

Экспрессия белка сосудистого эндотелиального фактора роста в ткани опухолей у больных раком яичника I–II стадий

В.Л. Карапетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов, Т.Ш. Тагибова
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Виктория Лазртовна Карапетян vikakarapetyan@mail.ru

В настоящее время наиболее интересным и перспективным направлением в диагностике злокачественных опухолей является определение опухолевых маркеров. Изучена экспрессия основного фактора ангиогенеза – сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в ткани первичной опухоли больных раком яичников (РЯ) с целью определения прогностической значимости маркера.

В исследование включено 48 больных РЯ. С помощью иммуногистохимического метода изучена экспрессия VEGF в ткани первичной опухоли. Установлено, что при РЯ имеет место высокая (85,4% случаев) частота экспрессии VEGF, ассоциированная с уменьшением безрецидивной выживаемости больных ($p > 0,05$).

Показано, что экспрессия ангиогенного фактора VEGF в опухоли при эпителиальном РЯ начальных стадий несет прогностическую информацию.

Ключевые слова: эпителиальный рак яичников, экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста, прогноз течения заболевания

Expression of vascular endothelial factor protein in the tumor tissues of patients with Stages I-II ovarian cancer

V.L. Karapetyan, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov, S.O. Nikogosyan, V.V. Kuznetsov, T.Sh. Tagibova
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

To define tumor markers is presently the most interesting and promising direction for the diagnosis of malignancies. The expression of the major angiogenesis factor vascular endothelial growth factor (VEGF) in primary tumor tissue was studied in ovarian cancer (OC) patients to define the prognostic value of the marker.

The study enrolled 48 patients with OC. The immunohistochemical technique was used to examine VEGF expression in the primary tumor tissue. The frequency of VEGF expression, which was associated with lower relapse-free survival rates, was found to be high (85.4%) in OC patients ($p > 0.05$).

The tumor expression of the angiogenic factor VEGF was shown to provide prognostic information in early-stage ovarian epithelial cancer.

Key words: ovarian epithelial cancer, vascular endothelial growth factor expression, prediction of disease course

Введение

Злокачественные опухоли яичников являются одной из актуальных проблем в клинической онкологии. Рак яичников (РЯ) занимает 3-е место в структуре заболеваемости злокачественными опухолями половых органов у женщин, уступая по частоте раку эндометрия и шейки матки, а смертность от этого заболевания превышает смертность от рака шейки и тела матки вместе взятых. Несмотря на успехи, достигнутые в диагностике и лечении, смертность от РЯ во всем мире составляет 55–65% [1, 2].

Летальность больных РЯ на первом году после установления диагноза варьирует от 35 до 40%. Причины высокой смертности пациенток со злокаче-

ственными опухолями яичников – бессимптомное течение заболевания на ранних его стадиях, приводящее к позднему обращению больных к врачу (и, следовательно, распознаванию заболевания на поздних его стадиях), а также низкая эффективность лечения при наличии распространенной опухоли [3, 4].

Прогноз течения РЯ зависит от ряда клинических факторов, ведущими из которых являются стадия заболевания, гистологическая форма и степень дифференцировки опухоли. Наряду с этим с прогнозом заболевания также связаны возраст больной, отягощенный семейный анамнез, эндокринно-обменные нарушения, репродуктивная функция, особенности анатомического роста опухоли.

Одно из наиболее интересных и перспективных направлений в диагностике злокачественных опухолей — определение опухолевых маркеров. Определение различных маркеров в клетках опухоли или жидкостях организма (кровь, асцитическая жидкость, моча и т.д.) может давать дополнительную информацию о биологической особенности опухоли: о темпах ее роста, способности к инвазии и метастазированию, устойчивости к химиопрепаратам. Большое внимание уделяется изучению маркеров, характеризующих процессы апоптоза, пролиферации клетки и ангиогенеза [5–7]. Известно, что для обеспечения адекватного кровоснабжения и, следовательно, роста опухоль создает собственное микрососудистое русло [8–10]. Регуляция этого процесса осуществляется с помощью про- и антиангиогенных факторов [11]. Наиболее значимым стимулятором ангиогенеза опухоли служит сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), известный еще как фактор сосудистой проницаемости. Посредством стимуляции образования новых сосудов VEGF приводит к дальнейшему росту и развитию опухоли [12].

Установлено, что уровень экспрессии VEGF в ткани РЯ значительно выше, чем в доброкачественных и пограничных опухолях [13–15]. Этот фактор присутствует в опухоли 97% больных РЯ, при этом в 56% случаев экспрессия VEGF оценивается как выраженная [16]. Степень экспрессии VEGF имеет большое значение. Так, худшие показатели выживаемости отмечены у больных с VEGF++ по сравнению с таковыми у пациенток с VEGF+ [17]. Не обнаружено существенных различий экспрессии VEGF в зависимости от гистологического типа опухоли яичников. Наличие VEGF диагностировано в ткани у 52% больных серозной аденокарциномой яичников, 31% — муцинозной карциномой, 57% — эндометриоидной карциномой и 81% — при светлоклеточном раке [16]. Установлена прямая корреляция между частотой выявления экспрессии VEGF и стадией болезни (при III стадии она имела место у 41,4%, при I–II — у 13,5% пациенток соответственно) [18]. Соотношение экспрессии VEGF в первичной и метастатической опухоли может иметь прогностическое значение. Возврат болезни наступает гораздо быстрее в случаях, когда уровень экспрессии VEGF в метастазах выше, чем в ткани первичной опухоли [17].

Нами была изучена экспрессия VEGF в ткани первичной опухоли эпителиального РЯ I–II стадий.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе отделения хирургической онкогинекологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН совместно с лабораторией

Института экспериментальной диагностики и терапии опухолей. В исследование включено 48 больных морфологически верифицированными злокачественными эпителиальными новообразованиями яичников I–II стадий, которые находились на лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клинические исследования проводили у всех пациенток. Обследование больных осуществляли согласно стандартным методам и алгоритму диагностики опухоли, степени ее распространенности (FIGO), а также с учетом оценки общего состояния по системе GOG. После полного обследования приступали к выполнению основных этапов комбинированного лечения. Эффективность методов первичного комбинированного лечения, период ремиссии, особенности возврата болезни, результаты химиотерапии 2-й, 3-й и других линий, эффективность промежуточных, повторных операций изучали посредством динамического наблюдения.

У всех пациенток методами иммуногистохимии (ИГХ) была оценена экспрессия маркера VEGF. ИГХ-анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела против VEGF (клон C-1, «Santa Cruz Biotech»). Реакцию антиген — антитело выявляли с помощью тест-системы EnVision + kit («Dako») согласно инструкции производителя.

Оценку результатов окрашивания осуществляли с применением светового микроскопа Leica (Германия), $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. Для маркера оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Число положительных клеток определяли в зонах, содержащих их максимальное количество. Использовали следующие критерии оценки маркера: опухоль считали отрицательной по VEGF — VEGF(-), если в ее ткани отсутствовала цитоплазматическая реактивность с антителами или число окрашенных клеток составляло $< 25\%$, и положительной — VEGF(+), если было окрашено $> 25\%$ опухолевых клеток.

Результаты

Белок VEGF — одного из основных стимуляторов ангиогенеза — определялся в 48 опухолях и был выявлен в 41 (85,4%) случае. Из них в 22 наблюдениях новообразование имело строение серозной цистаденокарциномы (СЦАК), в 15 — эндометриоидной (ЭАК) и в 4 — муцинозной (МАК) аденокарциномы. При этом в 72,9% случаев содержание белка VEGF было высоким и составляло 80–100% (см. таблицу). Экспрессия VEGF у некоторых пациенток имела место также на эндотелиальных клетках сосудов опухолевой ткани.

Особенности экспрессии белка VEGF в ткани опухолей у больных СЦАК, ЭАК и МАК яичников

Гистологическая форма опухоли	Число образцов (%)			Среднее число VEGF(+)-клеток, %
	Общее	VEGF(+)*	VEGF(-)*	
СЦАК	26	22 (84,6)	4 (15,4)	91,8 ± 4,1
ЭАК	16	15 (93,8)	1 (6,7)	98,3 ± 1,7
МАК	6	4 (66,7)	2 (33,3)	92,5 ± 7,5
Всего...	48	41 (85,4)	7 (14,6)	93,8 ± 2,9

* $p > 0,05$.

В среднем содержание VEGF(+)-клеток было примерно одинаковым во всех группах: $91,8 \pm 4,1\%$ — у больных СЦАК ($n=22$), $98,3 \pm 1,7\%$ — в группе ЭАК ($n=15$) и $92,5 \pm 7,5\%$ — МАК ($n=4$). Частота выявления показателя составила 84,6, 93,8 и 66,7% соответственно. Различия недостоверны ($p > 0,05$).

Частота выявления и степень экспрессии белка VEGF(+)-клеток не имели связи со степенью дифференцировки опухоли.

Частота обнаружения VEGF(+)-клеток незначительно повышалась при Па + b стадии заболевания по сравнению с Ia + b и Ic стадиями и заметно снижалась при Pc стадии (Ia + b — 90,9, Ic — 88,9, Па + b — 100, Pc — 66,7%, $p=0,48$).

Степень экспрессии белка VEGF у больных Ia + b стадии составила $91 \pm 4,5\%$, Ic — $93,1 \pm 4,5\%$ и заметно повышалась при Па + b и Pc стадиях — 100% ($p > 0,05$).

Несколько реже встречалась экспрессия белка VEGF у больных репродуктивного периода жизни — 32 (82,1%) наблюдения из 39, чем в постменопаузе — 9 (100%) из 9 случаев ($p=0,2$).

Содержание VEGF(+)-клеток в ткани опухоли было достоверно выше у пациенток, имевших помимо РЯ миому матки, чем у больных при ее отсутствии ($98,1 \pm 1,9$ и $86,8 \pm 5,6\%$ соответственно, $p=0,026$).

Интересным обстоятельством является тот факт, что у пациенток с РЯ I—II стадий независимо от гистологической структуры опухоли частота экспрессии белка VEGF при отсутствии асцита была достоверно выше и составила 96,7% ($n=30$), тогда как при асците — только 68,8% ($n=18$), $p=0,01$. Эти данные свидетельствуют о том, что при развитии злокачественного процесса частота выявления показателя в ткани опухоли может снижаться.

У больных группы СЦАК содержание маркера СА-125 в сыворотке крови было недостоверно ниже при отсутствии экспрессии белка VEGF (медиана 132,1 МЕ/мл), чем у пациенток с ее наличием (медиана 208,7 МЕ/мл). Число больных в груп-

пах ЭАК и МАК было недостаточным для проведения оценки взаимосвязи между содержанием маркера СА-125 и экспрессией белка VEGF.

Установлено, что частота обнаружения белка VEGF в ткани опухоли была взаимосвязана с экспрессией его в сосудах опухоли ($p=0,03$). Так, из 7 опухолей, в ткани которых не было выявлено экспрессии VEGF, только в 1 (14,3%) наблюдении отмечена экспрессия VEGF в сосудах, и наоборот — из 41 случая наличия экспрессии этого маркера в ткани опухоли в 27 (65,8%) обнаружен белок VEGF в сосудах.

При изучении совместной экспрессии белков VEGF и p53 выявлено, что оба показателя имели место в опухоли у 34,6% больных СЦАК и в 2—3 раза реже у пациенток с ЭАК и МАК (12,6 и 16,7% соответственно, $p=0,03$).

При определении прогностической значимости белка VEGF в ткани опухоли установлено, что в группе больных РЯ I—II стадий без экспрессии VEGF медиана жизни до прогрессирования составила $73 \pm 29,8$ мес, 5-летняя безрецидивная выживаемость — $75 \pm 21,7\%$, у пациенток с экспрессией белка VEGF медиана равнялась 69 мес, 5-летняя безрецидивная выживаемость — $60,3 \pm 10\%$, различия статистически не достоверны ($p > 0,05$).

Обсуждение

Результаты нашего анализа показали, что частота выявления белка VEGF в ткани опухоли и экспрессия его в окружающих сосудах взаимосвязаны. Степень экспрессии повышается при Па + b и Pc стадиях (до 100%) а частота обнаружения может снижаться при прогрессировании болезни (стадия Pc, асцит). Содержание показателя достоверно увеличивается при наличии в анамнезе у больной миомы матки. У пациенток группы СЦАК содержание СА-125 в сыворотке крови было недостоверно выше при наличии экспрессии белка VEGF. Совместная экспрессия VEGF и p53 достоверно чаще встречается при СЦАК, чем при ЭАК и МАК.

При проведении оценки выживаемости в зависимости от экспрессии белка VEGF установлено, что у больных с наличием экспрессии 5-летняя безрецидивная выживаемость ниже, чем у пациенток с ее отсутствием.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что экспрессия ангиогенного фактора VEGF в опухоли при эпителиальном РЯ начальных стадий несет прогностическую информацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. Л.: Медицина, 1989.
2. Бохман Я.В., Вишляева Е.М., Лившиц М.А. Опухоли яичников: сборник научных трудов. Иркутск, 1990; с. 16–26.
3. Жордания К.И. Злокачественные эпителиальные опухоли яичников. Совр онкол 2000;2(2):14–22.
4. Нечаева И.Д. Опухоли яичников. Л.: Медицина, 1987.
5. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз). Рос онкол журн 1996;(1):58–61.
6. Bodner S., Minna J., Jensen S. et al. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the loss of p53 gene mutation. Oncogene 1992;7:743–9.
7. Жордания К.И. Роль опухолеассоциированных маркеров в диагностике и лечении рака яичников. В сб.: Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников. Под ред. В.А. Горбуновой. М., 2001; с. 58–65.
8. Ferrara N., Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nat Med 1999;5:1359–64.
9. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 1997;18:4–25.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis therapeutic implications. N Eng J Med 1971;285:1182–6.
11. Карамышева А.Ф. Ангиогенез опухоли: механизмы, новые подходы к терапии. В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М., 2000; с. 298–309 (обзор).
12. Cao Y., Linden P., Farnebo J. et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:14389–94.
13. Davidson B., Goldberg I., Kopolovic J. Expression of angiogenesis-related genes in ovarian carcinoma — a clinicopathologic study. Clin Exp Metastas 2000;18:501–7.
14. Garzetti G., Giavattini A., Lucarini G. et al. Expression of vascular endothelial growth factor related to 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining in patients with serous ovarian tumors. Cancer 1999;85(10):2219–25.
15. Paley P., Goff B., Gown A. et al. Alterations in SPARS and VEGF immunoreactivity in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2000;78:336–41.
16. Yamamoto S., Konishi Y., Kuroda H. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. Br J Cancer 1997;76:1221–7.
17. Fujimoto J., Sakaguchi H., Aoki I. et al. Clinical implications of expression of vascular endothelial growth factor in metastatic lesion of ovarian cancer. Br J Cancer 2001;85(3):313–6.
18. Paley P., Staskus K., Gebhard K. et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. Cancer 1997;80(1):98–106.