

Для цитирования: Какурина Г.В., Кульбакин Д.Е., Черемисина О.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Протеинфосфатаза 1В в патогенезе рака гортани и гортаноглотки. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (4): 49–53. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-4-49-53.

For citation: Kakurina G.V., Kulbakin D.E., Cheremisina O.V., Kondakova V., Choynzonov E.L. Protein phosphatase 1B in pathogenesis of laryngeal and hypopharyngeal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (4): 49–53. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-4-49-53.

## ПРОТЕИНФОСФАТАЗА 1В В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ГОРТАНИ И ГОРТАНОГЛОТКИ

**Г.В. Какурина, Д.Е. Кульбакин, О.В. Черемисина, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов**

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия  
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

### Аннотация

Для прогноза развития и течения одного из агрессивных социально значимых заболеваний – плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ) протеомным анализом определили ряд показателей, в числе которых находится протеинфосфатаза 1В (PPM1B). Верификация результатов протеомного анализа методом ИФА показала, что содержание PPM1B в сыворотке крови больных ПРГШ различалось в зависимости от стадии патологического процесса и коррелировало с размером первичной опухоли. У больных ПРГШ T1N0M0 стадии в сыворотке крови выявлен более высокий уровень PPM1B в отличие от больных в группах контроля и с хроническим гиперпластическим ларингитом (ХГЛ) с дисплазией эпителия (DII–III). Содержание PPM1B в опухолевой ткани было связано с размером первичного опухолевого очага и наличием метастазов. При ПРГШ T1N0M0 стадии в опухолевой ткани выявлен более высокий уровень PPM1B в отличие от группы больных с хроническим гиперпластическим ларингитом. Получены результаты, свидетельствующие о возможности использования определения PPM1B для ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ. Для выяснения прогностического значения уровня PPM1B необходимы дополнительные исследования с увеличением числа больных в группах.

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак головы и шеи, ранняя диагностика, прогноз, хронический гиперпластический ларингит и фарингит, дисплазия эпителия, протеинфосфатаза 1В.

Плоскоклеточный рак области головы и шеи (ПРГШ) отличается агрессивным течением. Опухоли этой локализации характеризуются быстрым ростом, часто рецидивируют, дают множественные метастазы в регионарные лимфоузлы и с трудом поддаются лечению. Около 40 % больных ПРГШ погибают в течение первого года после установки диагноза [1]. В современной онкологии существует проблема ранней диагностики и прогноза течения этого социально значимого заболевания. Использование инструментальных методов для диагностики ПРГШ на уровне амбулаторно-поликлинического звена затруднено их трудоемкостью и дороговизной [2]. Поэтому актуально определить доступные, надежные и малоинвазивные показатели для диагностики и прогноза течения ПРГШ.

Ранее протеомным анализом сыворотки крови больных ПРГШ был выделен ряд показателей, которые могут иметь диагностическую ценность для прогноза течения заболевания, – аденилилцилаза

ассоциированный протеин 1 (CAP1), протеинфосфатаза 1В (PPM1B) и др. [1].

**Цель исследования** – определить содержание PPM1B в сыворотке крови и ткани у больных ПРГШ (T1–4N0–3M0), чтобы оценить возможность использования этого показателя в качестве дополнительного критерия прогноза течения ПРГШ, для этого в исследование были включены больные с различными хроническими воспалительными заболеваниями гортани и гортаноглотки с морфологически подтвержденной дисплазией слизистой оболочки (ХГЛ, DII–III).

### Материал и методы

В исследование включены 43 больных ПРГШ стадии T1–4N0–3M0 с гистологически верифицированным диагнозом, ранее не получавших специального лечения, 12 человек с хроническими воспалительными заболеваниями гортани и гортаноглотки с морфологически подтвержденной дисплазией слизистой оболочки (ХГЛ, DII–III), группу

Таблица 1

**Содержание РРМ1В в сыворотке крови больных ХГЛ (DII–III), ПРГШ и в контрольной группе**

Группа больных	Число больных	Уровень РРМ1В, нг/мл (Ме (Q1; Q2))	p
Контрольная	12	0,268 (0,15; 0,42)	–
ХГЛ (DII–III)	12	0,403 (0,36; 0,46)	–
T1N0M0	12	0,61 (0,4; 1,24)	p <sub>0</sub> =0,006; p <sub>1</sub> =0,028
T2N0–1M0	16	0,74 (0,36; 0,9)	p <sub>0</sub> =0,019
T3–4N0–2M0	15	1,1 (0,59; 1,7)	p <sub>0</sub> =0,003; p <sub>1</sub> =0,0002

Примечание: p<sub>0</sub> – значимость различий показателей у больных по сравнению с контрольной группой; p<sub>1</sub> – значимость различий по сравнению с показателями у больных с ХГЛ, DII–III.

Таблица 2

**Содержание РРМ1В в патологически измененной ткани больных ХГЛ и плоскоклеточным раком головы и шеи**

Группа больных	Число больных	Уровень РРМ1В, нг/мл (Ме (Q1; Q2))	p
ХГЛ (DII–III)	12	1,42 (1,02; 1,5)	–
T1N0M0	9	3,7 (3,1; 4,3)	p <sub>1</sub> =0,035
T2N0–1M0	10	3,72 (2,5; 4,2)	p <sub>1</sub> =0,002
T3–4N0–2M0	9	4,24 (4,51; 4,6)	p <sub>1</sub> =0,0027

Примечание: p<sub>1</sub> – значимость различий по сравнению с показателями у больных с ХГЛ, DII–III.

контроля составили 12 здоровых волонтеров. Средний возраст больных – 55 ± 5,4 года.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Этическими принципами проведения научных медицинских исследований с участием человека» и с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», получено разрешение этического комитета института. Материалом для исследования явилась сыворотка крови, которую получали в соответствии со стандартным протоколом, и патологически измененная ткань, взятая в ходе выполнения видеоларингоскопии или при проведении операции. Гомогенат опухолевой и смежной морфологически нормальной ткани готовили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к наборам ИФА. Результаты выражали как количество исследуемого белка в нг на 1 мл сыворотки крови или гомогената ткани. Анализ образцов проводили с помощью ИФА набора Human protein phosphatase 1B, magnesium-dependent, beta isoform (PPM1B) ELISA Kit (MyBioSource) на микропланшетном ИФА ридере Anthos Reader 2020 (Biochrom).

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 6.0. Для проверки значимости различий в группах использовали непараметрические критерии: тест Крускала – Уоллиса и тест Манна – Уитни. Результаты, приведенные в табл. 1 и 2, представлены как медиана (Ме) с интерквартильным размахом (Q; Q3), где N – количество человек. Значимость различий между группами исследовали с помощью критерия Манна – Уитни (U-test). Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического критерия Спирмена.

**Результаты исследования**

Анализ содержания РРМ1В в образцах сыворотки крови показал достоверное различие уровня исследуемого белка во всех представленных группах. У больных ПРГШ стадии T1N0M0 уровень РРМ1В в сыворотке крови практически в 2 раза был выше, чем в контрольной группе, и в 1,5 раза выше, чем у пациентов с ХГЛ (DII–III), в обоих случаях различия статистически значимы (p=0,006 и p=0,028 соответственно). С увеличением распространенности первичной опухоли наблюдалось постепенное нарастание уровня РРМ1В в сыворотке крови больных ПРГШ (табл. 1). Корреляционный анализ показал положительную зависимость уровня РРМ1В в сыворотке крови от размера опухолевого узла (r=0,59; p<0,05).

Анализ содержания РРМ1В в опухолевой ткани больных ПРГШ и ткани диспластически измененного эпителия больных ХГЛ (DII–III) показал нарастание уровня исследуемого белка в зависимости от стадии патологического процесса (табл. 2). Межгрупповое сравнение уровня РРМ1В в опухолевой ткани больных ПРГШ со стадиями заболевания T1–4N0–2M0 выявило значимые различия по сравнению с группой больных с ХГЛ (DII–III). Уровень РРМ1В в опухолевой ткани возрастал с увеличением стадии патологического процесса и был выше почти в 2 раза у больных ПРГШ со стадией T2N0–1M0 по сравнению с группой больных ХГЛ (DII–III) и в 3 раза выше, чем у больных с распространенным опухолевым процессом (со стадией, стратифицированной как T3–4N0–2M0). Было отмечено увеличение содержания этого белка в 2,6 раза (p=0,035) в опухолевой ткани пациентов с ПРГШ T1N0M0 стадии по сравнению с больными ХГЛ с дисплазией эпителия II–III степени.

При сравнении уровней PPM1B в опухолевой и в смежной морфологически нормальной ткани у больных ПРГШ T1–4N0–2M0 стадии было установлено, что содержание белка было почти в 2 раза выше в ткани опухоли (рис. 1).

Наличие у больных метастазов в регионарные лимфоузлы также отражалось на содержании PPM1B как в сыворотке крови, так и в образцах тканей (табл. 3). Значимые различия в содержании PPM1B были отмечены в опухолевой ткани больных ПРГШ между группами с метастатически пораженными лимфоузлами шеи и без поражения регионарного лимфатического аппарата ( $p=0,009$ ).

Корреляционный анализ содержания PPM1B в образцах показал, что в сыворотке крови больных уровень белка был связан с размером первичной опухоли ( $r=0,38$ ,  $p\leq 0,05$ ), в опухолевой ткани – с размером первичного очага ( $r=0,6$ ,  $p\leq 0,05$ ) и состоянием регионарного лимфатического аппарата ( $r=0,48$ ,  $p\leq 0,05$ ) (рис. 2). В исследуемой выборке пациентов более сильная связь была отмечена между содержанием PPM1B в смежной морфологически нормальной ткани и наличием у больных ПРГШ метастазов в регионарные лимфоузлы ( $r=0,82$ ,  $p\leq 0,05$ ).

### Обсуждение

В работе верифицированы данные проведенного ранее протеомного анализа, кроме того, показана зависимость содержания PPM1B в сыворотке крови от распространенности первичной опухоли и тканевого уровня этого белка от размера первичного опухолевого узла и наличия лимфогенных метастазов у больных ПРГШ. Вероятно, постепенное нарастание уровня PPM1B в сыворотке крови и тканевом материале может говорить об увеличении интенсивности процессов опухолевой трансформации и прогрессии. Полученные данные о взаимосвязи уровня PPM1B в нормальной ткани больных ПРГШ с наличием у них метастазов говорят о формировании сложных взаимоотношений между опухолью и ее микроокружением [3, 4]. Также результаты работы свидетельствуют о возможности использования PPM1B как дополнительного критерия для ранней диагностики ПРГШ и мониторинга групп больных хроническими воспалительными заболеваниями гортани и гортаноглотки с морфологически подтвержденной дисплазией слизистой оболочки.

Несмотря на участие PPM1B в регуляции различных базовых клеточных процессов [5, 6], исследования роли этого белка в онкогенезе в литературе представлены крайне мало [7–9]. Так, на клеточных линиях рака мочевого пузыря показана возможность использования PPM1B в качестве одного из

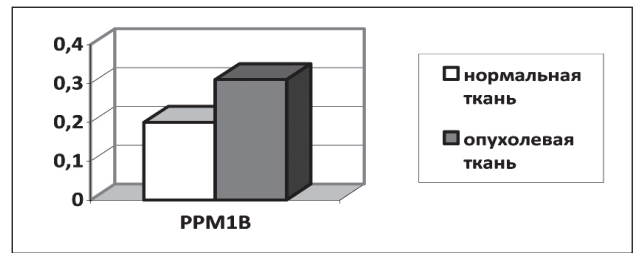


Рис. 1. Содержание PPM1B (нг/мл) в патологически измененной и условно нормальной ткани у больных ХГЛ и ПРГШ

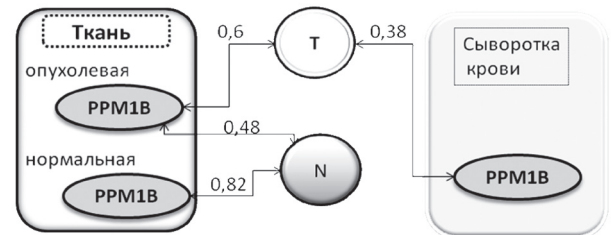


Рис. 2. Зависимость содержания PPM1B в сыворотке крови и ткани от стадии опухолевого процесса у больных ПРГШ

потенциальных диагностических маркеров при раке мочевого пузыря и возможность разработки эффективных терапевтических стратегий при лечении рака этой локализации [8]. Увеличение уровня PPM1B у больных ПРГШ, вероятно, связано с механизмами, участвующими в «диалоге» опухоль – хозяин. Субстратами для PPM1B, кроме ингибитора NF-κB ИККβ, могут быть AMPK, CDK2, CDK6, JNKK1, p38 и TAK1 [5] и некроптозокиназа RIP3 [10], модулируя активность которых PPM1B может участвовать в сложных сигнальных путях опухолевого роста. Увеличение уровня PPM1B при развитии и прогрессии ПРГШ может быть связано с активацией NF-κараВ по альтернативному пути или быть отражением запуска более сложных сигнальных каскадов, участвующих в опухолевой трансформации и росте.

Данные об увеличении содержания PPM1B как в сыворотке крови, так и в тканевом материале имеют теоретическое значение для понимания процессов опухолевой трансформации и прогрессии и дают возможность в дальнейшем разработать новый критерий для ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ. Кроме того, данные о положительной корреляции PPM1B в нормальной ткани с наличием метастазов у больных ПРГШ могут дополнить имеющиеся знания о роли микроокружения опухоли в ее развитии. Для выяснения прогностической значимости уровня PPM1B необходимы дополнительные исследования с увеличением числа больных в группах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чойнзонов Е.Л., Кондакова И.В., Спирина Л.В., Лебедев И.Н., Гольдберг В.Е., Чижевская С.Ю., Хричкова Т.Ю. Плоскоклеточный рак головы и шеи: Молекулярные основы патогенеза. М.: Наука. 2016; 224.
2. Суркова П.В., Фролова И.Г., Чойнзонов Е.Л., Черемисина О.В., Величко С.А., Чижевская С.Ю., Зельчан Р.В. Возможности спиральной компьютерной томографии в оценке эффективности предоперационной химиотерапии у больных раком гортани и гортаноглотки. Сибирский онкологический журнал. 2011; 2: 39–44.
3. Леенман Е.Е., Мухина М.С. Клеточное микроокружение злокачественных опухолей и его значение в их прогнозе. Вопросы онкологии. 2013; 59 (4): 444–452.
4. Ельникова А.А. Микроокружение опухоли – темная лошадка в противоопухолевой терапии. Здоровье и образование в XXI веке. 2015; 17 (1): 84–86.
5. Sun W., Yu Y., Dotti G., Shen T., Tan X., Savoldo B., Pass A.K., Chu M., Zhang D., Lu X., Fu S., Lin X., Yang J. PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha induced IKKbeta NF kappaB activation. Cell Signal. 2009 Jan; 21 (1): 95–102. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.09.012.
6. Takeuchi T., Kobayashi T., Tamura S., Yokosawa H. Negative regulation of protein phosphatase 2Cbeta by ISG15 conjugation. FEBS Lett. 2006 Aug 7; 580 (18): 4521–6.
7. Wang H., Chen Y., Han J., Meng Q., Xi Q., Wu G., Zhang B. DCA-F4L2 promotes colorectal cancer invasion and metastasis via mediating degradation of NFkb negative regulator PPM1B. Am J Transl Res. 2016 Feb 15; 8 (2): 405–18.
8. Yang J., Yuan D., Li J., Zheng S., Wang B. MiR-186 downregulates protein phosphatase PPM1B in bladder cancer and mediates G1-S phase transition. Tumour Biol. 2016 Apr; 37 (4): 4331–41. doi: 10.1007/s13277-015-4117-4.
9. Zuo S., Xue Y., Tang S., Yao J., Du R., Yang P., Chen X. 14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF-alpha-induced time course-dependent NF-kappaB activity. J Proteome Res. 2010 Jul 2; 9 (7): 3465–78. doi: 10.1021/pr9011377.
10. Chen W., Wu J., Li L., Zhang Z., Ren J., Liang Y., Chen F., Yang C., Zhou Z., Su S.S., Zheng X., Zhang Z., Zhong C.Q., Wan H., Xiao M., Lin X., Feng X.H., Han J. Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. Nat Cell Biol. 2015 Apr; 17(4): 434–44. doi: 10.1038/ncb3120.

Поступила 24.03.17  
Принята в печать 29.05.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Какурина Гелена Валерьевна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1896-3144. E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru.

**Кульбакин Денис Евгеньевич**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 3898-9456.

**Черемисина Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, заведующая эндоскопическим отделением, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 9579-2691.

**Кондакова Ирина Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 9338-4149.

**Чойнзонов Евгений Лхаматирович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Научно-исследовательского института онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2240-8730.

**Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить**

## PROTEIN PHOSPHATASE 1B IN THE PATHOGENESIS OF LARYNGEAL AND HYPOPHARYNGEAL CANCER

**G.V. Kakurina, D.E. Kulbakin, O.V. Cheremisina, I.V. Kondakova, E.L. Choyzonov**

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia  
5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Abstract

To predict the development and clinical course of squamous cell head and neck carcinoma (SCHNC), we studied the level of protein phosphatase 1B (PPM1B) using the proteomic analysis. Verification of the results of proteomic analysis by ELISA showed that the level of PPM1B in blood serum of patients with SCHNC depended on the disease stage. The level of PPM1B in the blood serum of patients with stage T1N0M0 cancer was higher than that observed in the control group and in patients with chronic hyperplastic laryngitis. In tumor tissue, the level of PPM1B was associated with the size of the primary tumor and the presence of metastases. In tumor tissue, the level of PPM1B was also higher in patients with stage T1N0M0 than in patients with chronic hyperplastic laryngitis. The data obtained indicate that the level of PPM1B can be used for early

detection and prediction of the clinical course of SCHNC. Further studies with larger cohorts of patients are required to evaluate the prognostic significance of the PPM1B level.

**Key words: squamous cell head and neck carcinoma, early detection, prognosis, chronic hyperplastic laryngitis and pharyngitis, epithelial dysplasia, protein phosphatase 1B.**

#### REFERENCES

1. Choinzonov E.L., Kondakova I.V., Spirina L.V., Lebedev I.N., Goldberg V.E., Chizhevskaya S.Yu., Shishkin D.A., Urazova L.N., Kakurina G.V., Bychkov V.A., Khrichkova T.Yu., Melnikov A.A. Squamous cell head and neck carcinoma: Molecular bases of pathogenesis. Moscow, 2016; 224. [in Russian].
2. Surkova P.V., Frolova I.G., Choinzonov E.L., Cheremisina O.V., Velichko S.A., Chizhevskaya S.Yu., Zel'chan R.V. Possibilities of spiral computed tomography in assessing the effectiveness of preoperative chemotherapy in patients with laryngeal and laryngopharyngeal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2011; 2: 39–44. [in Russian].
3. Leenman E.E., Mukhina M.S. The cellular microenvironment of malignant tumors and its significance in their prognosis. Problems in Oncology. 2013; 59 (4): 444–52. [in Russian].
4. El'nikova A.A. Tumor microenvironment a dark horse in anticancer chemotherapy. Health and education at XXI century. 2015; 17 (1): 84–86. [in Russian].
5. Sun W., Yu Y., Dotti G., Shen T., Tan X., Savoldo B., Pass A.K., Chu M., Zhang D., Lu X., Fu S., Lin X., Yang J. PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha induced IKKbeta NF kappaB activation. Cell Signal. 2009 Jan; 21(1): 95–102. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.09.012.
6. Takeuchi T., Kobayashi T., Tamura S., Yokosawa H. Negative regulation of protein phosphatase 2Cbeta by ISG15 conjugation. FEBS Lett. 2006 Aug 7; 580 (18): 4521–6.
7. Wang H., Chen Y., Han J., Meng Q., Xi Q., Wu G., Zhang B. DCA-F4L2 promotes colorectal cancer invasion and metastasis via mediating degradation of NFkappaB negative regulator PPM1B. Am J Transl Res. 2016 Feb 15; 8 (2): 405–18.
8. Yang J., Yuan D., Li J., Zheng S., Wang B. MiR-186 downregulates protein phosphatase PPM1B in bladder cancer and mediates G1-S phase transition. Tumour Biol. 2016 Apr; 37 (4): 4331–41. doi: 10.1007/s13277-015-4117-4.
9. Zuo S., Xue Y., Tang S., Yao J., Du R., Yang P., Chen X. 14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF-alpha-induced time course-dependent NF-kappaB activity. J Proteome Res. 2010 Jul 2; 9 (7): 3465–78. doi: 10.1021/pr9011377.
10. Chen W., Wu J., Li L., Zhang Z., Ren J., Liang Y., Chen F., Yang C., Zhou Z., Su S.S., Zheng X., Zhang Z., Zhong C.Q., Wan H., Xiao M., Lin X., Feng X.H., Han J. Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. Nat Cell Biol. 2015 Apr; 17 (4): 434–44. doi: 10.1038/ncb3120.

Received 24.03.17  
Accepted 29.05.17

#### ABOUT THE AUTHORS

**Kakurina Gelena V.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 1896-3144.

**Kulbakin Denis E.**, MD, PhD, Department of Head and Neck Tumors, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). SPIN-code: 3898-9456.

**Cheremisina Olga V.**, MD, DSc, Head of Endoscopy Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: CheremisinaOV@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9579-2691.

**Kondakova Irina V.**, MD, Professor, Tumor Biochemistry Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9338-4149.

**Choinzonov Evgeny L.**, MD, DSc, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Director of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). SPIN-code: 2240-8730

**Authors declare lack of the possible conflicts of interests**