

Л.Г. Бучинська
В.М. Грінкевич
Н.П. Юрченко
Л.І. Воробйова

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

ДУ «Національний інститут
раку»

Національний медичний
університет ім. О.О. Богомольця,
Київ, Україна

Ключові слова: рак яєчника,
VEGF, *p53*, щільність
мікросудин (*CD34*) у пухлині, вік
пацієнток, виживаність.

ЕКСПРЕСІЯ *p53*, *VEGF* ТА *CD34* У ПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ ТА ВИЖИВАНІСТЬ ХВОРИХ НА СЕРОЗНИЙ РАК ЯЄЧНИКА

Резюме. У операційному матеріалі хворих на рак яєчника (РЯ) досліджено експресію білків *p53* і *VEGF*, а також щільність мікросудин (ЩМС) (за експресією *CD34*). Виявлено залежність експресії перелічених маркерів від стадії захворювання та віку хворих. Показано, що у РЯ хворих репродуктивного віку досліджені показники вищі, ніж у пацієнток у менопаузальний період. При цьому загальна безрецидивна виживаність перших (пацієнтки віком молодше 45 років) була вірогідно меншою, ніж других (хворі віком старше 45 років). Встановлено, що незалежно від віку хворих експресія *p53*, *VEGF*, а також ЩМС у пацієнток, які прожили більше 5 років, були вірогідно нижчими, ніж у тих, які прожили 5 і менше років. Комплекс досліджених показників є перспективним для прогнозу перебігу серозного РЯ.

ВСТУП

Ангіогенез відіграє важливу роль у розвитку пухлини і є складним процесом, у регуляції якого бере участь низка біологічно активних речовин. Зокрема, до стимуляторів судиноутворення у пухлинах належать різноманітні фактори росту з ангіогенною активністю, які продукують як клітини пухлини і її мікрооточення, так і безпосередньо ендотеліальні клітини. Ключова роль серед активаторів ангіогенезу належить *VEGF* — потужному мітогенному фактору ендотеліальних клітин, який стимулює не тільки проліферацію, а й міграцію клітин ендотелію і утворення трубчастих структур. Вважається, що саме цей фактор є специфічним медіатором, що забезпечує підвищену проникність судин у пухлинах [1]. Об'єктивним показником, що характеризує ангіогенез у пухлині, є щільність мікросудин (ЩМС), яка може бути визначена за експресією таких маркерів як фактор Віллебранда, антигени *CD31* та *CD34* [2]. Слід зазначити, що *CD34* не експресується ендотеліоцитами великих артерій та вен, що дає можливість його використання саме як маркера новоутворених кровеносних судин [3].

Значне місце серед негативних регуляторів ангіогенезу займає білок *p53*, який окрім своїх безпосередніх функцій пухлинного супресора та «охоронця геному» відіграє важливу роль у регуляції неоангіогенезу, оскільки активує експресію інгібіторів ангіогенезу. До останніх належать тромбоспондини-1, -2, ангіостатин, ендостатин, вазостатин та інші, що запобігають росту кровеносних судин [4]. Поряд з цим білок *p53* може опосередковано регулювати експресію *VEGF* як через протоонкоген *c-Src*, так і при безпосередній взаємодії з транскрипційним фактором Sp1, перешкоджаючи таким чином активації промотора цього гена. Показано, що мутаційні зміни гена *TP53* призводять до одночасного

підвищення експресії *c-Src* та мРНК *VEGF* у хворих на рак молочної залози, товстого кишечника і рак яєчника (РЯ) [5].

Розглядаючи особливості неоангіогенезу пухлин яєчника, слід відзначити, що на сьогодні це питання ще недостатньо досліджене. Зокрема, показано певний зв'язок експресії *p53* і маркерів ангіогенезу з прогнозом перебігу процесу при I стадії РЯ [6]. Відомостей щодо прогностичної ролі цих маркерів при більш пізніх стадіях захворювання в доступній літературі ми не знайшли. Крім того, не однозначно є оцінка значення ЩМС для перебігу РЯ. Так, на думку одних дослідників, активація ангіогенезу у новоутвореннях яєчника супроводжується підвищеною здатністю пухлини до швидкого росту, інвазії та метастазування [7]. Інші автори, навпаки, вважають фактором несприятливого прогнозу РЯ низьку ЩМС у зв'язку з гіпоксією пухлини, яка виникає в цьому випадку і зумовлює надзвичайну агресивність останньої [8].

Мета роботи полягала у зіставленні експресії *p53* та *VEGF*, а також ЩМС у серозних новоутвореннях яєчника з клінічними характеристиками (вік, стадія захворювання) та тривалістю життя хворих.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження було виконано на операційному матеріалі 46 хворих на РЯ віком 36–74 роки (середній вік становив $48,2 \pm 7,3$ року). Усі хворі були розподілені на дві вікові групи: група I — ≤ 45 років (репродуктивний вік) — 20 (43,5%) пацієнток, група II — > 45 років — 26 (56,5%); у групу II увійшли пацієнтки в перименопаузальний та менопаузальний період. При аналізі результатів враховували стадію захворювання за FIGO та виживаність хворих після операції. Ці дані отримували при вивченні історій хвороби та амбулаторних карт пацієнток. Усі пацієнтки одержували лі-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

кування в період з 1988 по 2007 р. у відділенні онкогінекології (керівник — докт. мед. наук, проф. Л.І. Воробйова) Інституту онкології АМН України (нині ДУ «Національний інститут раку»). Неoad'юванту терапію у обстежених хворих не проводили.

Морфологічну верифікацію діагнозу здійснювали шляхом дослідження гістологічних препаратів, забарвлених гематоксиліном та еозином. Імуногістохімічне виявлення p53 і маркерів ангиогенезу проводили на паралельних депарафінованих зрізах з використанням відповідних MkAT та системи візуалізації («Dako Cytomation», Данія): MkAT до p53, клон DO-7; VEGF, клон VG1; CD34, клон QVEnd10. Для візуалізації застосовували систему EnVision; забарвлення здійснювали за допомогою хромогену-3-діамінобензидину тетраглідриду. Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра. У кожному випадку аналізували по 600–1000 пухлинних клітин. Результати імуногістохімічної реакції по виявленню VEGF та p53 оцінювали напівкількісним методом шляхом визначення кількості позитивно забарвлених клітин — індекс мітки (ІМ, %). Для оцінки ЩМС у пухлинах яєчника підраховували кількість забарвлених судин в 10 полях зору (розмір одного поля зору обмежувався вимірювальною квадратною сіткою зі стороною 0,79 мм) з наступним визначенням їх числа на площі 1 мм² за формулою: ЩМС = n/0,625 мм², де n — середня кількість судин на одне поле зору; 0,625 мм² — площа одного поля зору.

Аналіз отриманих результатів проводили методом описової статистики, порівняння вибірок (U-критерій Манна — Уїтні) — за допомогою програми STATISTICA 6. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$. Аналіз виживаності проводили за допомогою методу Каплана — Майєра, достовірність відмінностей між кривими виживаності визначали за Соx-тестом [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імуногістохімічне дослідження експресії білків p53 та VEGF показало, що експресію p53 (винятково ядерну) відзначали у 94% пухлин; VEGF виявляли лише у цитоплазмі у 67% новоутворень. CD34 експресували плазматичні мембрани ендотеліоцитів; CD34⁺-судини були виявлені в усіх досліджених пухлинах.

Зіставлення досліджених показників у хворих з різною стадією РЯ виявило певні закономірності (рис. 1).

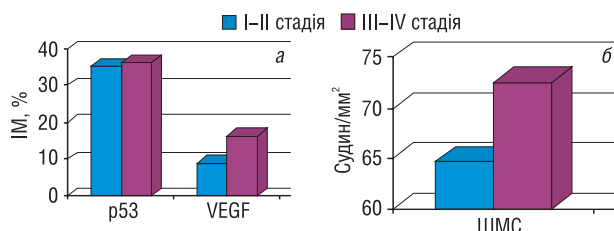


Рис. 1. Експресія p53 і VEGF (а) та ЩМС (б) у пухлинах хворих з різними стадіями РЯ

Експресія p53 практично не залежала від стадії захворювання (ІМ становив $35,2 \pm 0,5\%$ при I–II ст. РЯ та $36,4 \pm 0,5\%$ — при III–IV ст.), тоді як експресія VEGF була майже удвічі вищою у пухлинах хворих з III–IV ст. порівняно з такою при I–II ст. РЯ ($16,5 \pm 0,3$ проти $9,0 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$). Аналогічним чином, але менш виразно, змінювалася ЩМС: спостерігали тенденцію до її підвищення у пухлинах хворих з III–IV ст. РЯ ($72,5 \pm 3,8$ проти $64,7 \pm 3,5$ судин/мм² при РЯ I–II ст., $p > 0,05$) (див. рис. 1).

При аналізі маркерів васкуляризації залежно від збереження менструальної функції пацієнток (незалежно від віку) встановлено, що у жінок у менопаузальний період ЩМС ($58,1 \pm 3,1$ судин/мм²) та експресія VEGF ($7,0 \pm 0,4\%$) були вірогідно нижчими ($p < 0,05$), ніж у пацієнток зі збереженою менструальною функцією (відповідно $76,4 \pm 5,2$ судин/мм² та $17,0 \pm 0,2\%$). Виявлена розбіжність може бути пов'язана з підвищеним рівнем у жінок репродуктивного віку стероїдних гормонів (зокрема естрогенів), які згідно з даними літератури активують експресію гена VEGF [11, 12]. У той же час у хворих у менопаузальний період виявлено більшу експресію p53 ($38,2 \pm 0,6$ проти $34,3 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$) (рис. 2).

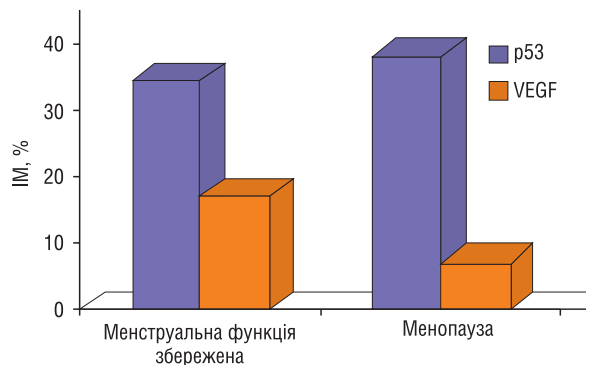


Рис. 2. Експресія p53 та VEGF у хворих на РЯ залежно від стану менструальної функції

При зіставленні тривалості життя хворих після операції з експресією досліджених маркерів та ЩМС встановлено, що у хворих, які прожили 5 і менше років, експресія p53 і VEGF, а також ЩМС були вірогідно вищими порівняно з такими у хворих, які прожили більше 5 років (табл. 1).

Таблиця 1
Експресія p53, VEGF та ЩМС у пухлинах хворих з різною тривалістю життя

Тривалість життя	Експресія		ЩМС, судин/мм ²
	p53, ІМ, %	VEGF, ІМ, %	
Більше 5 років	$30,2 \pm 0,2$	$13,3 \pm 0,6$	$44,8 \pm 4,3$
5 років і менше	$37,8 \pm 0,8^*$	$21,3 \pm 0,3^*$	$67,5 \pm 4,1^*$

* $p < 0,05$.

Отримані дані співпадають з результатами інших дослідників, згідно з якими при низькій ЩМС у епітеліальних злоякісних пухлинах яєчника 5-річна виживаність пацієнток збільшується незалежно від стадії захворювання [10].

Ми провели також порівняльний аналіз досліджених показників, враховуючи одночасно вік пацієнток та термін їх життя після операції (табл. 2).

Таблиця 2

Експресія p53, VEGF та ЩМС у пухлинах хворих на РЯ залежно від віку та термінів виживаності пацієнтів

Тривалість життя	Вік пацієнток, роки	Досліджені показники		
		p53, IM, %	VEGF, IM, %	ЩМС, судин/мм ²
Більше 5 років	≤ 45	29,2 ± 0,5**	12,3 ± 0,4**	59,9 ± 4,6
	> 45	35,3 ± 0,5	6,5 ± 0,2	58,0 ± 4,5
5 років і менше	≤ 45	37,1 ± 0,6*,**	23,2 ± 0,7*,**	79,5 ± 5,8*
	> 45	41,0 ± 0,6*	12,3 ± 0,4*	60,3 ± 6,5

*p < 0,05 у межах однієї вікової групи залежно від тривалості життя;

**p < 0,05 у межах однієї градації тривалості життя залежно від віку пацієнток.

Такому аналізу передувало визначення виживаності хворих залежно від віку. Було встановлено, що 5-річна виживаність пацієнток, які захворіли у віці старше 45 років (група II) складала 47%, у той час як у хворих репродуктивного віку (група I) лише 18% (p = 0,02) (рис. 3).

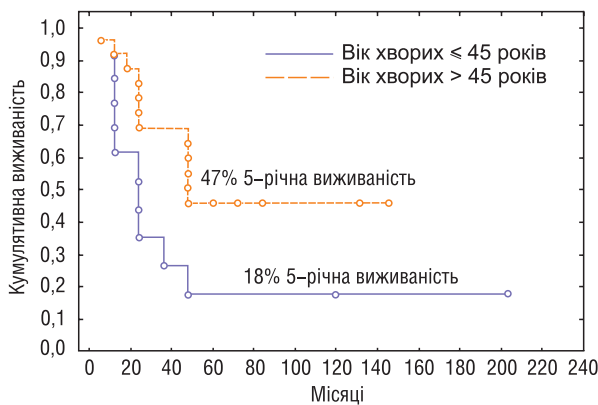


Рис. 3. Криві виживаності хворих на РЯ залежно від віку пацієнток

При цьому в групі II експресія VEGF та ЩМС становила в середньому $13,9 \pm 0,5\%$ та $62,6 \pm 3,9$ судин/мм², а у групі I відповідно $18,4 \pm 0,4\%$ та $64,4 \pm 4,1$ судин/мм² (p > 0,05).

Як видно з табл. 2, у пухлинах хворих репродуктивного віку (≤ 45 років), які прожили після операції більше 5 років, експресія p53 була достовірно нижчою, ніж у хворих, тривалість життя яких не перевищувала 5 років ($29,2 \pm 0,5$ проти $37,1 \pm 0,6\%$, p < 0,05). У хворих віком старше 45 років відзначали аналогічну закономірність: експресія p53 була нижчою у пацієнток, що прожили більше 5 років ($35,3 \pm 0,5$ проти $41,0 \pm 0,6\%$, p < 0,05 відповідно). У той же час аналіз у межах однієї градації тривалості життя показав, що як у групі пацієнток, які прожили більше 5 років, так і у групі з тривалістю життя 5 і менше років експресія p53 була достовірно нижчою у хворих віком до 45 років порівняно з такою у пацієнток старше 45 років. Експресія VEGF незалежно від вікової групи (до 45 або старше 45 років) була достовірно нижчою у хворих, термін життя яких не перевищив 5 років: в 1,9 раза при обох варіантах порівняння. При аналізі залежності цього показника від віку пацієнток у межах однієї градації тривалості життя виявилось, що в обох випадках експресія VEGF у пухлинах хворих віком старше 45 років була достовірно нижчою за таку у хворих віком до 45 років (при тривалості життя більше 5 років — $6,5 \pm 0,2$ проти

$12,3 \pm 0,4\%$ (p < 0,05), 5 років і менше — $12,3 \pm 0,4$ проти $23,2 \pm 0,7\%$ (p < 0,05) відповідно). ЩМС у пухлинах хворих віком до 45 років, які прожили 5 років і менше, була достовірно вищою, ніж у хворих аналогічного віку, тривалість життя яких перевищила 5 років; у хворих віком старше 45 років достовірна різниця ЩМС залежно від тривалості життя була відсутня. Не виявлено також вірогідної різниці показників ЩМС у пацієнток різних вікових груп у межах однієї градації тривалості життя. За сукупністю результатів, наведених в табл. 2, можливо підсумувати, що: 1 — за умови більш високого рівня експресії досліджених маркерів тривалість життя пацієнток була меншою; 2 — незалежно від тривалості життя експресія VEGF і показник ЩМС були вищими у пацієнток віком до 45 років, експресія p53, навпаки, у пацієнток віком старше 45 років.

Аналіз індивідуальних даних про тривалість життя пацієнток дозволив визначити медіану ЩМС, що має прогностичне значення та може бути точкою розподілу хворих на прогностичні групи. Медіана (при градації виживаності — більше 5 років або 5 років і менше) дорівнювала $59,0$ судин/мм². У групі хворих, у пухлинах яких ЩМС була меншою за медіану, кумулятивна 5-річна виживаність складала $63,0\%$ і була вірогідно більшою порівняно з такою $51,0\%$ (p < 0,05) у групі пацієнток, у яких ЩМС була вище медіани (рис. 4).

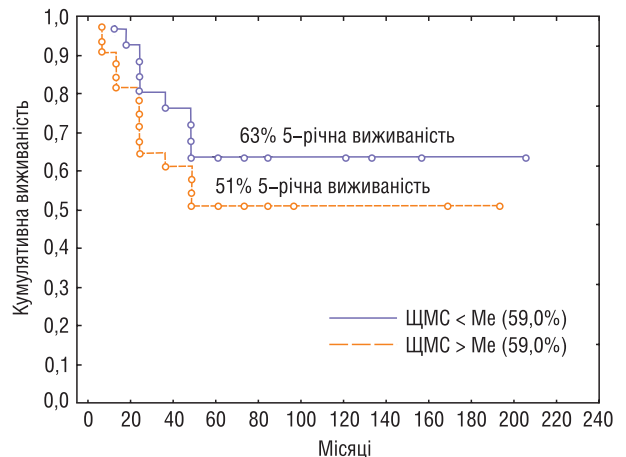


Рис. 4. Криві виживаності хворих на РЯ за Капланом — Майером (розподіл хворих відповідно медіани ЩМС у пухлинах)

Як можливі механізми підвищення ЩМС у пухлинах хворих доцільно згадати, перш за все, посилену продукцією VEGF, що може бути пов'язана як з гіпоксією новоутворення, так і з підвищенням вмісту макрофагів у пухлинному мікрооточенні [13]; поряд з цим мутаційні зміни гена-супересора TP53 призводять до порушення його інгібуючої дії на VEGF [14, 15].

ВИСНОВКИ

1. Виявлено залежність експресії p53, VEGF та ЩМС у РЯ від віку хворих та стадії захворювання.
2. Встановлено, що у хворих, термін життя яких менше 5 років після операції, ЩМС у пухлинах і експресія p53 та VEGF були достовірно вищими порів-

няно з такими у пухлинах хворих, що були живі після операції більше 5 років.

3. Показано, що у хворих віком до 45 років експресія VEGF та ЩМС вірогідно перевищують такі у пацієнток у менопаузальний період; тенденцію до підвищення експресії p53 виявлено у хворих у менопаузальний період.

4. Загальна безрецидивна виживаність хворих віком старше 45 років була вірогідно вищою, що є підґрунтям для визначення віку хворих як незалежного фактора прогнозу РЯ.

5. Комплекс показників, що відображають інтенсивність васкуляризації — ЩМС, експресія VEGF та p53 є перспективними для оцінки перебігу серозного РЯ і можуть бути використані в якості прогностичних маркерів пухлинного процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Канцерогенез / Под ред ДГ Заридзе / Москва: Медицина, 2004. 576 с.
2. **Pal S, Datta Mukhopadhyay KD.** Central Role of p53 on Regulation of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) Expression in Mammary Carcinoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 6952–7.
3. **Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP.** Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; **55**: 6161–5.
4. **Michael J, Goodheart M, Rose L, et al.** The Relationship of Molecular Markers of p53 Function and Angiogenesis to Prognosis of Stage I Epithelial Ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11** (10): 3733–42.
5. **Kohn EC.** Angiogenesis in Ovarian carcinoma. *Cancer* 1997; **80** (12): 1452–63.
6. **Petzelbauer P, Halama T, Groger M.** Endothelial adherens junctions. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000; **5**: 13–21.
7. **Brown MR, Blanchette JO, Kohn EC.** Angiogenesis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **14** (6): 901–18.
8. **Bamberger ES, Perrett CW.** Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol* 2002; **55**: 348–59.
9. **Kaplan EL, Meier PN.** Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; **53**: 457–81.
10. **Chan JK, Loizzi V, Lin F, et al.** Stages III and IV invasive epithelial ovarian carcinoma in younger versus older women: what prognostic factors are important? *Obst Gynecol* 2003; **102**: 156–61.
11. **Boussat S, Eddahibi S, Coste A, et al.** Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279** (2): 371–8.

12. **Сметник ВП.** Системные изменения у женщин в кли-мактерии. *Рус мед журн* 2001; **9** (9): 354–8.

13. **Крючков АН, Фрейд ГТ.** Неоангиогенез и плотность сети микрососудов в раке молочной железы. *Арх патологии* 2008; **70** (1): 62–5.

14. **Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, et al.** Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 2000; **14**: 34–44.

15. **Черноглазова ЕВ, Дбар ЖН, Степанова ЕВ.** Молекулярные механизмы опухолевого неоангиогенеза. *Успехи соврем биол* 2004; **124** (5): 480–8.

p53, VEGF, AND CD34 EXPRESSION IN TUMOR TISSUES AND SURVIVAL OF PATIENTS WITH ADVANCED OVARIAN CARCINOMA

L.G. Buchynska, V.M. Grinkevych, N.P. Yurchenko, L.I. Vorobjova

Summary. Expression of p53 and VEGF as well as microvessel density (MD) (bases on CD34 expression) was assessed in surgery material of patients with ovarian carcinoma (OC). Expression of the above-listed markers was shown to depend on the stage of disease and age of patients. It was established that assessed indicators are higher in OC patients of reproductive age compared to menopausal patients. The overall relapse-free survival was significantly less in the former (patients under 45 years of age) compared to the latter (patients aged 45 years and over). It was shown that p53 and VEGF expression as well as MD were lower in patients who lived more than 5 years compared to those who lived less than 5 years (regardless of age). The set of indicators assessed in this study is a promising predictor of the course of disease in OC patients.

Key Words: ovarian carcinoma, VEGF, p53, microvessel density (CD34) in tumor, age of patients, survival.

Адреса для листування:

Бучинська Л.Г.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: lubov@onconet.kiev.ua