

С.П. Меренцев
И.А. Лисняк
Д.С. Осинский
Т.К. Сергиенко

Институт
экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины

Институт онкологии
АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: фактор
роста эндотелия сосудов,
рак желудка, оперативное
вмешательство, прогноз.

УРОВЕНЬ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Резюме. Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) обеспечивает васкуляризацию ткани, в частности опухолевой, что необходимо для прогрессирования заболевания. Цель исследования — определение уровня ФРЭС в сыворотке крови больных раком желудка (РЖ) и оценка его связи с клиническими характеристиками, так как литературные данные противоречивы. Уровень ФРЭС определяли иммуноферментным методом у 138 пациентов с РЖ (I–IV стадия), подвергнутых оперативному вмешательству. Уровень ФРЭС в сыворотке крови пациентов с РЖ значительно выше, чем у доноров. Не выявлена связь уровня ФРЭС с клинико-патологическими характеристиками опухолевого процесса. Установлено, что содержание ФРЭС в сыворотке крови выше медианы ($> 290,0$ нг/мл) до операции может свидетельствовать о неблагоприятном течении заболевания. Повышение уровня ФРЭС через определенное время после операции по отношению к послеоперационному уровню свидетельствует о рецидивировании и/или начале развития метастазов. Контроль изменений уровня ФРЭС в сыворотке крови после операции можно использовать для мониторинга больных с РЖ с целью раннего выявления начала прогрессирования процесса.

ВВЕДЕНИЕ

Ангиогенез или образование новых капилляров из существующих кровеносных сосудов крайне необходим для роста солидных опухолей и развития метастазов [1, 2]. Признано также, что образование микрососудов вокруг опухоли стимулируется разнообразными ангиогенными факторами, секретируемыми опухолевыми клетками [3]. Среди этих факторов фактор роста эндотелия сосудов (**vascular endothelial growth factor — VEGF**) (ФРЭС) — один из наиболее активных промоторов ангиогенеза в опухолях, в частности опухолях желудочно-кишечного тракта [2, 4, 5]. Установлена значительная корреляция между количеством микрососудов опухоли и экспрессией ФРЭС в опухолевых клетках [4]. ФРЭС является димерным, гепаринсвязанным гликопротеином, который функционирует как потенциальный митоген эндотелиальных клеток сосудов, создавая условия для их миграции и организации неоваскуляризации микроместатазов. ФРЭС существует в 4-х изоформах, из которых только ФРЭС₁₂₁ и ФРЭС₁₆₅ секретируются в растворимой форме, тогда как ФРЭС₁₈₉ и ФРЭС₂₀₆ связаны с гепаринсодержащими протеогликанами в экстраклеточном матриксе [4].

Кроме индукции ангиогенеза в опухолях, ФРЭС выполняет и ряд других функций, способствующих опухолевой прогрессии, в частности повышает проницаемость сосудов опухоли, индуцирует сериновые протеазы, ингибирует апоптоз эндотелиальных кле-

ток и обуславливает созревание дендритных клеток (цит. по [6]). Тот факт, что рост солидных опухолей и развитие метастазов зависят от ангиогенеза, предполагает возможное значение ангиогенных маркеров для прогноза заболевания. Повышенные уровни растворимых форм ФРЭС выявлены в сыворотке крови у больных онкологического профиля, особенно в диссеминированных стадиях. Есть данные о наличии корреляции между экспрессией ФРЭС в опухолях и степенью их злокачественности, в частности в злокачественных новообразованиях грудной железы [7], яичника [8], матки [9], головного мозга [10], почки и мочевого пузыря [11], толстой кишки [12], поджелудочной железы [13], желудка [14]. Установлено также, что экспрессия ФРЭС в опухолях желудка положительно коррелирует с вовлечением в опухолевый процесс сосудов, метастазированием в лимфатические узлы и печень, а у больных с ФРЭС-позитивными опухолями прогноз заболевания хуже, чем у пациентов с ФРЭС-негативными новообразованиями (цит. по [6]).

Показано наличие взаимосвязи между концентрацией ФРЭС в сыворотке крови и развитием метастазов, а также неблагоприятным течением заболевания у больных раком грудной железы [15], яичника [16], шейки матки [17], мелкоклеточным раком легкого [18], немелкоклеточным раком легкого [19], опухолями головы и шеи [20], светлоклеточным раком почки [21], остеосаркомой [22], раком пищевода [23], гепатоцеллюлярной карциномой [24], колорек-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

тальным раком [25], раком поджелудочной железы [26] и раком желудка (РЖ) [6, 27–31]. В то же время данные о клиническом и прогностическом значении высокого уровня ФРЭС в сыворотке крови больных с РЖ несколько противоречивы, хотя есть информация о том, что определение уровня ФРЭС может быть полезно для клинического мониторинга.

Цель исследования — определение содержания ФРЭС в сыворотке крови больных с РЖ, установление его корреляции с клиническими характеристиками процесса и оценка клинического значения этого показателя.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы крови больных брали после информирования пациентов об исследовании и получения их согласия. В исследовании использован материал, полученный у пациентов с РЖ, получавших лечение в Институте онкологии АМН Украины и Городской онкологической больнице Киева. Всего обследовано 138 больных (53 женщины и 85 мужчин), средний возраст пациентов составил 59,7 (31–80) года. По стадиям в соответствии с классификацией UICC пациенты распределили таким образом: I стадия — 24 больных, II — 26, III — 57, IV — 31. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Периферическую венозную кровь брали утром (между 8.00 и 9.00) непосредственно перед операцией и помещали в стерильные пластиковые пробирки. Образцы крови подвергали коагуляции при комнатной температуре в течение 30 мин и потом центрифугировали при 3000 об./мин в течение 20 мин. Сыворотка сепарировалась, собиралась и сохранялась при -20°C до анализа. Повторные заборы крови брали на 10–12-й и 30-й день после операции. У некоторых больных заборы крови осуществляли через 6, 10 и 18 мес.

Содержание ФРЭС в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием поликлональных антител, полученных к ангиогенному фактору, и оценкой интенсивности окрашивания на фотометре «Multiscan» («Firm», USA) при длине волны 492 нм [32].

Выживаемость больных определяли методом Каплана — Майера, различия между кривыми выживаемости анализировали с помощью $\log\text{-rank}$ теста. Корреляционные связи оценивали с помощью коэффициента Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определили существенное различие между средними значениями уровня ФРЭС в сыворотке крови доноров и больных с РЖ: $59,5 \pm 7,0$ и $302,3 \pm 27,8$ нг/мл соответственно ($p < 0,001$). В то же время не отмечено различий между предоперационными уровнями ФРЭС в сыворотке крови у пациентов с РЖ и клинико-патологическими показателями (табл. 1). Отмечали тенденцию к повышению уровня ФРЭС в сыворотке крови у больных с раз-

витой стадией процесса и опухолями больших размеров. Полученные результаты частично расходятся с данными А. Karayiannakis и соавторов [28], которые показали наличие значительной корреляции между уровнем ФРЭС в сыворотке крови и стадией опухолевого процесса, в частности наличием отдаленных метастазов, хотя с остальными показателями уровень ФРЭС не коррелировал, как и в работе М. Ohta и соавторов [6].

Таблица 1
Уровень ФРЭС в сыворотке крови и клинико-патологические характеристики больных с РЖ

Клинико-патологические характеристики	Количество больных (138)	Уровень ФРЭС в сыворотке, нг/мл, (302, 3 (232–414))
Локализация опухоли		
Верхняя треть	17	309,5 (265–398)
Средняя треть	39	292,0 (240–408)
Нижняя треть	73	300,7 (232–396)
Тотальное поражение	9	273,7 (240–345)
Гистология		
Аденокарцинома	97	296,2 (232–408)
Слизистый рак	7	292,5 (240–345)
Перстневидноклеточный рак	15	302,5 (257–378)
Недифференцированный рак	19	313,2 (248–402)
Степень дифференцировки		
G1	5	307,8 (245–359)
G2	21	282,1 (232–325)
G3	32	297,4 (240–383)
G4	44	306,6 (240–408)
Стадия TNM		
I	24	298,4 (245–396)
II	26	292,8 (240–402)
III	57	306,8 (240–408)
IV	31	299,2 (240–414)
Опухоль (pT)		
T1	12	301,2 (253–359)
T2	21	287,6 (232–396)
T3	59	301,3 (240–402)
T4	46	306,2 (240–414)
Лимфатические узлы		
N0	62	293,4 (232–402)
N1-2	76	305,7 (240–414)
Отдаленные метастазы		
Нет	117	298,7 (232–408)
Есть	21	301,1 (240–414)

Примечание: количество больных в разделе «Степень дифференцировки» составляет 102, что объясняется выполнением у 36 больных эксплоративных и симптоматических операций, при которых не выполнен полный объем гистологических исследований.

Для определения эффекта хирургического вмешательства на уровень ФРЭС в сыворотке крови, этот уровень измеряли перед операцией, на 10–12-й и 30-й день после операции (всего таких больных 111). Радикальная резекция, включавшая субтотальную или тотальную гастрэктомию и удаление лимфатических узлов (D_2) выполнена 82 больным, у 56 пациентов выявлена нерезектабельная опухоль, что обусловило проведение этим пациентам паллиативных, эксплоративных или симптоматических операций. В группе радикально оперированных больных уровень ФРЭС в сыворотке крови на 10–12-й день после операции не изменялся и снижался на 30-й день ниже предоперационного уровня в среднем на 20–35 нг/мл. У нерадикально оперированных пациентов уровень ФРЭС практически не изменялся.

Таблица 2
Уровень ФРЭС в сыворотке крови и выживаемость больных с РЖ

Уровень ФРЭС (нг/мл)	Количество продолжающих жить больных/общее число больных	Количество умерших/общее число больных	Медиана продолжительности жизни умерших (нед)
≥ 290	32/59 (54,0%)	27/59 (46,0%)	33 (9–107)
< 290	39/57 (68,5%)	18/57 (31,5%)	28 (7–72)

Примечание: учтены больные, доступные наблюдению (116 пациентов).

По рекомендации М. Ohta и соавторов [6] все значения уровня ФРЭС в сыворотке крови разделены на две группы: высокого уровня, показатели которого выше медианы содержания ФРЭС в сыворотке крови (> 290,0 (232–414) нг/мл) и низкого — показатели ниже 290,0 (232–414) нг/мл (табл. 2). Установлено, что предоперационный уровень ФРЭС в определенной мере влияет на исход лечения, в частности это относится к количеству умерших и продолжающих жить больных. При этом медиана продолжительности жизни больных обеих групп оказалась практически одинакова.

При анализе 82 радикально оперированных больных выявлено: 22 пациента (26,85%) умерли за период 2–107 нед, из них 16 (72,7%) — в течение первого года после оперативного вмешательства, 5 (22,8%) — в течение 2-го, и 1 (4,5%) — в течение 3-го. Следует отметить, что не выявлена зависимость между предоперационным уровнем ФРЭС и выживаемостью больных, подвергнутых радикальной операции: из пациентов с высоким уровнем ФРЭС выше 290,0 нг/мл умерло 29%, с низким — 25% (рисунок). Также не установлена связь предоперационного уровня ФРЭС с выживаемостью пациентов, которым выполнены нерадикальные операции.

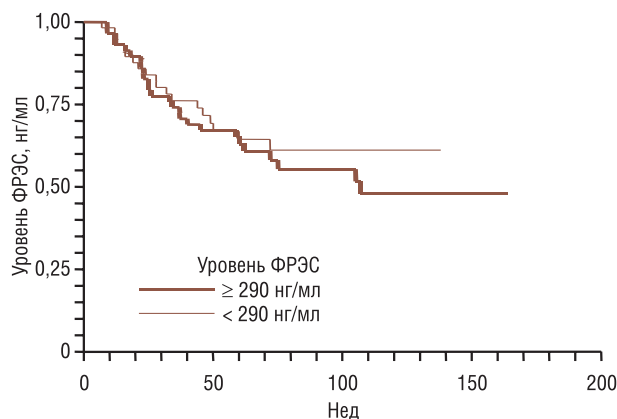


Рисунок. Общая выживаемость больных в зависимости от уровня ФРЭС в сыворотке крови ($p = 0,05$)

Установлено, что повышение со временем уровня ФРЭС выше медианы может свидетельствовать о скрытом продолжении опухолевого процесса, в частности рецидивировании. У больных, которым определяли уровень ФРЭС через 6, 12 и 18 мес, этот показатель выше медианы у 55% пациентов, из них у 65% отмечали пролонгацию опухолевого процесса в разные сроки наблюдения.

М. Ohta и соавторы [6] сообщили, что при разделении всей когорты значений уровня ФРЭС на низ-

кие и высокие (ниже и выше медианы) не выявляли корреляцию между продолжительностью безрецидивного периода с каким-либо уровнем ФРЭС, но в группе больных с высоким уровнем ФРЭС отмечена тенденция к более высокой частоте рецидивирования. Показано также, что высокий уровень ФРЭС в периферической крови является независимым прогностическим фактором, в частности фактором риска развития метастазов [6, 27–31] и может, по данным многофакторного анализа, предсказывать сниженную выживаемость [28], хотя уровни ФРЭС в сыворотке крови не коррелировали ни с одним из клинико-патологических показателей.

ВЫВОДЫ

1. Уровень ФРЭС в сыворотке крови у больных с РЖ значительно выше, чем у доноров.
2. Не выявлена связь уровня ФРЭС с клинико-патологическими характеристиками опухолевого процесса.
3. Уровень ФРЭС выше медианы (> 290,0 нг/мл) до операции может свидетельствовать о неблагоприятном течении заболевания.
4. Установлена определенная связь предоперационного уровня ФРЭС с выживаемостью больных, но она статистически недостоверна.
5. Повышение уровня ФРЭС в сыворотке крови больных после операции по отношению к послеоперационному уровню свидетельствует о рецидивировании и/или начале развития метастазов и может использоваться в качестве фактора мониторинга.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование выполнено при поддержке Программы Национальной академии наук Украины «Особенности функционирования онкогенома» (№ 0102U003228).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2451–60.
2. Garcea G, Lloyd TD, Gescher A, et al. Angiogenesis of gastrointestinal tumours and their metastases — a target for intervention? *Eur J Cancer* 2004; **40**: 1302–13.
3. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**: 353–64.
4. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001; **2**: 667–73.
5. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, et al. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 2003; **60**: 199–207.
6. Ohta M, Konno H, Tanaka T, et al. The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; **192**: 215–25.
7. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 716–21.

8. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, *et al.* Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2003; **88**: 237–44.
9. Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, *et al.* Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; **98**: 335–43.
10. Zhou Y-H, Tan F, Hess KR, Yung WKA. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 3369–75.
11. Brown LF, Berse B, Jackman RW, *et al.* Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; **143**: 1255–62.
12. Takahashi Y, Kitaday Y, Bucana CD, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 3964–8.
13. Seo Y, Baba H, Fukuda T, *et al.* High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; **88**: 2239–45.
14. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, *et al.* p53 and VEGF expression are independent predictors of tumors recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004; **90**: 206–15.
15. Coradini D, Boracchi P, Daidone MG, *et al.* Contribution of vascular endothelial growth factor to the Nottingham prognostic index in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 2001; **85**: 795–7.
16. Heffler LA, Zeilinger R, Frimm Ch, *et al.* Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; **103**: 512–7.
17. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005; **103**: 724–30.
18. Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pretreatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; **79**: 144–6.
19. Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; **98**: 1217–22.
20. Mineta H, Mirua K, Ogino T, *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2000; **86**: 775–81.
21. Feldman AL, Tamarkin L, Paciotti GF, *et al.* Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 4628–34.
22. Kaya M, Wada T, Kawaguchi S, *et al.* Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br J Cancer* 2002; **86**: 864–9.
23. Shimada Y, Takeda SI, Nabeya H, *et al.* Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; **92**: 663–9.
24. Poon RT-P, Lau CP-Y, Cheung S-T, *et al.* Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 3121–6.
25. De Vita F, Orbitura M, Lieto E, *et al.* Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004; **100**: 270–8.
26. Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett* 2003; **194**: 119–24.

27. Kitamura M, Toi M, Arai K, *et al.* Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of gastric cancer patients. *Oncol Rep* 1998; **5**: 1419–24.

28. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, *et al.* Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients. Correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg* 2002; **236**: 37–42.

29. Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; **33**: 21–7.

30. Konno H, Ohta M, Baba M, *et al.* The role of circulating IL-8 and VEGF protein in the progression of gastric cancer. *Cancer Sci* 2003; **94**: 735–40.

31. Kim HK, Song KS, Park YS, *et al.* Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 184–91.

32. Лісняк І.О. Неоваскуляризація і пухлинний ріст. Дис ... д-ра біол наук, Київ, 2004; 280 с.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR LEVELS IN THE SERUM OF GASTRIC CANCER PATIENTS

S.P. Merentsev, I.A. Lisnyak,
D.S. Osinsky, T.K. Sergienko

Summary. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays an important role in the vascularization of tissues, in particular tumor ones. This study was aimed to detect the level of VEGF in the serum of patients with gastric cancer (GC) and evaluate its correlation with pathological variables. Level of VEGF was measured by an enzyme linked immunosorbent assay in 138 patients with GC (I–IV Stage) and 10 healthy donors. Patients have been operated only without any previous treatment. Serum VEGF levels in gastric cancer patients were significantly higher than those in donors. No correlation was detected between VEGF levels and clinicopathological features of disease. It was shown that VEGF levels before operation $\geq 290,0$ ng/ml can be evaluated as nonfavourable factor. There was no significant correlation between VEGF levels and patients survival. The increase of VEGF levels after operation compared with preoperative levels can manifest the tumor recurrence and/or metastasis. Determination of serum VEGF levels after operation may be clinically useful for monitoring of patients for early detection of disease progression.*

Key Words: vascular endothelial growth factor, gastric cancer, surgery, prognosis.

Адрес для переписки:

Меренцев С.П.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, отдел модификации
противоопухолевой терапии