

В. Г. Дубинина, А. И. Рыбин, О. В. Кузнецова, М. А. Лысенко, О. Н. Морозюк

АНАЛИЗ УРОВНЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ЭКСПРЕССИИ ЕГО РЕЦЕПТОРОВ У ПЛАТИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

Одесский национальный медицинский университет

Реферат. В. Г. Дубинина, А. И. Рыбин, О. В. Кузнецова, М. А. Лысенко, О. Н. Морозюк. **АНАЛИЗ УРОВНЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ЭКСПРЕССИИ ЕГО РЕЦЕПТОРОВ У ПЛАТИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ.** В статье проведен сравнительный анализ активности фактора роста эндотелия сосудов, его рецепторов и антиапоптотических белков у больных раком яичников. Показаны изменения исследуемых показателей в нормальной и опухолевой тканях яичников. Установлены различия исследуемых показателей у больных раком яичников в зависимости от чувствительности опухоли к препаратам платины. Авторы считают, что компоненты сигнального пути VEGF являются перспективными биомаркерами рака яичников как в качестве показателей неоангиогенеза, так и в качестве возможных факторов прогноза эффективности платиновой химиотерапии у пациенток с эпителиальным раком яичников.

Ключевые слова: рак яичников, платинорезистентность, платинорефрактерность, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, bcl-2, pAkt, прогнозирование.

Реферат. В. Г. Дубинина, А. И. Рыбин, О. В. Кузнецова, М. А. Лысенко, О. Н. Морозюк. **АНАЛІЗ РІВНЯ ФАКТОРУ РОСТУ ЕНДОТЕЛІЮ СУДИН І ЕКСПРЕСІЇ ЙОГО РЕЦЕПТОРІВ У ПЛАТИНОРЕЗИСТЕНТНИХ ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКІВ.** В статті проведений порівняльний аналіз активності фактору росту ендотелію судин, його рецепторів і антиапоптотичних білків у хворих на рак яєчників. Показані зміни досліджуваних показників у нормальній і пухлинній тканинах яєчників. Встановлені відмінності досліджуваних показників у хворих на рак яєчників у залежності від чуттєвості пухлини до препаратів платини. Автори вважають, що компоненти сигнального шляху VEGF є перспективними біомаркерами раку яєчників як у якості показників неоангіогенезу, так і в якості можливих факторів прогнозу ефективності платинової хіміотерапії у пацієнток з епітеліальним раком яєчників.

Ключові слова: рак яєчників, платинорезистентність, платинорефрактерність, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, bcl-2, pAkt, прогнозування.

Summary. V. G. Dubinina, A. I. Rybin, O. V. Kuznetsova, M. A. Lysenko, O. N. Moroziyuk. **VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTORS EXPRESSION IN PLATINUM-RESISTANT OVARIAN CANCER PATIENTS.** The article provides a comparative analysis of the activity of vascular endothelial growth factor and its receptors and antiapoptotic proteins in ovarian cancer patients. The changes of the parameters studied in normal and tumor tissues of the ovary. The differences in the parameters studied in patients with ovarian cancer, depending on the sensitivity of tumors to platinum drugs. The authors suggest that VEGF signaling pathway components are promising as a biomarker for ovarian cancer as indicators neoangiogenesis and as potential predictors of efficacy platinum chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer, platinum-resistant, platinum-refractory, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, bcl-2, pAkt, prognosis.

Актуальность работы. Проблема диагностики и лечения злокачественных новообразований яичников является одним из самых трудных разделов онкогинекологии. У большинства больных раком яичников (РЯ) заболевание выявляется на поздних стадиях, а результаты их лечения остаются неутешительными. Несмотря на высокую чувствительность многих современных методов диагностики, их специфичность недостаточна для дифференциации доброкачественного и злокачественного процессов в яичниках [1; 2; 4; 6; 7].

Несмотря на то, что РЯ относится к числу наиболее чувствительных к химиотерапии опухолей, до 40% пациенток с данным заболеванием являются первично-резистентными к платиновой химиотерапии. Даже при выполнении оптимальной циторедуктивной операции и дальнейшем назначении химиотерапии препаратами платины (химиотерапия первой линии) с достижением эффекта полной регрессии и нормализации уровней опухолевых маркеров, 5-летняя выживаемость больных РЯ III стадии составляет 20-25 %, а IV стадии – не превышает 10%. Это означает, что, несмотря на отсутствие клинических признаков заболевания, у подавляющего большинства больных в первые 2-3 года после окончания химиотерапии первой линии следует ожидать прогрессирование заболевания [3; 8; 10; 11].

В зависимости от сроков прогрессирования болезни принято выделять следующие типы опухолей: платинорезистентные (опухоль, прогрессирующая во время химиотерапии первой линии с включением препарата платины), платинорезистентные (опухоль, прогрессирующая в течение 6 месяцев после окончания химиотерапии первой линии с включением препарата платины) и платиночувствительные (опухоль, прогрессирующая более чем через 6 месяцев после окончания химиотерапии первой линии) [6; 8; 10].

На сегодняшний день как в Украине, так и во всем мире, не существует комплексного подхода к прогнозированию и повышению чувствительности РЯ к химиотерапии первого ряда (платиновой химиотерапии), что обуславливает актуальность разработки и применения такого подхода у пациенток с РЯ после выполнения им оптимальной циторедуктивной операции.

Таким образом, прогнозирование чувствительности опухоли яичника к препаратам платины является одной из актуальных проблем современной онкогинекологии.

На сегодняшний день известно, что важную роль в регуляции опухолевой прогрессии играют факторы роста, стимулирующие развитие новых сосудов в опухоли — неоангиогенез [11; 13]. В последние годы доказано, что ключевым регулятором неоангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF/VEGF-A/VPF), белок, индуцирующий активный рост клеток эндотелия и формирование новых капилляров. Ряд фактов указывает на то, что VEGF не только обладает проангиогенной активностью, но и может непосредственно участвовать в регуляции пролиферации клеток опухоли. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты работ, продемонстрировавших участие VEGF в регуляции выживаемости и пролиферации некоторых культивируемых *in vitro* опухолевых клеток. Биологический эффект VEGF опосредуется его рецепторами VEGFR-1/Flt-1 и VEGFR-2/Flk-1/KDR, типичными рецепторными тирозинкиназами (трансмембранные гликопротеиды с молекулярной массой 170—235 кДа) [15; 18]. Известно, что VEGF принимает участие в регуляции значительного числа внутриклеточных сигнальных путей, как митогенных, так и антиапоптотических, в частности, нижележащими эффекторами VEGF являются белки, контролирующие апоптоз, — Akt (протеинкиназа B) и Bcl-2 [16; 17].

В последние годы в литературе активно обсуждается вопрос о роли сигнальных путей VEGF в возникновении и формировании платинорезистентности рака яичников (РЯ). По данным ряда авторов, уровень VEGF и его нижележащих эффекторов (VEGFR-1, VEGFR-2, PI3-K, Akt, mTOR и др.) может иметь значение в прогнозе выживаемости и чувствительности к платиновой химиотерапии при РЯ [1, 2, 6]. Кроме того, некоторые компоненты сигнального пути VEGF рассматриваются в настоящее время как перспективные мишени противоопухолевой терапии — особенно активно исследуются возможности подавления роста опухоли с помощью антител к VEGF и специфических ингибиторов тирозинкиназ VEGFR-1 и VEGFR-2 [7]. В этой связи не теряют актуальности исследование содержания белков сигнального пути VEGF в опухолях и оценка возможной взаимосвязи этих параметров с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

Целью настоящего исследования явилось определение уровня VEGF, его рецепторов VEGFR-1 и VEGFR-2, Bcl-2 и активированной формы антиапоптотического белка Akt (pAkt) в опухолевой ткани больных РЯ и оценка возможной взаимосвязи этих показателей с формированием платинорезистентности РЯ.

Материал и методы исследования.

В исследование было включено 56 больных РЯ III—IV стадии, проходивших лечение на базах кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики и терапии Одесского национального медицинского университета. Средний возраст пациенток составил 65 лет. Распределение обследованных больных по стадиям заболевания представлено в табл. 1. Образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани яичника (200—300 мг) были взяты во время операции и немедленно заморожены в жидком азоте для дальнейшего хранения при -70°C . Для проведения иммуноферментного анализа образцы тканей лизировали в соотношении 1:3 в буфере следующего состава: 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Тритон X-100, 2,5 мМ пиродифосфат натрия, 1 мМ р-глицерофосфат, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мкг/мл леупептина. Полученные лизаты центрифугировали в течение 30 минут при скорости 22 000 об/мин, 4°C (центрифуга Optima™ TLX, Beckman, США). Концентрацию показателей выражали в расчете на 1 мг общего белка, определенного по методу Лоури. Уровень активированной (фосфорилированной) формы белка Akt (далее pAkt) исследован опухолевой ткани 46 больных. Параллельно у всех пациенток оценивали содержание VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 и уровень Bcl-2. При сравнении показателей использовали t-критерий Стьюдента, критерий Манна — Уитни, медианный тест, критерий серий Вальда — Вольфовица, корреляционный тест Пирсона (r) и тест корреляции рангов Спирмена (R). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программных пакетов «Statistica 6.0» (StatSoft Inc) и «Origin 6.0» (OriginLab Corporation).

Таблица 1

Распределение обследованных больных по стадиям заболевания

<i>Стадия</i>	<i>TNM</i>	<i>Число пациенток</i>
IIA	T3aNoMo	6
PIB	T3bNoMo	11
PIIC	T3cNoMo	22
IV	Тлюбое Nлюбое M1	7

Таблица 2

Наборы реактивов для иммуноферментного анализа, используемые в работе

<i>Показатель</i>	<i>Наименование набора</i>	<i>Производитель</i>
VEGF	Human VEGFELISA	BioSource International, USA
VEGFR-1	Human VEGF-R1 ELISA	Bender MedSystems, Austria
VEGFR-2	Human VEGF R2	R&D systems
pAkt	PathScan™ Phospho-Akt	Cell Signalingtechnology, USA
Bcl-2	Human Bcl-2 ELISA	Bender MedSystems, Austria

Исследуемые показатели в лизатах оценивали с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями производителей. Коммерческие названия и производители соответствующих наборов реактивов приведены в табл. 2.

Показатели измеряли на автоматическом универсальном ридере для микропланшет ELX800.

Результаты исследования.

Проведенная оценка содержания VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, pAkt и Bcl-2 в ткани РЯ в зависимости от основных клинико-морфологических характеристик заболевания показала следующее.

Уровень всех исследованных показателей не зависел от возраста, менопаузного статуса больных, степени дифференцировки и гистологического типа опухоли. Известно, что клиническая стадия является наиболее значимым прогностическим фактором при РЯ. Результаты определения содержания VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, pAkt и Bcl-2 в ткани РЯ в зависимости от клинической стадии и степени распространенности процесса были следующими. Уровень VEGF достоверно выше у больных с IV стадией РЯ по сравнению с пациентками с III (А-С) стадией заболевания, в опухолях больших размеров и у больных с канцероматозом брюшины. Показано также, что содержание VEGFR-1 в опухоли имеет тенденцию к увеличению у больных с IV стадией РЯ и достоверно возрастает у больных с канцероматозом брюшины. Напротив, уровень pAkt в опухолях больных РЯ IV стадии ниже, чем при III (А-С) стадии; при этом статистически значимы различия содержания pAkt в опухоли только между группами больных РЯ IIIА и IIIС стадии ($p < 0,05$; медианное значение уровня pAkt в 1,6 раза больше при IIIС стадии, чем при IIIА стадии). Взаимосвязи уровней VEGFR-2 с клинической стадией РЯ и степенью распространенности процесса не выявлено. У больных РЯ IV стадии обнаружена тенденция к значительному повышению уровня Bcl-2 в опухоли: в этой группе уровень Bcl-2 возрастал в 9 и более раз по сравнению с ранними клиническими стадиями, однако статистической значимости эти различия не достигали.

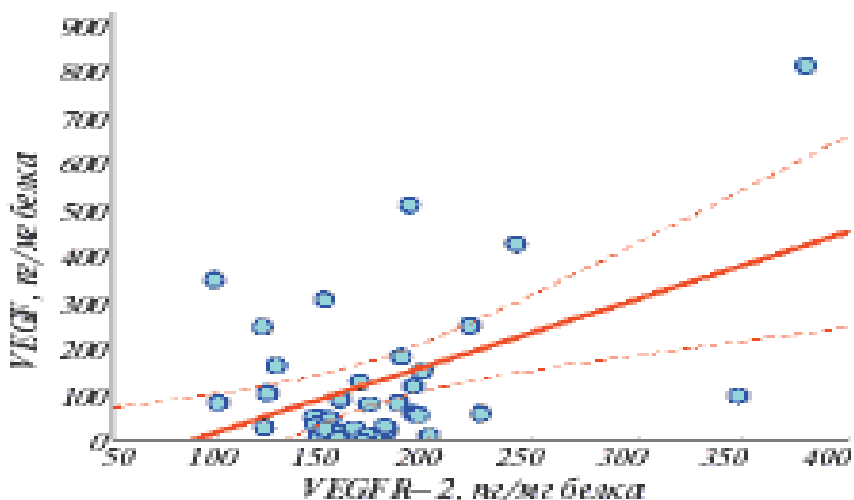


Рис. 1. Взаимосвязь содержания VEGF и VEGFR-2 в опухолевой ткани яичников ($r=0,47$; $p < 0,05$)

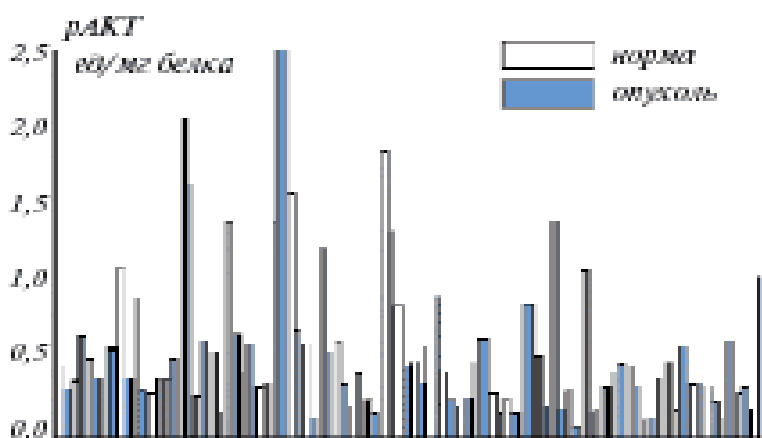


Рис. 2. Уровень pAkt в опухолях и гистологически неизмененных тканях яичников (парное сравнение показателей для каждой пациентки)

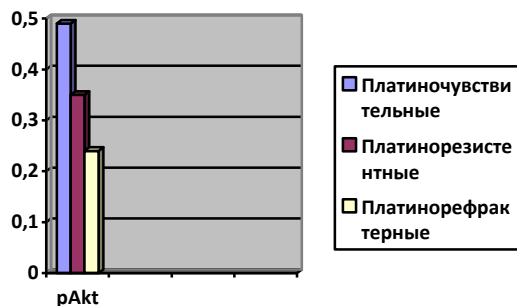


Рис. 3. Содержание pAkt в опухолевой ткани яичника в зависимости от чувствительности к препаратам платины. * $p < 0,01$

Наибольший интерес с нашей точки зрения представляло исследование корреляции уровней VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, pAkt и Bcl-2 с чувствительностью либо резистентностью к препаратам платины (табл. 3). Наблюдается тенденция к увеличению уровня VEGF в группе платиночувствительных опухолей по сравнению с платинорезистентными формами РЯ, однако достоверной взаимосвязи уровней VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 с чувствительностью к препаратам платины не обнаружено. Выявлена также тенденция к увеличению содержания VEGF в платинорезистентных опухолях по сравнению с платинорефрактерными опухолями. Кроме того, у ткани платинорезистентного РЯ отмечено более значительное повышение уровня VEGF в опухоли по сравнению с неизменной тканью (увеличение на 5-778 пг/мг, медиана 50 пг/мг), чем при платинорефрактерном РЯ (увеличение на 3-421 пг/мг, медиана 25 пг/мг); это различие относительного увеличения содержания VEGF между группами больных с платинорезистентными и платинорефрактерными опухолями яичников достоверно ($p < 0,05$). Уровень VEGFR-1 в опухоли не зависел ее чувствительности к препаратам платины, а содержание VEGFR-2 достоверно коррелировало с платинорезистентностью ($R = -0,38$; $p < 0,05$), при этом уровень VEGFR-2 был достоверно выше в платинорефрактерных опухолях по сравнению с платинорезистентными (табл. 3).

Таблица 3

Содержание VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, рецепторов pAkt и Bcl-2 в ткани РЯ в зависимости от чувствительности к препаратам платины (медиана; 25-75% квартили)

<i>Характеристика</i>	<i>Число пациенток</i>	<i>VEGF, пг/мг белка</i>	<i>VEGFR-1, пг/мг белка</i>	<i>VEGFR-2, пг/мг белка</i>	<i>pAkt, пг/мг белка</i>	<i>Bcl-2, пг/мг белка</i>
Платиночувствительный РЯ	23	54; 25-125	2,4; 1,9-3,0	159; 148-190	0,49; 0,27-0,76	110; 32-226
Платинорезистентный РЯ	17	91; 24-271	2,3; 2,0-2,5	166; 118-192	0,35; 0,18-0,46	42; 15-179
Платинорефрактерный РЯ	16	94; 41-191	2,4; 1,9-3,2	181; 152-239	0,24; 0,15-0,33	45; 24-150

В опухолевой ткани яичника уровень pAkt слабо, но достоверно коррелировал с чувствительностью к препаратам платины ($r = 0,23$; $p < 0,05$), при этом обнаружена тенденция к увеличению уровня pAkt в платиночувствительных опухолях по сравнению с платинорезистентными, а также в платинорезистентных опухолях по сравнению с платинорефрактерными. Частота повышения уровня pAkt в опухоли (по сравнению с гистологически неизменной тканью) достоверно выше (в 2 раза) у больных с платинорезистентными опухолями по сравнению с платинорефрактерными ($p < 0,01$).

Различий частоты повышения pAkt в опухоли, чувствительной к препаратам платины, с платинорезистентными и платинорефрактерными опухолями выявлено не было (рис. 4).

Наблюдается тенденция к повышению уровня Bcl-2 в платиночувствительных опухолях по сравнению с платинорезистентными образцами, а также в платинорезистентных опухолях по сравнению с платинорефрактерными образцами, однако статистической значимости отличия не достигают (см. табл. 5). При этом уровень Bcl-2 в опухолевой ткани слабо, но достоверно, коррелировал с чувствительностью к препаратам платины ($r=0,23$; $p<0,05$).

Выводы.

Таким образом, нам удалось продемонстрировать, что уровень VEGF, его рецепторов и антиапоптотического белка Bcl-2 достоверно выше в 73—85% опухолей по сравнению с окружающими гистологически неизменными тканями яичника, при этом увеличение уровня pAkt, одного из эффекторов VEGF, выявлено лишь в половине исследованных опухолей. Уже на ранних стадиях заболевания обнаружена способность опухоли к повышенной продукции VEGF и, по-видимому, его рецептора 1-го типа, что, по мнению многих авторов, является показателем плохого прогноза заболевания и высокого риска образования метастазов.

Напротив, тенденция к увеличению уровня как pAkt, так и Bcl-2 проявляется на более поздних клинических стадиях и взаимосвязана со значительной распространенностью процесса. Продемонстрированная достоверная корреляция содержания VEGF в опухолевой ткани с уровнями VEGFR-1 и VEGFR-2 может указывать на возможную коэкспрессию некоторых компонентов сигнального пути VEGF в клетках РЯ и их аутокринную роль. В целом результаты нашего исследования косвенно свидетельствуют о координированной активации VEGF-зависимых механизмов в опухоли. Обнаружена взаимосвязь компонентов сигнального пути VEGF с чувствительностью опухоли к препаратам платины: уровни VEGF и VEGFR-2 были повышены в платинорезистентных опухолях, наблюдалась также тенденция к увеличению содержания VEGF в платинорефрактерных образцах ткани яичников. Уровни как pAkt, так и Bcl-2 достоверно коррелировали с платиночувствительностью РЯ, при этом выявлена тенденция к увеличению этих показателей в опухолях, чувствительных к препаратам платины. Тенденция к увеличению содержания pAkt проявлялась в платинорезистентных опухолях, а частота повышения pAkt в опухолях больных этой группы достоверно возрастала.

По-видимому, утрата опухолью чувствительности к платине может быть ассоциирована в некоторых случаях с повышенной продукцией ангиогенных факторов, их рецепторов, а также с изменениями в балансе между белками, регулирующими апоптоз и выживаемость клеток. Обнаруженное нами отсутствие взаимосвязи между показателями тканевой экспрессии двух типов рецепторов VEGF подтверждает высказанные ранее предположения о разной роли VEGFR-1 и VEGFR-2 в ангиогенезе и опухолевом росте. В то же время продемонстрированная нами на клиническом материале корреляция уровня pAkt с платиночувствительностью РЯ и тенденция к повышению этого показателя в платинорезистентных и платинорефрактерных опухолях яичников согласуется с данными экспериментальных работ по исследованию рака молочной железы, где повышенный уровень pAkt рассматривается некоторыми авторами как фактор, определяющий неблагоприятный прогноз химио- и гормонотерапии рака грудной железы, а также свидетельствующий о резистентности к герцептину.

Таким образом, компоненты сигнального пути VEGF являются достаточно перспективными биомаркерами РЯ не только в качестве показателей неоангиогенеза, но и в качестве возможных факторов прогноза эффективности химиотерапии.

Литература:

1. Аксель М. А., Баринов В. В., Бокина Л. И.. Лекции по онкогинекологии. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 425 с.
2. Бохман Я. В. Лекции по онкогинекологии. – М.: МИА, 2007. – 304 с.
3. Винокуров В. Л. Рак яичников: закономерности метастазирования и выбор адекватного лечения больных. – СПб: Фолиант, 2004. – 333 с.
4. Генетика пухлин жіночих репродуктивних органів / За ред. В. М. Запорожана. — Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2004. — 332 с.

5. Запорожан В. М., Цегельський М. Р. Гінекологічна патологія: Атлас: Навч. Посібник. – Одеса: ОДМУ, 2002. – 308 с.
6. Клиническая онкогинекология / под ред. В.П. Козаченко. – М.: Медицина, 2005. – 376с.: ил.
7. Корман Д. Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. – М.: Практическая медицина. – 2006. – 503 с.
8. Онкология: национальное руководство / Под ред. В. И. Чиссова, М. И. Давыдова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1072 с.
9. Урманчева А. Ф., Тюляндина С. А., Моисеенко В. М. Практическая онкогинекология: избранные лекции. - СПб.: «ТОММ», 2008. – 400 с.
10. Химиотерапия злокачественных новообразований / Под ред. Э. Чу и В. Т. де Вита (перевод с англ.) – М.: Практика. – 2008. – 447 с.
11. Щепотин И. Б., Бондарь Г. В., Ганул В. Л. Алгоритмы современной онкологии. – Киев: Книга плюс, 2006. - 304 с.
12. Щербakov А. М., Герштейн Е. С., Анурова О. А., Кушлинский Н. Е. Фактор роста эндотелия сосудов, его рецепторы и антиапоптотические белки pAkt и Bcl-2 у больных раком молочной железы // Маммология. – 2006. - № 3. – С. 25-33.
13. Экспериментальная онкология на рубеже веков. /Под ред. М.Н. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: издат. группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – 550 с.
14. Brustmann, H. Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with topoisomerase II alpha and prognosis // Gynecol Oncolю – 2004ю- Vol. 95.- P. 16 - 22.
15. Burger R. A. Overview of anti - angiogenic agents in development for ovarian cancer // Gynecol Oncol. – 201.- Vol. 121.- N 11. P. 230 - 238.
16. Numnum T. M., Rocconi R. P., Whitworth J., Barnes M. N. The use of bevacizumab to palliate symptomatic ascites in patients with refractory ovarian carcinoma // Gynecol Oncol .- . 2006. – Vol.102. – P.425 - 428.
17. Spannuth W. A., Nick A. M., Jennings N. B., Armaiz-Pena et al. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells // Int J Cancer. – 2009. – Vol. 124. – P. 1045 - 1053.
18. Teoh D. G., Secord A. A. Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer // Cancer Control. – 2011. –Vol. 18. – P.31 - 43.

Работа поступила в редакцию 10.08.2013 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования