

М.І. Ломницька
Н.А. Володько
В.А. Барилка
С.І. Сушельницький
Б.Т. Білинський

Львівський національний
медичний університет

Інститут трансфузіології
і патології крові НАН України,
Львів, Україна

Людвіг Інститут дослідження
раку, Упсала, Швеція

Ключові слова: ангіогенез, рак
яєчника, ФНП- α , ТФР- β , p53,
BRCA1.

ЗВ'ЯЗОК АНГІОГЕНЕЗУ В КАРЦИНОМАХ ЯЄЧНИКА З ЕКСПРЕСІЄЮ p53 І BRCA1, ПРОДУКЦІЄЮ ФНП- α ТА ТФР- β

Резюме. Одночасно досліджували активність ангіогенезу, експресію p53 і BRCA1 в тканині пухлини яєчника, продукцію в первинних культурах тих же пухлин ФНП- α та ТФР- β , а також рівень цих цитокінів у крові пацієнток. Показано, що ФНП- α регулює внутрішньопухлинний ангіогенез при раку яєчника (РЯ) за принципом оберненого зв'язку: у низьких дозах стимулює ангіогенез, а у високих — пригнічує. За участю цього цитокіну створюється сприятливий дозовий фон для одночасної активації внутрішньопухлинного ангіогенезу та гематогенного метастатичного поширення РЯ. Між концентрацією ТФР- β в супернатантах первинних культур РЯ та мікроваскуляризацією пухлини зв'язку не виявлено, однак регуляція ТФР- β ангіогенезу може бути опосередкована активністю медіаторів внутрішньоклітинної передачі сигналу цитокіну. З активацією ангіогенезу в РЯ асоційовані низькі частота та рівень експресії білка BRCA1, а також гіперекспресія білка p53 у клітинах пухлини.

ВСТУП

Рак яєчника (РЯ) найчастіше є причиною смерті пацієнток з онкологічними захворюваннями статевих органів. Актуальним є вивчення додаткових параметрів, які б характеризували агресивність процесу, сприяли індивідуалізації лікування. До таких параметрів належать, зокрема, рівень і співвідношення продукції цитокінів, які впливають на інтенсивність ангіогенезу в пухлині [4–6]. При вивченні механізму розвитку мікросудин у тканині пухлини виявилось, що її клітини продукують як цитокіни з виключно проангіогенною активністю (ФРЕС, оФРФ, ЕФР, ІПФР), так і такі, що *in vitro* та *in vivo* здатні виявляти і про-, й антиангіогенну дію (ФНП- α , ТФР- β) [7, 8].

ФНП- α — плейотропний цитокін, який відіграє роль у низці фізіологічних процесів, а також при аутоімунних, інфекційних, онкологічних захворюваннях [9]. Як зазначено, зафіксована про- та антиангіогенна дія ФНП- α . Зокрема, ФНП- α опосередковує секрецію проангіогенних факторів (ІЛ-8, ФРЕС, оФРФ та ІЛ-6), стимулює ангіогенез *in vivo* у хоріоалантоїсній мембрані, роївці [10]. Водночас цей цитокін є потужним тригером апоптозу в ендотеліальних клітинах [11]; блокує базальний та стимульований оФРФ ріст ендотеліальних клітин аорти бика та ендотеліальних клітин вени пуповини плода людини [12], ангіогенез у роївці [13]. Ізольована перфузія метастатично ураженої печінки ФНП- α зумовила зниження ступеня мікроваскуляризації метастазів [14]. ФНП- α сам та у комбінації із хіміопрепаратами чинить селективну інгібуючу дію на судинну сітку злоякісних пухлин [15]. ТФР- β — цитокін, що пригнічує проліферацію ендотеліальних клітин та стромальних компонентів судин. Чимало авторів підтвердили, що ТФР- β пригнічує проліферацію та міграцію ендотеліоцитів *in vitro* [16]. Однак встанов-

лено і вплив ТФР- β як *in vitro*, так і *in vivo*, що стимулює ангіогенез [17]. Високий рівень експресії ТФР- β у тканині пухлини при РЯ людини асоціюється з високим ступенем мікроваскуляризації та високим рівнем експресії ФРЕС [18].

Як відомо, дисфункція генів 17-ї хромосоми відіграє важливу роль у розвитку РЯ (тумор-супресорних генів BRCA1 та p53) [19]. Білок BRCA1 є універсальним стабілізатором геному, забезпечує репарацію гомологічних рекомбінацій, з'єднання негомологічних кінців та репарації вирізків нуклеотидів, регулює транскрипцію [20]. Тривалий час із дисфункцією гена та білка BRCA1 пов'язували розвиток лише сімейного РЯ, однак вона притаманна і спорадичному РЯ, і низці інших злоякісних пухлин [21]. При злоякісних пухлинах не вивчали зв'язку білка BRCA1 із активністю ангіогенезу, однак в експерименті *in vitro* продемонстровано, що BRCA1 взаємодіє із ФРЕС, підвищує його експресію [22]. Підвищення вмісту мутованого та «дикого» білка p53 є характерним для деяких злоякісних пухлин [23]. Для РЯ характерні альтерації гена p53: втрата алелі, мутації, внаслідок чого продовжується період напіврозпаду відповідного білка та підвищується його накопичення [24]. Між типом мутації p53 та ступенем мікроваскуляризації (МВ) пухлини при РЯ, стадією захворювання існує прямий зв'язок [25]. Білок BRCA1 взаємодіє із білком p53, а пухлина із соматичною чи успадкованою мутацією BRCA1 характеризується і порушенням функції p53 [26].

Мета нашої роботи — дослідження зв'язку між продукцією ФНП- α та ТФР- β , рівнем експресії білків BRCA1 і p53 клітинами пухлини при РЯ та ступенем МВ пухлинної тканини.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено пухлини 52 пацієнток із РЯ (табл. 1). Середній вік пацієнток становив 55,6 року (від 32 до 75 років). Матеріал для дослідження одержували інтраопераційно.

Таблиця 1

Характеристика досліджуваної групи пацієнток за гістологічним типом пухлини та стадією захворювання (за FIGO)

Гістологічний тип РЯ	Кількість пацієнток, n (%)	Розподіл за стадією захворювання (n)			
		I	II	III	IV
Серозна аденокарцинома	14 (25)	1	1	11	1
Серозна папілярна аденокарцинома	23 (41)	5	4	11	3
Муцинозна аденокарцинома	7 (12,5)	4	0	3	0
Світлоклітинна аденокарцинома	3 (5,4)	0	0	3	0
Ендометріюдна аденокарцинома	2 (3,6)	1	0	1	0
Недиференційована аденокарцинома	7 (12,5)	0	3	3	1
Всього, n (%)	56	11 (19,6)	8 (14,3)	32 (57,1)	5 (8,9)

Імуногістохімічне дослідження. Зразки пухлини фіксували у 10% формаліні та парафінізували. Тканинні зрізи товщиною 4 мкм наносили на предметне скло, вкрите 0,5% желатином («Serva») із 0,4% $K(Cr(SO_4)_2)$, підсушували при 37 °С протягом 12 год, депарафінували та регідратували у серії ксилолів (I, II) по 5 хв та спиртів (96, 90, 80, 70, 50%) по 2 хв. Протравлення антигену фактора VIII проводили (8 ± 1 хв) у 5% проназі («DAKO Corporation, Carpinteria CA», USA) у 0,05 M Tris-HCl буфері (pH 7,2–7,6), а p53 — кип'ятінням у мікрохвильовій печі (800 W) 3 рази по 3 хв у 0,1 M Na-цитратному буфері (pH 6,0). Ендогенну пероксидазу інгібували 3% перексидом водню (5 ± 1 хв). Імуногістохімічне забарвлення проводили, використовуючи моноклональні антитіла (МкАТ) до фактора VIII — фон Віллебранда («DAKO») або до p53 (клон DO-7, «DAKO») протягом 15–20 хв та візуалізуючу систему LSAB[®]2 System («DAKO»). Зрізи дофарбовували гематоксиліном, промивали 37 mM NH_4OH та заклеювали DAKO Faramount. Усі етапи виконували при кімнатній температурі у вологій камері. Фактор VIII локалізується на поверхні та у цитоплазмі ендотеліальних клітин [27]. Кількість міросудин підраховували у 20 полях зору світлового мікроскопа ($\times 1350$). Ступінь експресії білка p53 визначали за відношенням кількості позитивно забарвлених ракових клітин до загальної кількості клітин у кожному із 10 полів зору ($\times 1500$). Експресію вважали негативною (0), якщо позитивна реакція не спостерігалась чи визначалась менш як у 10% клітин; слабким ступенем експресії (+) вважали позитивну реакцію у 10–25%, помірним ступенем (++) — у 25–50%, високим ступенем (+++) — понад 50% забарвлених клітин.

Досліджуючи експресію BRCA1, протравлення антигену проводили як для p53. Перед нанесенням первинного антитіла проводили блокування 20% козячою сироваткою 30 хв, після чого наносили антитіло до білка BRCA1 (H-100, «Santa Cruz») у розведенні 1 : 400 (фосфатний буфер з 20% сироватки,

pH 7,4) на 12 год при температурі 4 °С у вологій камері. Вторинне, кон'юговане з біотином антитіло у концентрації 1 : 500 наносили на 45 хв. Використовували VectorEliteABC — візуалізуючу систему (Vectastain). Ступінь експресії білка BRCA1 визначали за відношенням кількості позитивно забарвлених ракових клітин до загальної кількості клітин у кожному із 10 полів зору ($\times 750$): 0 — позитивна реакція не відзначалась чи визначалась менш як у 10% клітин; (+) — позитивна реакція у 10–30%, (++) — у 30–50%, (+++) — у понад 50% клітин.

Отримання супернатантів (Сн) первинних клітинних культур РЯ. Пухлинний матеріал забирали інтраопераційно у флакон із поживним середовищем (ПС): RPMI 1640 («Sigma») — 15,2 г/л, $NaHCO_3$ — 2,0 г/л, гентаміцин — 50,0 мкг/мл, NEPES — 25 мМ. Тканину подрібнювали скальпелем на шматочки 2×2 мм, вмішували у 0,02% розчин колагенази («Sigma») та ДНКазу (3,0 мкг/мл) у ПС і дезагрегували на магнітній мішалці протягом 25 хв при кімнатній температурі. Суспензію клітин фільтрували через капроновий фільтр і центрифугували при 1000 об/хв протягом 3 хв. Дезагрегацію, фільтрування та осадження клітин повторювали до отримання 3–5 порцій клітин. Клітини промивали ПС із 10% телячою ембріональною сироваткою (ТЕС) для інгібування колагенази, а потім — у безсироватковому ПС. Кількість та життєздатність клітин визначали рутинним методом після забарвлення 0,1% водним розчином трипанового синього. Первинну клітинну культуру (500 клітин/мл за умови життєздатності клітин $\geq 80\%$) інкубували у безсироватковому ПС при температурі 37 °С протягом 24 год, після чого Сн центрифугували 7 хв при 1500 об/хв та заморожували при температурі -20 °С [1].

Концентрацію ТФР- β в Сн та плазмі крові визначали біологічним методом за рівнем включення 3H -метилтимідину клітинами чутливої лінії епітеліоцитів легень норки ССL64. ССL64 культивували у ПС із 10% ТЕС, підтримували конфлюентність 50–60%, пересівали клітини через 3–4 дні. У 96-лунковий планшет розсівали по 100 мкл суспензії клітин концентрацією $8 \cdot 10^4$ клітин/мл та інкубували 12–14 год. Активували ТФР- β Сн: до 100 мкл Сн додавали 50 мкл 1 M HCl на 10 хв та нейтралізували 1,4 M NaOH у 0,7 M NEPES. Досліджувані зразки вносили до клітин у планшеті та інкубували протягом 24 год. За 4 год до завершення інкубації вносили 3H -метилтимідин до кінцевої концентрації 1 μ Ci/мл. Після інкубації клітини 2 рази промивали ФСБ, протягом 10 хв фіксували при кімнатній температурі у 5% трихлороцтовій кислоті та промивали етанолом, після чого висушували на повітрі. ДНК екстрагували при кімнатній температурі 0,1 M NaOH (100–200 мкл) протягом 20 хв. Екстракти переносили у віали, куди додавали по 7–9 мл сцинтиляційної рідини (ЖС-8, Харків) та у бета-лічильнику визначали кількість осциляцій на хвилину (срм), що відображає концентрацію ізотопу. Розраховували проліферативний потенціал (ПП): $ПП = \text{срм досліджу} / \text{срм}$

контролю. Концентрацію ТФР- β встановлювали за калібрувальною кривою, побудованою, як детально описано раніше, шляхом титрування в культурі SCL64 рекомбінантного ТФР- β людини [1].

Концентрацію ФНП- α в Сн та плазмі крові також визначали біологічним методом за рівнем включення ^3H -метилтимідину клітинами чутливої лінії трансформованих фібробластів L929 мишей. L929 культивували у ПС із 10% ТЕС при 70–80% конфлюентності. Для експерименту клітини у концентрації $8 \cdot 10^4$ клітин/мл розсівали у 96-лунковий планшет та інкубували протягом 12 год із ^3H -метилтимідином (1 $\mu\text{Ci}/\text{мл}$), після чого промивали фосфатним буфером та інкубували у ПС з актиноміцином Д (2 мкг/мл) протягом 1 год. Потім клітини знову промивали фосфатним буфером та вносили у лунки по 100 мкл досліджуваних Сн. Через 24 год надосад переносили у віали, куди додавали по 7–9 мл сцинтиляційної рідини ЖС-8 та вимірювали срм у бета-лічильнику. Концентрацію ФНП- α визначали, як описано раніше [1], за калібрувальною кривою із рекомбінантним ФНП- α , розраховуючи індекс цитотоксичності: $\text{ІЦ} = (\text{срм дослід} - \text{срм контролю 1}) : (\text{срм контролю 2} - \text{срм контролю 1})$, де контроль 1 — ПС культур без Сн, контроль 2 — лізат клітин після обробки 1 М NaOH.

Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Стьюдента t , критерію Пірсона χ^2 , показника достовірності p , коефіцієнта кореляції r .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ступінь МВ тканини РЯ не був однорідним, кількість мікросудин у 20 полях зору ($\times 1350$) коливалась від 24 до 156, патогістологічна характеристика мікросудин була різною. Тому для зручності аналізу всіх пацієнток за дискримінантною кількістю мікросудин — більше чи менше 75 — розділено на групи із високим (ВМВ) та низьким (НМВ) ступенем МВ (табл. 2). Ступінь МВ тканини РЯ зростав при прогресуванні захворювання. У ранніх стадіях захворювання (I–II FIGO) ступінь МВ був нижчим ($67,0 \pm 11,0$), ніж у поширених (III–IV FIGO) ($94,0 \pm 4,7$; $t = 2,11$; $p < 0,05$).

Концентрація ФНП- α у Сн (рисунок) первинних клітинних культур пухлини у пацієнток з ВМВ тканини становила $0,48 \pm 0,12$, а з НМВ — $1,20 \pm 0,24$ нг/мл ($r = 0,4913$, $p = 0,007$; $t = 2,66$, $p < 0,05$). Рівень ФНП- α у плазмі крові пацієнток з ВМВ тканини РЯ становив $0,82 \pm 0,20$, а у пацієнток з НМВ — не перевищував $0,14 \pm 0,06$ нг/мл ($r = 0,4293$, $p = 0,164$; $t = 3,24$, $p < 0,05$).

Таблиця 2
Середня кількість мікросудин у тканині РЯ при ВМВ та НМВ

Характеристика	Ступінь МВ		t	p
	НМВ (n = 29)	ВМВ (n = 27)		
Середня кількість мікросудин у 20 полях зору	$51,6 \pm 2,2$	$100,2 \pm 4,7$	9,34	$< 0,0001$
Калібр мікросудин	Більший за 1–2 ендотеліоцити, до мікросудин, що вміщують 8 еритроцитів	1–2 ендотеліоцити		
Утворення скупчень	Ні	Так		

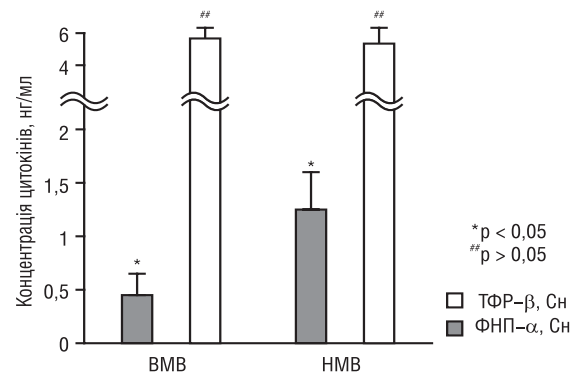


Рисунок. Концентрація ФНП- α та ТФР- β у Сн первинних культур РЯ з ВМВ та НМВ тканини пухлин

Концентрація активного ТФР- β (див. рисунок) у Сн первинних клітинних культур РЯ з ВМВ тканини становила $5,43 \pm 0,50$ нг/мл. Рівень ТФР- β у Сн первинних клітинних культур РЯ із НМВ майже не відрізнявся і становив $5,07 \pm 0,73$ ($t = 0,11$, $p > 0,5$). Концентрація ТФР- β у плазмі пацієнток з ВМВ тканини пухлини становила $5,03 \pm 0,35$, а з НМВ — $5,80 \pm 0,43$ нг/мл ($t = 1,40$, $p > 0,1$).

НМВ тканини РЯ асоціювалась із відсутністю експресії білка p53 у $2/3$ випадків (табл. 3), а із позитивною експресією помірного (++) та рідше сильного (+++) ступеня інтенсивності — у $1/3$ випадків. Натомість більш як у половини пацієнток з ВМВ тканини пухлини експресія p53 у клітинах пухлини була позитивною, найбільш часто сильною (+++).

Таблиця 3
Експресія білка p53 при НМВ та ВМВ тканини РЯ

Ступінь МВ	Співвідношення випадків експресії p53 різного ступеня інтенсивності, %				Кількість випадків позитивної експресії p53, %
	0	+	++	+++	
НМВ (n = 19)	63,4	0	26,3	10,3	36,6
ВМВ (n = 23)	43,5	4,3	17,4	34,8	56,5*

*При порівнянні НМВ і ВМВ РЯ $\chi^2 = 16,12$, $cc = 3$, $p = 0,001$.

У $2/3$ випадків РЯ I–II стадії експресії p53 не відбувається, в $1/3$ випадків вона була помірною (++) (табл. 4). Тканинні зрізи пухлини майже у 50% пацієнток із III–IV стадією захворювання характеризувались позитивною експресією p53, в основному помірною (++) або сильною (+++).

Таблиця 4
Експресія білка p53 при I–II та III–IV стадії РЯ

Стадія	Співвідношення випадків експресії p53 різного ступеня інтенсивності, %				Кількість випадків позитивної експресії p53, %
	0	+	++	+++	
I–II (n = 12)	66,7	0	33,3	0	33,3
III–IV (n = 29)	57,1	4,8	23,8	14,3	42,9*

*При порівнянні I–II та III–IV стадій РЯ $\chi^2 = 11,06$, $cc = 3$, $p < 0,05$.

Групи пацієнток із негативною та позитивною — від (+) до (+++) — експресією білка BRCA1 у клітинах РЯ відрізнялись за ступенем МВ тканини пухлини (тест Крускала—Валіса: $H = 7,2719$; $p = 0,0637$) (табл. 5). Тканина РЯ із НМВ характеризувалась переважанням позитивної експресії BRCA1, при цьому домінував слабкий (+) ступінь її інтенсивності. Натомість особливістю тканини РЯ із ВМВ була відсутність експресії білка BRCA1 у $2/3$ пацієнток. Експресія BRCA1 у клітинах РЯ відрізнялась

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

на початкових та поширених стадіях захворювання (тест Крускала—Валіса: $N = 10,68974$; $p = 0,0135$). При I–II стадії РЯ переважала позитивна експресія BRCA1, (від (+) до (+++)), при III–IV стадії позитивна експресія (переважно (+)) BRCA1 спостерігалась у $1/3$ випадків (табл. 6).

Таблиця 5
Експресія білка BRCA1 при НМВ та ВМВ тканини РЯ

Ступінь МВ	Кількість випадків експресії BRCA1 різного ступеня інтенсивності (%)				Кількість випадків позитивної експресії BRCA1 (%)
	0	+	++	+++	
НМВ (n = 24)	37,5	37,5	16,7	8,3	62,5
ВМВ (n = 24)	66,7	12,5	4,2	16,7	33,3*

*При порівнянні НМВ і ВМВ РЯ $\chi^2 = 14,42$, $ss = 3$, $p < 0,05$.

Таблиця 6
Експресія білка BRCA1 при I–II та III–IV стадії РЯ

Стадія	Співвідношення випадків експресії BRCA1 різного ступеня інтенсивності (%)				Кількість випадків позитивної експресії BRCA1 (%)
	0	+	++	+++	
I–II (n = 18)	33,3	27,8	11,1	27,8	67,7
III–IV (n = 29)	65,5	24,1	10,3	0	34,5*

*При порівнянні I–II та III–IV стадій РЯ $\chi^2 = 18,00$, $ss = 3$, $p = 0,001$.

Регуляція ангіогенезу в РЯ відбувається під впливом низки проангіогенних молекул, синтезованих як самими злоякісними клітинами, так і макрофагами, фібробластами, ендотеліальними клітинами тощо, які інфільтрують пухлину [28]. Так, у Сн культур РЯ з НМВ виявляються від 0,86 до 1,54 нг/мл ФНП- α , а при ВМВ — від 0,36 до 0,60 нг/мл, тобто між ступенем МВ тканини РЯ та рівнем ФНП- α існує обернений зв'язок. Поясненням цього може бути протилежна дія ФНП- α на ангіогенез залежно від концентрації [29] та тривалості впливу [30]. ФНП- α у дозо- та час-залежний спосіб регулює експресію рецептора другого типу ФРЕС та його корецепторної молекули нейропіліну-1 в ендотелії [31]. Мабуть, саме тому одні автори відзначали стимулювальну дію ФНП- α на експресію ФРЕС та інших молекул [32], а інші — інгібуючу [33]. Існує також думка, що кінцевий ефект ФНП- α на ангіогенез визначається локалізацією пухлини [34]. Зокрема для недрібноклітинного раку легені встановлено зворотний зв'язок між ступенем МВ тканини пухлини та рівнем мРНК ФНП- α [35]. У Сн первинних клітинних культур раку шлунка виявлено підвищення концентрації ФНП- α порівняно з Сн клітин неуразженої пухлиною стінки шлунка. При цьому Сн пухлинних культур значно підвищували проліферацію та адгезію клітин судинного ендотелію, більш агресивні пухлини виявляли більш виражений стимулювальний ефект [2]. Відомо також, що цитотоксичність Сн культур пухлин щодо ендотеліоцитів (пов'язана з ФНП- α) визначається походженням ракових клітин [36].

Концентрація ФНП- α у плазмі крові пацієнток із РЯ по-іншому асоційована зі ступенем МВ пухлини. Дуже низькі концентрації ФНП- α (0,08–0,20 нг/мл) відзначали при НМВ, а високі (0,62–1,02 нг/мл) — при ВМВ. Встановлено [3] зростання метастатичного потенціалу пухлини при підвищенні концентрації ФНП- α в плазмі крові від 5,0 до 100,0 нг/мл. Водночас ФНП- α у цьому діапазоні доз спричиняв

деструкцію капілярів хоріоалантоїсної мембрани [3]. На нашу думку, при РЯ з ВМВ тканини асоціація високої концентрації ФНП- α в плазмі крові хворих та низького вмісту цього фактора в Сн культур РЯ є передумовою метастатичного поширення таких злоякісних пухлин; в організмі виникає такий баланс концентрацій ФНП- α , при якому стимуляція внутрішньопухлинного ангіогенезу асоціюється зі сприятливим для метастатичного поширення дозовим фоном цього цитокіну на системному рівні (в плазмі крові). І навпаки — пригнічення внутрішньопухлинного ангіогенезу ФНП- α у високих дозах в тканині пухлини асоціюється із несприятливим для метастатичного поширення низьким дозовим фоном цитокіну у периферичній крові пацієнток.

Результати численних досліджень свідчать, що ТФР- β відіграє важливу роль у розвитку РЯ [37], в судинах РЯ підвищена експресія ТФР- β 1 та його рецептора ендогліну [38]. У Сн культур РЯ із різним ступенем МВ ми виявили однаковий рівень ТФР- β (від 4,34 до 5,93 нг/мл). Близькою до рівня ТФР- β у мікрооточенні РЯ була і концентрація цитокіну у плазмі крові пацієнток. Однак раніше нами було встановлено, що під впливом ТФР- β 1 в ендотеліоцитах мікросудин змінюється експресія близько 100 білків, 54 із яких виділено та ідентифіковано. ТФР- β пригнічує експресію 42 та активує 18 з ідентифікованих білків. Різною функціональною активністю цих білків визначається і кінцевий вплив ТФР- β на ендотеліальні клітини мікросудин, а відтак — на ангіогенез [39]. ТФР- β індукує перебудову компонентів цитоскелета ендотеліальних клітин мікросудин, що є передумовою міграції ендотеліоцитів мікросудин [39]. ТФР- β -залежна регуляція компонентів цитоскелета ендотеліоцитів мікросудин опосередкована компонентом внутрішньоклітинного сигнального шляху цього цитокіну — білком Smad3 [40]. Таким чином, регуляторна щодо пухлинного ангіогенезу дія ТФР- β може бути і опосередкованою. Відсутність зв'язку між вмістом ТФР- β у Сн культур РЯ та ступенем МВ пухлини свідчить про значний вплив компонентів внутрішньоклітинного сигнального шляху цього цитокіну на реалізацію його ефекту. Подібне відбувається і під час прогресування пухлинного процесу, при якому внаслідок мутацій рецепторів та компонентів внутрішньоклітинного сигнального шляху ріст-інгібуюча дія ТФР- β сповільнюється та переходить у ріст-стимулювальну [41]. При цьому відбувається і стимуляція ангіогенезу через активацію секреції проангіогенних молекул ФРЕС, оФРФ [42].

Цитокіни ФНП- α і ТФР- β взаємодіють із тумор-супресорними білками BRCA1 і p53 [43]. Виявлено певні відмінності експресії BRCA1 у клітинах РЯ при ВМВ та НМВ тканини пухлини. Позитивна експресія BRCA1 частіше асоціювалась з НМВ (у $2/3$ пацієнток, переважно (+) або (++)); при ВМВ тканини РЯ позитивну експресію BRCA1 (рівною мірою (+ та ++) і (+++)) відзначали в $1/3$ пацієнток ($p = 0,05$). Отримані дані вказують на регуляторну

роль білка BRCA1 щодо ангіогенезу в РЯ. «Молекулярною» основою для обґрунтування цього твердження є продемонстрована раніше [22] роль BRCA1 у регуляції експресії білка ФРЕС через естрогеновий рецептор-альфа: наслідком функціональної інактивності BRCA1 є підвищення транскрипції і секреції ФРЕС клітинами раку молочної залози. Ми підтвердили зниження експресії білка BRCA1 у клітинах РЯ у поширених (III–IV) стадіях захворювання на відміну від початкових (I–II), при яких активність ангіогенезу в пухлині нижча.

Мутація *p53* зумовлює виживання та проангіогенну відповідь пухлинних клітин на гіпоксію [44]. Типом мутації гена *p53* визначається активність ангіогенезу в РЯ [25]. Однак результати досліджень асоціації гіперекспресії білка *p53* (яка може бути наслідком мутаційних і немутаційних пошкоджень гена *p53*) та активації ангіогенезу в РЯ були суперечливими [45]. В нашому дослідженні лише у половині проаналізованих випадків при ВМВ тканини РЯ виявлена позитивна експресія білка *p53* помірного (++) та сильного (+++) ступеня; що дозволяє припустити наявність низки механізмів, активація яких має вплив на інтенсивність ангіогенезу в РЯ. У $\frac{2}{3}$ випадків при НМВ тканини РЯ експресія *p53* була негативною, що є свідченням або нормальної діяльності гена зі швидкою деградацією білка *p53* [46], або повної відсутності гена *p53* чи значним (функціонально тотожним повній відсутності гена — нульова мутація) його пошкодженням, що трапляється вкрай рідко [44]. Альтернативний шлях активації ангіогенезу, незалежний від стану гена *p53*, описаний в дослідженні [47]: під впливом гіпоксії у клітинах РЯ експресія ФРЕС підвищується за рахунок активації індукованого гіпоксією фактора-1 (що відбувається незалежно від стану гена *p53*). Виявлена нами асоціація НМВ тканини РЯ із відсутністю експресії білка *p53* у $\frac{2}{3}$ випадків може бути пояснена антиангіогенним контролем непошкодженого гена *p53* [44], однак не виключає існування альтернативних антиангіогенних механізмів. Незначне зростання експресії білка *p53* відзначали у клітинах РЯ у поширених (III–IV) стадіях захворювання, при яких ступінь МВ підвищується.

ВИСНОВКИ

1. ФНП- α регулює внутрішньопухлинний ангіогенез при РЯ за принципом оберненого зв'язку: у низьких дозах (0,36–0,60 нг/мл) стимулює ангіогенез, а у високих (0,86–1,54 нг/мл) — пригнічує. За участю цього цитокіну створюється сприятливий дозовий фон для одночасної активації внутрішньопухлинного ангіогенезу та гематогенного метастатичного поширення РЯ.

2. Між концентрацією ТФР- β в Сн первинних культур РЯ та мікроваскуляризацією пухлини не виявлено зв'язку, однак регуляція ТФР- β ангіогенезу може бути опосередкована активністю медіаторів внутрішньоклітинної передачі сигналу цитокіну.

3. З активацією ангіогенезу в РЯ асоційовані низькі частота та рівень експресії білка BRCA1, а також гіперекспресія білка *p53* в клітинах пухлини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барилка В, Піддубняк В, Володько Н та ін. Цитокінна активність лімфоцитів з лімфатичних вузлів, що дрениують злоякісну пухлину. Актуал проблеми клінічної імунології та алергології 1997; (2): 15–21.
2. Гіпп ІГ. Феномен легеневої гіпертензії у хворих на рак шлунка [Автореф дис ... канд мед наук]. Київ: Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 2001. 19 с.
3. Кудрявцев ЮЙ. Интерферон та фактор некрозу пухлин як модифікатори метастазування злоякісних новоутворень [Автореф дис ... д-ра біол наук]. Київ: Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 1999. 36 с.
4. Harris SR, Thorgeirsson UP. Tumor angiogenesis: biology and therapeutic prospects [Review]. *In vivo* 1998; 12 (6): 563–70.
5. Carmeliet P. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249–57.
6. Szala S, Radzikowski Cz. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1–19.
7. Chopra V, Dink TV, Hannigan EV. Production of angiogenic factors and plasminogen degrading enzymatic activity by human ovarian cancer cells. Abstracts of the Proceedings of Annual Meeting of the American Associations of Cancer Research. 1997. A: 2763.
8. Ishiwata I, Ishiwata C, Soma M, Ishiwata H. Establishment of HUOCA-II, a human ovarian clear cell adenocarcinoma cell line, and its angiogenic activity. *J Nat Cancer Inst* 1987; 78 (4): 667–73.
9. Rink L, Kirchner H. Recent progress in the TNF- α field. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111 (3): 199–209.
10. Hamanaka R, Kohno K, Socuchi T, et al. Induction of low density lipoprotein receptor and a transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 13160–5.
11. Pober JS. Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol Biol* 1998; 46: 159–63.
12. Sato N, Goto T, Haranaka K, et al. Actions of TNF on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Nat Can Inst* 1986; 76: 1113–21.
13. BenEzra D, Hemo I, Mafizir G. *In vivo* angiogenic activity of interleukins. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 573–6.
14. Van Etten B, de Vries MR, van Ijken MG, et al. Degree of tumor vascularity correlates with drug accumulation and tumor response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion. *Brit J Cancer* 2003; 88 (2): 314–9.
15. Ten Hagen TL, Eggermont AM. Solid tumor therapy: manipulation of the vasculature with TNF. *Technol Cancer Res Treat* 2003; 2 (3): 195–203.
16. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta and heterotypic cell-cell interactions modulate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998; 141: 805–14.
17. Iruela-Arispe ML, Sage EH. Endothelial cells exhibiting angiogenesis *in vitro* proliferate in response to TGF-beta 1. *J Cell Biochem* 1993; 52: 414–30.
18. Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, et al. The expression of VEGF and TGF- β associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Inter J Gynecol Pathol* 1997; 16 (3): 256–62.
19. Schuijjer M, Berns EMJ. TP53 and ovarian cancer. *Human Mutation* 2003; 21: 285–91.
20. Scully R, Chen J, Plug A, et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88: 265–75.
21. Vora HH, Shah NG, Patel DD, et al. BRCA1 expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue. *J Surg Oncol* 2003; 83: 232–40.

22. **Kawai H, Li H, Chun Ph, et al.** Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene* 2002; **21**: 7730–9.

23. **Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, et al.** p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998; **184**: 360–8.

24. **Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, et al.** p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1993; **53**: 2128–32.

25. **Goodheart MJ, Vasef MA, Sood AK, et al.** Ovarian cancer p53 mutation is associated with tumor microvessel density. *Gynecol Oncol* 2002; **86**: 85–90.

26. **Nakayama K, Kanzaki A, Takebayashi Y, et al.** Different featured of angiogenesis between ovarian and breast carcinoma. *Cancer Lett* 2001; **170** (2): 161–7.

27. **Sengupta PS, McGown AT, Bajaj V, Blackhall F.** p53 and related proteins in epithelial ovarian cancer. *Europ J Cancer* 2000; **36**: 2317–28.

28. **Nilsen EM, Johansen FE, Jahnsen FL, et al.** Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 1998; **42**: 635–42.

29. **Lätti S, Leskinen M, Shiota N, et al.** Mast cell-mediated apoptosis of endothelial cells in vitro: a paracrine mechanism involving TNF-alpha-mediated down-regulation of bcl-2 expression. *J Cellular Physiol* 2003; **195**: 130–8.

30. **Shono T, Ono M, Izumi K, et al.** Involvement of the Transcription Factor NF-kB in Tubular Morphogenesis of Human Microvascular Endothelial Cells by Oxidative Stress. *Mol Cell Biol* 1996; **16** (8): 4231–9.

31. **Giraud E, Primo L, Audero E, et al.** TNF-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; **273** (34): 22128–35.

32. **Ryuto M, Ono M, Izumi H, et al.** Induction of VEGF by TNF-alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* 1996; **271** (45): 28220–8.

33. **Patterson C, Perrella MA, Endege WO, et al.** Downregulation of VEGF receptors by TNF-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996; **98** (2): 490–6.

34. **Keyes KA, Mann L, Teicher B, Alvarez E.** Site-dependent angiogenesis cytokine production in human tumor xenografts. *Cytokine* 2003; **21** (2): 98–104.

35. **Boldrini L, Calciani A, Samaritani E, et al.** Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta are significantly associated with better prognosis in non-small cell lung carcinoma: putative relation with BCL-2-mediated neovascularization. *Brit J Cancer* 2000; **83** (4): 480–6.

36. **Kamada H, Tsutsumi Y, Kihira T, et al.** *In vitro* remodeling of tumor vascular endothelial cells using conditioned medium from various tumor cells and their sensitivity to TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **268** (3): 809–13.

37. **Bartlett JM, Langdon SP, Scott WN, et al.** TGF-beta isoform expression in human ovarian tumors. *Europ J Cancer* 1997; **33** (14): 2397–2403.

38. **Henriksen R, Gobl A, Wilander E, et al.** Expression and prognostic significance of TGF-beta isoforms, latent TGF-beta1 binding protein, TGF-beta type I and II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Labor Investigation* 1995; **73** (2): 213–20.

39. **Lomnytska M, Lukiyanchuk V, Hellman U, Souchelnytskyi S.** TGF-beta1-regulated proteins in human endothelial cells identified

by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004; **4**: 995–1006.

40. **Grimby S, Jaensson H, Dubrovskaya A, et al.** Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity. *FEBS Letters* 2004; **577**: 93–100.

41. **Souchelnytskyi S.** TGF-beta signaling and its role in cancer. *Experim Oncol* 2002; **24**: 3–12.

42. **Sato M, Huragaki Y, Saika S, et al.** Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral obstruction. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1486–94.

43. **Schuijjer M, Berns EMJ.** TP53 and ovarian cancer. *Human Mutation* 2003; **21**: 285–91.

44. **Royds JA, Dower SK, Qvarnstrom EE, Lewis CE.** Response of tumor cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1998; **51**: 55–61.

45. **Shahin MS, Hughes JH, Sood AK, Buller RE.** The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma. *Cancer* 2000; **89**: 2006–17.

46. **Cadwell C, Zambetti GP.** The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001; **277**: 15–30.

47. **Horiuchi A, Imai T, Shimizu M, et al.** Hypoxia-induced changes in the expression of VEGF, HIF-1 alpha and cell cycle-related molecules in ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2002; **22** (5): 2697–702.

LINK BETWEEN ANGIOGENESIS IN OVARIAN CARCINOMA, p53 AND BRCA1 EXPRESSION, AND TNF- α / TGF- β PRODUCTION

M.I. Lomnytska, N.A. Volodko, V.A. Barylka, S.I. Sushelnytsky, B.T. Bilynsky

Summary. *Studies were performed simultaneously to investigate the activity of angiogenesis, p53 and BRCA1 expression in the ovary cancer (OC) tissue, production of TNF- α and TGF- β in primary cell cultures of the same tumors, as well as the levels of these cytokines in the patients' blood. TNF- α was shown to regulate the intra-tumor angiogenesis in OC on a feedback basis; i.e. its low concentration stimulates angiogenesis, while its high concentration inhibits it. This cytokine creates a favorable dose environment for simultaneous activation of intra-tumor angiogenesis and hematogenic metastatic dissemination of OC. No link was observed between the concentration of TGF- β in supernatants of OC cell cultures and the tumor microvasculature; however, TGF- β regulation of angiogenesis may be mediated by the activity of mediators of intracellular signaling. An activated angiogenesis in OC is associated with low rates and levels of BRCA1 expression as well as hyperexpression of p53 in tumor cells.*

Key Words: angiogenesis, ovary cancer, TNF- α , TGF- β , p53, BRCA1.

Адреса для листування:

Ломницька М.І.

79011, Львів, вул. Кубанська, 23, кв. 5

E-mail: lomnytska@yahoo.com