt, A. Uppal // Oncogene. – 2014. – <http://doi.org/10.1038/onc.2014.211>.
30. Karin, M. Nuclear factor-κB in cancer development and progression // Nature. – 2006. – Vol. 441 (7092). – P. 431-6.
31. Yoshimura, A. Singal transduction of inflammatory cytokines and tumor development // Cancer Sci. – 2006. – Vol. 97. – P. 439-47. – <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00197.x>.

**Сведения об авторах**

Енгибарян Марина Александровна, д.м.н., профессор  
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
ORCID: 0000-0001-7293-2358  
Email: rnioi@list.ru

Костоев Иса Султангирейевич  
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
ORCID: 0000-0003-2026-2879  
Email: kostoev.isa@gmail.com

Максимов Алексей Юрьевич, д.м.н., профессор  
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
ORCID: 0000-0002-1397-837X  
Email: alald@inbox.ru

Проходная Виктория Александровна, д.м.н., профессор  
ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
ORCID: 0000-0002-8173-9979  
Email: ms.victoria111@mail.ru

Кононенко Владимир Иванович, д.м.н., доцент  
ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
ORCID: 0000-0002-8400-8063  
Email: 941831@mail.ru

Максюков Станислав Юрьевич, д.м.н., профессор  
ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
ORCID: 0000-0001-7823-8906,  
Email: kafstom2.rostgmu@yandex.ru

**Information about the authors**

Marina A. Engibaryan, PhD, Professor  
National Medical Research Center of Oncology,  
Rostov-on-Don, Russia  
ORCID: 0000-0001-7293-2358  
Email: rnioi@list.ru

Isa S. Kostoev  
National Medical Research Center of Oncology,  
Rostov-on-Don, Russia  
ORCID: 0000-0003-2026-2879  
Email: kostoev.isa@gmail.com

Aleksej Ju. Maksimov, PhD, Professor  
National Medical Research Center of Oncology,  
Rostov-on-Don, Russia  
ORCID: 0000-0002-1397-837X  
Email: alald@inbox.ru

Viktorija A. Prohodnaja, PhD, Professor  
Rostov State Medical University,  
Rostov-on-Don, Russia  
ORCID: 0000-0002-8173-9979  
Email: ms.victoria111@mail.ru

Vladimir I. Kononenko, PhD, Associate Professor  
Rostov State Medical University,  
Rostov-on-Don, Russia  
ORCID: 0000-0002-8400-8063  
Email: 941831@mail.ru

Stanislav Ju. Maksjukov, PhD, Professor  
Rostov State Medical University,  
Rostov-on-Don, Russia  
ORCID: 0000-0001-7823-8906,  
Email: kafstom2.rostgmu@yandex.ru