

ОЦЕНКА ВНЕКЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА ПРИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГОРТАНИ

**И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Л.В. Спирина, О.В. Черемисина, О.В. Панкова,
К.Ю. Меньшиков**

*ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск
634050, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

Проведено исследование экспрессии генов матричных металлопротеиназ, активности протеасом и кальпаинов при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани. Показано достоверное увеличение экспрессии генов ММП-1 и ММП-14 при сравнении диспластически измененного эпителия с опухолевой тканью рака гортани. Кроме того, обнаружено, что активность протеасом и кальпаинов в ткани опухоли гортани были достоверно выше по сравнению с таковыми в ткани при дисплазии слизистой оболочки гортани. Полученные результаты свидетельствуют о том, что внеклеточные и внутриклеточные протеазы играют важную роль в развитии рака гортани. Выявленные особенности патогенеза диспластических процессов и рака гортани в дальнейшем позволят выделить дополнительные объективные критерии, которые позволят прогнозировать риск развития злокачественного новообразования.

Ключевые слова: матричные металлопротеиназы, протеасомы, кальпаины, дисплазия, рак гортани.

ASSESSMENT OF EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR PROTEOLYSIS IN PRETUMOR AND TUMOR DISEASES OF THE LARYNX

*I.V. Kondakova, G.V. Kakurina, L.V. Spirina, O.V. Cheremisina, O.V. Pankova, K.Yu. Menshikov
Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

The expression of matrix metalloproteinase (MMP) genes and activity of proteasomes and calpains were studied in patients with precancerous laryngeal lesions and laryngeal cancer. A significant increase in MMP-1 and MMP-14 gene expression was shown in laryngeal cancer tissue compared to that observed in dysplastic laryngeal tissue. Furthermore, the activity of proteasomes and calpains was significantly higher in laryngeal cancer tissue than in dysplastic laryngeal tissue. The results obtained indicate that extracellular and intracellular proteases play an important role in the development of laryngeal cancer. The detected features of pathogenesis of laryngeal dysplasia and laryngeal cancer will allow the additional objective criteria for predicting the risk for malignancy to be identified.

Key words: matrix metalloproteinase, proteasomes, calpains, dysplasia, laryngeal cancer.

Рак гортани (РГ) продолжает занимать лидирующие позиции среди злокачественных опухолей верхних дыхательных путей, составляя 65–70 %. В общей структуре онкологической заболеваемости на РГ приходится 1,4 %. В 2012 г. в России зарегистрирован 6 601 первичный случай рака гортани. Несмотря на доступность органа для визуального и инструментального исследования, эта опухоль по-прежнему редко выявляется на ранних стадиях. На долю РГ I стадии пришлось 10,6 % впервые выявленных случаев заболевания, тогда как распространенный процесс – рак гортани III и IV

стадий – был выявлен у 46,8 % и 17 % больных соответственно [9].

Эпидемиологические исследования, проведенные в различных странах, показали, что практически в 60 % случаев РГ развивается на основе различных хронических заболеваний, составляющих группу облигатного предрака: хронический гиперпластический ларингит (ХГЛ) и папилломатоз гортани (ПГ), дискератоз [8, 12]. Частота ХГЛ в популяции варьирует в пределах 30–65 %, а вероятность малигнизации данного заболевания в сроки от 6 мес до 7 лет с момента установки

диагноза составляет 60–65 %. При папилломатозе злокачественное перерождение возможно у 8–20 % больных, обычно оно реализуется в течение 10 и более лет [1, 7].

В настоящее время наличия очагов дисплазии в эпителии гортани недостаточно для включения пациента в группу онкологического риска, поскольку неоднородность диспластических изменений внутри подгруппы не позволяет адекватно определить сроки динамического наблюдения и методы лечения – необходимы дополнительные более определенные критерии прогноза развития предраковых изменений [22]. В литературе активно обсуждается возможность использования определения матриксных металлопротеаз (ММП), которые являются внеклеточными протеазами и участвуют практически во всех этапах опухолевой прогрессии [2, 4, 11, 14, 15]. Показана важность определения ММП и их тканевых ингибиторов в качестве потенциальных прогностических маркеров [3, 17, 21]. Кроме того, в развитии плоскоклеточного рака области головы и шеи важную роль играют внутриклеточные протеазы, такие как протеасомы и кальпаины [9, 10, 13, 16]. Однако отсутствуют публикации о роли ММП, протеасом и кальпаинов при злокачественной трансформации в слизистой оболочке гортани, а также о практическом использовании их определения для выявления больных с диспластическими процессами с высоким онкологическим риском по РГ.

В связи с этим **целью исследования** было изучение экспрессии генов матриксных металлопротеиназ, активности протеасом и кальпаинов при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани.

Материал и методы

В работе представлены результаты исследования 51 больного раком гортани (стадии $T_{1-4}N_{0-3}M_0$) в возрасте от 31 до 77 лет и 12 человек с предопухолевыми заболеваниями гортани (ХГЛ и папилломатоз) в возрасте от 38 до 69 лет, находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НИИ онкологии» г. Томска. Исследование проходило с разрешения локального этического комитета института, было получено информированное согласие пациентов. Группы больных были сопоставимы по полу, возрасту и сопутствующим заболеваниям. Во всех случаях опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточного рака различной степени диффе-

ренцировки. Все больных раком гортани до начала исследования не получали специального лечения.

При выполнении видеоларингоскопии проводился забор материала из участков опухоли и неизменной слизистой оболочки на расстоянии примерно 2 см от границы опухоли для комплексного морфологического исследования с целью верификации диагноза и для исследования экспрессии генов ММП, химотрипсинподобной активности протеасом и активности кальпаинов. Для подтверждения отсутствия патологических изменений в данных участках выполнялись мазки-отпечатки. У пациентов с предопухолевыми заболеваниями забор материала осуществлялся из измененных участков, а также из нормальной слизистой на расстоянии примерно 2 см от патологического процесса. Биопсийный материал замораживали в жидком азоте, перевозили и хранили при температуре -80°C .

Выделение суммарной клеточной РНК проводили с помощью набора Illustra RNeasy Mini Kit (GE Healthcare). Затем РНК очищали от примеси ДНК с помощью ДНКазы. Для оценки качества суммарную клеточную РНК анализировали электрофорезом в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидия бромид. Качество и количество РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000, соотношение A_{260}/A_{280} составляло не менее 1,8–2,0.

Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции РНК в присутствии 0,5 мкг универсального праймера oligo(dT)16 и M-MuLV обратной транскриптазы (Биосан, Новосибирск). Для контроля прохождения реакции обратной транскрипции с полученным продуктом и неретвертированной РНК проводили ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности гена GAPDH.

Для анализа уровня экспрессии генов ММП-1, -2, -9, -14 использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) с праймерами производства фирмы Sintol (Москва) [6]. Реакционная смесь для проведения ПЦР-реакции содержала дНТФ 2,5 мМ, 10хПЦР-буфер, MgCl_2 25 мМ, смесь праймеров 10 пкмоль/мкл, флуоресцентный зонд 10 пкмоль/мкл, Tag-ДНК-полимеразу 5 Е/мкл, образец кДНК, деионизированную воду. Реакцию проводили на амплификаторе Rotor-gene 6000 (Австралия). Результаты выражали в услов-

ных единицах (уровень экспрессии изучаемых генов по отношению к уровню экспрессии гена домашнего хозяйства). В качестве эндогенного внутреннего контроля, относительно которого проводили нормализацию продуктов амплификации исследуемых генов, был выбран ген «домашнего хозяйства» GAPDH. Изменение уровня количества мРНК в образце опухолевой ткани по отношению к неизменной ткани вычисляли по формуле: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [18].

Определение химотрипсинподобной активности протеасом и активности кальпаинов проводили в осветленных гомогенатах, для чего замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM трис-HCl буфера (pH=7,5), содержащего 2 mM АТФ, 5 mM хлорида магния, 1 mM дитиотреитола, 1 mM ЭДТА и 100 mM хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000g и 4°C. Химотрипсинподобную активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Sigma, США), утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеасом, на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм (Ben-Shahar S., 1999). Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом – MG132. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизует 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC [19]. Реакцию проводили, добавляя к 30 μ M Suc-LLVY-AMC (Sigma, США), растворенному в реакционной смеси, 5 μ l супернатанта и инкубируя при 25°C в течение 30 мин в присутствии или отсутствии 10 mM CaCl₂ и 50 μ M ингибитора N-ацетил-Leu-Leu-норлейцинала (Sigma, США). Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Активность кальпаинов определяли в пробах с 10 mM CaCl₂ и с ингибитором. За единицу активности принимали количество фермента, при котором гидролизует 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в

течение 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего, или как медиана с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий исследовали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования

Изучение экспрессии генов матриксных металлопротеиназ ММП-1, -2, -9, -14 в тканях злокачественных новообразований и диспластически измененного эпителия гортани показало, что исследуемые показатели определялись во всех образцах. При статистической обработке результатов было обнаружено, что уровни экспрессии исследуемых генов в опухолевой и неизменной ткани не различались, что, по-видимому, может говорить об увеличении деструктивного потенциала опухоли. Ранее было показано, что клетки карциномы экспрессируют индуктор экстраклеточных матриксных металлопротеиназ ЕММРIN, который, находясь на цитоплазматической мембране опухолевых клеток, может увеличивать продукцию ММП-2 и ММП-9 клетками микроокружения [5]. Возможно, такое влияние опухоли распространяется и на окружающую неизменную ткань.

Сравнительный анализ результатов ПЦР-РВ генов ММП-1, -2, -9 и -14 в ткани диспластически измененного эпителия и рака гортани показал наличие различий в их экспрессии (табл. 1). В группах с диспластическими изменениями эпителия и раком гортани T₁N₀M₀ стадии показаны значимые различия в экспрессии генов ММП-1, ММП-2 и ММП-14 (табл. 1).

Экспрессия гена ММП-1 ($p=0,016$) была почти в 3 раза выше в опухолевой ткани у больных РГ T₁N₀M₀ стадии, по сравнению с тканями больных с диспластическими изменениями эпителия, и сохраняла тенденцию к росту с увеличением размера первичного опухолевого очага. Значительно возрастал уровень экспрессии ММП-14 в тканях опухоли у пациентов РГ T₁N₀M₀ стадии ($p=0,007$) по сравнению с группой пациентов с диспластически измененным эпителием – разница составила 45%.

Далее уровень экспрессии ММП-14 возрастал с увеличением размера опухолевого узла. Экспрессия гена ММП-2 была выше в диспластически измененных тканях по сравнению с тканью рака гортани T₁N₀M₀ стадии; с увеличением стадии заболевания наблюдалось возрастание показателя.

Обсуждение

Высокие значения экспрессии генов ММП-1 и ММП-14 на ранних стадиях рака гортани, возможно, указывают на важную роль этих показателей в инициации и развитии злокачественного процесса, что согласуется с литературными данными [14, 15, 17, 20, 21]. Патогенез злокачественных заболеваний тесным образом связан не только с усилением внеклеточного протеолиза, но и с изменением состояния системы деградации белков внутри клетки. Протеасомы являются основным компонентом этой

системы, играя важную роль в процессах расщепления собственных белков клетки, и опосредуют процессы клеточного деления, дифференцировки, иммунного ответа и др. Результаты исследования химотрипсинподобной активности протеасом в опухолевой, диспластической и неизменной ткани гортани представлены в табл. 2. В группе больных раком гортани активность протеасом в опухоли была достоверно выше по сравнению с таковой в диспластической ткани. Также наблюдалось увеличение активности кальпаинов в ткани опухоли по сравнению с диспластической тканью. Выявленный факт позволяет сделать вывод об активации внутриклеточного протеолиза в ткани рака гортани как за счет протеасом, так и за счет кальпаинов. Стоит отметить, что функция последних в канцерогенезе плоскоклеточного рака до сих пор полностью не ясна.

Таблица 1

Сравнительная экспрессия генов матричных металлопротеиназ в опухолевой ткани и в диспластически измененном эпителии гортани

Показатели, у.е.	Диспластические процессы гортани	Опухолевая ткань T ₁ N ₀ M ₀	Опухолевая ткань T ₂₋₄ N ₁₋₃ M ₀	p
ММП-1	0,6 ± 0,37 n=8	1,76 ± 0,69 n=18	1,82 ± 0,597 n=10	p ₁ =0,016 p ₂ =0,05
ММП-2	1,64 ± 0,63 n=8	1,37 ± 0,15 n=21	1,65 ± 0,77 n=30	p ₁ =0,03 p ₂ =0,05
ММП-9	0,78 ± 0,21 n=8	1,57 ± 0,02 n=16	1,82 ± 0,24 n=11	p ₁ = 0,3 p ₂ =0,03
ММП-14	0,84 ± 0,21 n=11	1,22 ± 0,2 n=21	1,65 ± 0,09 n=30	p ₁ =0,007 p ₂ =0,002
GAPDH	2,09 ± 0,23 n=10	1,78 ± 0,49 n=20	1,86 ± 0,22 n=29	p ₁ =0,07 p ₂ =0,08

Примечание. p₁ – значимость различий между опухолевой тканью стадии T₂₋₄N₁₋₃M₀ и диспластическими процессами гортани, p₂ – значимость различий между опухолевой тканью стадии T₁N₀M₀ и диспластическими процессами гортани; n – количество пациентов в группе.

Таблица 2

Тотальная активность протеасом и кальпаинов в диспластически измененной и опухолевой тканях гортани

Вид ткани	n	Тотальная активность протеасом, 10 ³ Ед/мг белка	n	Общая активность кальпаинов, 10 ³ Ед/мг белка
Диспластически измененный эпителий	10	43,3 (31,5–56,4)	10	28,6 (13,5–39,4)
Опухолевая ткань	23	59,8 (37,2–120,0)*	10	125,7 (67,0–256,0)*

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с диспластически измененным эпителием (p<0,05); n – количество пациентов в группе.

Увеличение активности протеасом в ткани РГ по сравнению с гиперпластическими процессами, вероятно, связано со значительным повышением интенсивности клеточных процессов, многие участники которых являются субстратами протеасом: белки-регуляторы клеточного цикла, многие транскрипционные факторы, белки pRb и p53, ингибитор NF-κB IκB, белки, контролирующие активность каспаз, компоненты сигнальных путей [16]. Соответственно, происходит и усиление аппарата деградации белков. Полученные результаты, свидетельствующие о значительном повышении активности кальпаинов в опухолевой ткани по сравнению с гиперпластической, согласуются с данными N.O. Carragher et al. (2004) о повышении активности кальпаинов при трансформации клеток в клеточных культурах и позволяют сделать вывод о преимущественном участии кальпаинов в процессах, свойственных только злокачественным тканям [13].

Заключение

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что внеклеточные и внутриклеточные протеазы играют важную роль в развитии рака гортани. Показана целесообразность дальнейших исследований показателей протеолиза в тканях диспластически измененного эпителия и РГ с целью разработки показателей, важных для обнаружения заболевания на ранних стадиях рака данной локализации. Выявленные особенности патогенеза диспластических процессов и РГ в будущем помогут выделить дополнительные объективные критерии, которые позволят адекватно оценить онкологический риск и прогнозировать у больных развитие злокачественного новообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышев В.В., Андреев В.Г., Попучиев В.В., Ежов С.В. Современные аспекты изучения респираторного папилломатоза. Ч. 1. Этиология, патогенез, диагностика // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 5(35). С. 67–72.
2. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // Сибирский онкологический журнал. 2003. № 2. С. 62–70.
3. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Черемисина О.В., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А. Прогностическая значимость определения металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи // Онкохирургия. 2011. Т. 3, № 1. С. 17–22.
4. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В., Какурина Г.В., Чойнзонов Е.Л., Шишкин Д.А., Мухамедов М.Р. Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 как факторы метастазирования злокачественных новообразований головы и шеи // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54, № 5. С. 555–560.
5. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л. Патогенетическая значимость системы матриксных металлопротеиназ при плоскоклеточном раке головы и шеи // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 1 (43). С. 29–33.
6. Малахова Е.В., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Какурина Г.В., Меньшиков К.Ю. Экспрессия генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в тканях опухолей у больных раком гортани и гортаноглотки // Сибирский онкологический журнал. 2012. № 1 (49). С. 36–41.
7. Осипов В.Д. Роль неспецифических опухолевых маркеров и клинко-морфологических показателей в диагностике и лечении предрака и раннего рака гортани: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2006. 38 с.
8. Поддубный Б.К., Белоусова Н.В., Унгуадзе Г.В. Диагностическая и лечебная эндоскопия верхних дыхательных путей. М.: Практическая медицина, 2006. 256 с.
9. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2013. 232 с.
10. Спирина Л.В., Кондакова И.В. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе // Вопросы онкологии. 2008. № 6. С. 690–694.
11. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Шарова Н.П., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А. Активность и субъединичный состав протеасом в плоскоклеточных карциномах головы и шеи // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 1. С. 89–92.
12. Унгуадзе Г.В., Поддубный Б.К., Белоусова Н.В., Концевая А.Ю. Эндоскопическая диагностика и лазерная деструкция рака гортани // Современная онкология. 2003. Т. 7, № 3. С. 122–125.
13. Carragher N.O., Fonseca B.D., Frame M.C. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions // Neoplasia. 2004. Vol. 6. P. 53–73.
14. Chaudhary A.K., Singh M., Bharti A.C., Asotra K., Sundaram S., Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck // J. Biomed. Sci. 2010. Vol. 17. P. 10–18. doi: 10.1186/1423-0127-17-10.
15. Coussens L.M., Tinkle C.L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis // Cell. 2000. Vol. 103. P. 481–490.
16. Driscoll J.J., Minter A., Driscoll D.A., Burris J.L. The ubiquitin-proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies // Anticancer Agents Med. Chem. 2011. Vol. 11 (2). P. 242–246.
17. Katayama A., Bandoh N., Kishibe K. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis // Clin. Cancer Res. 2004. Vol. 10 (2). P. 634–640.
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. 2001. Vol. 25 (4). С. 402–408.
19. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // Br. J. Pharmacol. 2002. Vol. 135 (8). 1951–1958.
20. Stokes A., Joutsa J., Ala-Aho R., Pitchers M., Pennington C.J., Martin C., Premachandra D.J., Okada Y., Peltonen J., Grénman R., James H.A., Edwards D.R., Kähäri V.M. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma // Clin. Cancer Res. 2010. Vol. 16 (7). P. 2022–2035. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2525.
21. Yen C.Y., Chen C.H., Chang C.H., Tseng H.F., Liu S.Y., Chuang L.Y., Wen C.H., Chang H.W. Matrix metalloproteinases (MMP) 1 and MMP10 but not MMP12 are potential oral cancer markers // Biomarkers. 2009. Vol. 14 (4). P. 244–249. doi: 10.1080/13547500902829375.
22. Zhang H.K., Liu H.G. Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-year follow-up of laryngeal precancer-

ous lesions // *Acta Otolaryngol.* 2012. Vol. 132 (3). P. 325–328. doi: 10.3109/00016489.2011.642812.

Поступила 8.02.14

REFERENCES

1. Baryshev V.V., Andreev V.G., Popuchiev V.V., Ezhov S.V. Modern aspects of studding respiratory papillomatosis. Part I. Etiology, pathogenesis, diagnosis // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2009. № 5(35). P. 67–72. [in Russian]
2. Klishe E.V., Kondakova I.V., Chojnzonov E.L. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2003. № 2. P. 62–70. [in Russian]
3. Klishe E.V., Kondakova I.V., Chojnzonov E.L., Cheremisinina O.V., Chizhevskaja S.Ju., Shishkin D.A. Prognostic significance of determination of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors of patients with head and neck squamous cell carcinoma // *Onkologicheskij zhurnal.* 2011. Vol. 3, (1). P. 17–22. [in Russian]
4. Kondakova I.V., Klishe E.V., Savenkova O.V., Kakurina G.V., Chojnzonov E.L., Shishkin D.A., Muhamedov M.R. Matrix metalloproteinase 2 and 9 as the factor of head and neck tumor metastasis // *Biomedicinskaja himija.* 2008. Vol. 54 (5). P. 555–560. [in Russian]
5. Kondakova I.V., Klishe E.V., Savenkova O.V., Shishkin D.A., Chojnzonov E.L. Pathogenetic significance of the matrix metalloproteinase system in squamous cell head and neck cancer // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2011. № 1 (43). P. 29–33. [in Russian]
6. Malahova E.V., Kondakova I.V., Cheremisinina O.V., Kakurina G.V., Men'shikov K.Ju. Gene expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in tumor tissues of patients with laryngeal and laryngopharyngeal cancers // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2012. № 1 (49). P. 36–41. [in Russian]
7. Osipov V.D. Role of non-specific tumor markers and clinical-morphological parameters in diagnosis and treatment of precancer and early cancer of the larynx: Author's DSc thesis. Tomsk, 2006. 38 p. [in Russian]
8. Poddubnyj B.K., Belousova N.V., Ungiadze G.V. Diagnostic and therapeutic endoscopy of the upper respiratory tract. M.: Prakticheskaja medicina, 2006. 256 p. [in Russian]
9. The state of cancer care to the population of Russia in 2012. / Eds. A.D. Kaprin, V.V. Starinskij, G.V. Petrova. M., 2013. 232 p. [in Russian]
10. Spirina L.V., Kondakova I.V. Role of intracellular specific proteolysis in cancerogenesis // *Voprosy onkologii.* 2008. № 6. P. 690–694. [in Russian]
11. Spirina L.V., Kondakova I.V., Chojnzonov E.L., Sharova N.P., Chizhevskaja S.Ju., Shishkin D.A. Activity and subunit composition of proteasomes in head and cervical squamous cell carcinomas // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2010. Vol. 149 (1). P. 89–92. [in Russian]
12. Ungiadze G.V., Poddubnyj B.K., Belousova N.V., Koncevaja A.Ju. Endoscopic diagnosis and laser destruction of laryngeal cancer // *Sovremennaja onkologija.* 2003. Vol. 7 (3). P. 122–125. [in Russian]
13. Carragher N.O., Fonseca B.D., Frame M.C. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions // *Neoplasia.* 2004. Vol. 6. P. 53–73.
14. Chaudhary A.K., Singh M., Bharti A.C., Asotra K., Sundaram S., Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck // *J. Biomed. Sci.* 2010. Vol. 17. P. 10–18. doi: 10.1186/1423-0127-17-10.
15. Coussens L.M., Tinkle C.L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis // *Cell.* 2000. Vol. 103. P. 481–490.
16. Driscoll J.J., Minter A., Driscoll D.A., Burris J.L. The ubiquitin-proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2011. Vol. 11 (2). P. 242–246.
17. Katayama A., Bandoh N., Kishibe K. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis // *Clin Cancer Res.* 2004. Vol. 10 (2). P. 634–640.
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* 2001. Vol. 25 (4). C. 402–408.
19. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // *Br. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 135 (8). 1951–1958.
20. Stokes A., Joutsa J., Ala-Aho R., Pitchers M., Pennington C.J., Martin C., Premachandra D.J., Okada Y., Peltonen J., Grénman R., James H.A., Edwards D.R., Kähäri V.M. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16 (7). P. 2022–2035. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2525.
21. Yen C.Y., Chen C.H., Chang C.H., Tseng H.F., Liu S.Y., Chuang L.Y., Wen C.H., Chang H.W. Matrix metalloproteinases (MMP) 1 and MMP10 but not MMP12 are potential oral cancer markers // *Biomarkers.* 2009. Vol. 14 (4). P. 244–249. doi: 10.1080/13547500902829375.
22. Zhang H.K., Liu H.G. Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-year follow-up of laryngeal precancerous lesions // *Acta Otolaryngol.* 2012. Vol. 132 (3). P. 325–328. doi: 10.3109/00016489.2011.642812.