

І.О. Лісняк

О.В. Алістратов

А.Б. Вінницька

С.В. Неспрядько

В.Ф. Чехун

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

Інститут онкології АМН України, Київ, Україна

Ключові слова: фактор росту ендотеліальних клітин, рак тіла матки, рак шийки матки, імуноферментний метод.

ЗВ'ЯЗОК РІВНЯ ФАКТОРА РОСТУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН З ПОШИРЕНІСТЮ ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ У ХВОРИХ НА РАК ТІЛА АБО ШИЙКИ МАТКИ

Резюме. Досліджено варіабельність рівня фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF) у хворих на рак тіла або шийки матки. Рівень ангіогенного фактора в сироватці крові визначали за допомогою імуноферментного методу. Встановлено, що рівень VEGF значною мірою залежить від поширеності пухлинного процесу.

ВСТУП

Доведено є факт, що на певній стадії розвитку пухлини навколо неї з'являється мережа кровоносних судин. Цей феномен, відомий в літературі як процес неоваскуляризації, є однією з форм взаємодії організму та пухлини. На думку багатьох дослідників, неоваскуляризація відіграє важливу роль у процесі розвитку пухлин та їх метастазуванні. Останнє є підставою для вивчення біохімічних та морфофункціональних особливостей механізмів, які індують та регулюють ангіогенез. Встановлено, що клітини пухлин секретують у навколишнє середовище розчинну субстанцію білкової природи (ангіогенний фактор) [1]. На сьогодні відомо, що молекулярна маса цього фактора (фактора росту ендотеліальних клітин — VEGF) становить 14–46 кДа [2–6]. Слід зазначити, що в неуражених тканинах та в пухлинах індуктори ангіогенезу представлені різноманітними формами. Можливо, це пояснюється багатостадійністю формування нових кровоносних судин та специфічністю індукторів ангіогенезу для кожної стадії їх морфогенетичного процесу. Не виключено і те, що різноманітність цих факторів може бути зумовлена гістологічною специфічністю, у тому числі і в тканинах пухлин. В межах однієї тканини можуть бути присутні ізоформи одного і того самого індуктора ангіогенезу [7]. Ангіогенез за нормальних умов спостерігається на певних стадіях ембріогенезу хребетних, а у постнатальний період — при репаративних процесах (репарація капілярів, загоєння ран тощо). В протилежність цьому клітини пухлин постійно продукують ангіогенний фактор у навколишнє середовище [8, 9].

Вивчення індукторів неоваскуляризації є актуальним як для фундаментальної науки, так і для клінічної медицини. Зокрема, в онкогінекології визначення зв'язків між рівнем факторів ангіогенезу та характеристикою злоякісних пухлин сприяє розумінню механізмів розвитку останніх, діагностиці,

визначенню стадій злоякісного процесу та розробленню нових лікувальних заходів [10–15].

Мета роботи — дослідження варіабельності рівня VEGF у жінок, хворих на рак тіла або шийки матки (РТМ, РШМ), та визначення залежності рівня цього фактора від стадії пухлинного процесу.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджували зв'язок рівня VEGF з гістологічною формою пухлин та стадією їх розвитку (за класифікацією TNM) у хворих на РТМ (n = 45) та РШМ (n = 12). За гістологічною структурою пухлини хворих з РТМ розподілили таким чином: в 41 діагностовано аденокарциному, у 2 — аденосквамозний рак, у 2 — атипічну гіперплазію ендометрію; у хворих на РШМ: в 11 — плоскоклітинний рак, в 1 — внутрішньоепітеліальний рак *in situ*.

Визначення рівня VEGF в сироватці крові проводили за допомогою імуноферментного методу [16]. Головним компонентом у схемі визначення був кон'югат поліклональних антитіл до ангіогенного фактора з пероксидазою, який отримували із використанням періодатного методу [17]. Методика дослідження включала такі етапи: отримання імуногена (VEGF) з тканин пухлини людини; одержання поліклональних антитіл до VEGF; визначення рівня VEGF у сироватці крові. Процедуру визначення проводили у 96-лункових планшетах. Після інкубації інтенсивність забарвленості оцінювали за допомогою «Titertec Multiskan» «Flow Laboratories» (England), довжина хвилі — 492 нм. Інтенсивність кольорової реакції була пропорційна концентрації VEGF, яку оцінювали за калібрувальною кривою (залежність оптичної щільності від концентрації VEGF).

Для аналізу даних використовували: параметричний (критерій Стюдента) та непараметричні (критерій Колмогорова — Смірнова та точний метод Фішера) критерії. Розрахунки проводили із застосуванням пакетів програм «Sigma Plot 5.0» та «Origin 5.0».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У пацієнток з РТМ (аденокарциною) або плоскоклітинним РШМ визначали зв'язок стадії пухлинного процесу з рівнем VEGF. Встановлено, що середні значення рівня VEGF у хворих зі стадією T1aN0M0 та T1bN0M0 РТМ суттєво не відрізнялись (табл. 1). Середні значення рівня VEGF у хворих на РТМ або РШМ стадії T1bN0M0 також були практично однаковими ($p > 0,05$). У хворих РТМ ураження міометрія становило не більше половини товщини міометрія, а у хворих на РШМ — процес був поширений до 3 мм в глибину та горизонтально [18].

У хворих на РТМ без регіонарних та віддалених метастазів (стадії T1bN0M0, T1cN0M0 та T2bN0M0) у міру поширення пухлин рівень VEGF суттєво підвищувався (рис. 1). Поширеність пухлинного процесу становила: для стадії T1bN0M0 — не більше половини товщини міометрія, для стадії T1cN0M0 — більше половини товщини міометрія, для стадії T2bN0M0 — поширеність на шийку матки з інфільтрацією в цервікальну строму. Про поступове підвищення концентрації VEGF в сироватці крові хворих на РТМ у міру поширеності первинної пухлини свідчить і розподіл значень рівня VEGF залежно від стадії (рис. 2). При перехресному порівнянні даних цього розподілу встановлено, що вони суттєво відрізняються між собою: $pT1bN0M0-T1cN0M0 < 0,01$, $pT1bN0M0-T2bN0M0 < 0,01$, $pT1cN0M0-T2bN0M0 < 0,01$. Водночас результати розподілу значень VEGF у хворих на РТМ або РШМ стадії T1bN0M0 співпадали. У деяких хворих на РТМ або РШМ з метастазами в регіонарних лімфатичних вузлах (стадія T1bN1M0) рівень ангіогенного фактора був суттєво вищим ($p < 0,05$), ніж у жінок з пухлинами стадії T1bN0M0 (див. табл. 1). При стадії РТМ відповідно T1cM0N0 та T1cM1N0 не було виявлено суттєвої залежності VEGF від ураження регіонарних лімфатичних вузлів метастазами ($p > 0,05$).

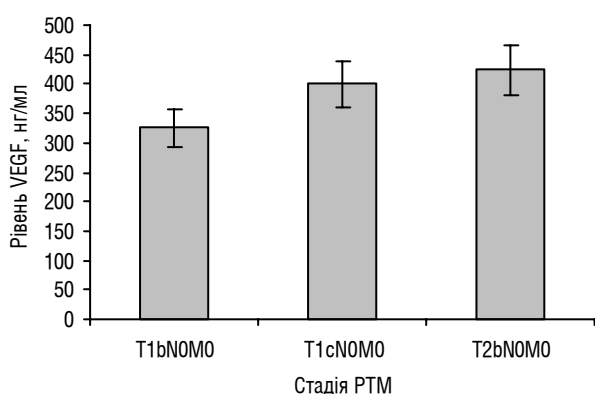


Рис. 1. Рівень VEGF у хворих на РТМ без метастазів

Аналіз кількості хворих з певними межами значення рівнів VEGF свідчить, що у 86,7% хворих на РТМ стадії T1bN0M0 рівень VEGF не перевищував 353,3 нг/мл (табл. 2). Рівень VEGF в межах 353,3–424,1 нг/мл визначено у 84,6% хворих на РТМ стадії T1cN0M0 і лише у 33,3% — при РТМ T2bN0M0; в усіх інших пацієнток з цією стадією захворювання вміст VEGF в сироватці крові перевищував 424,1 нг/мл.

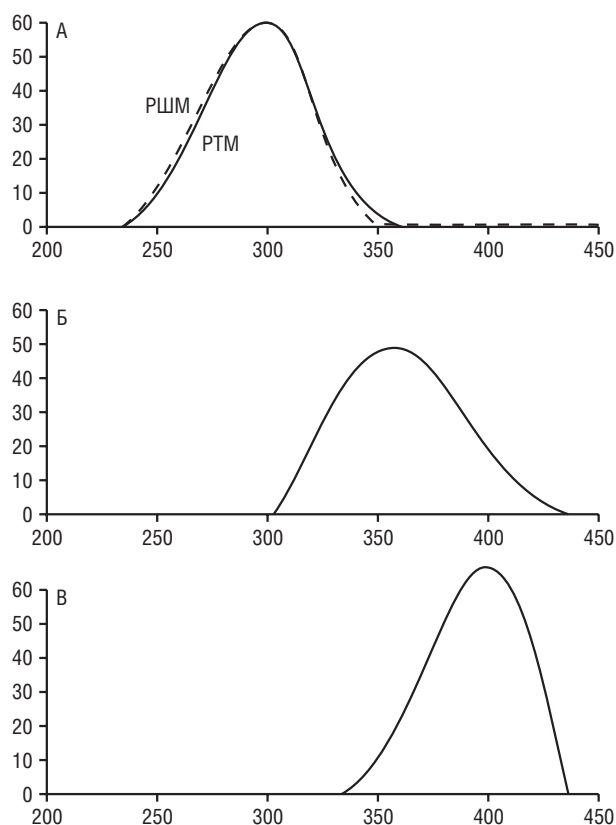


Рис. 2. Розподіл значень рівня VEGF залежно від стадії РТМ або РШМ

А — РТМ (аденокарцинома) або РШМ (плоскоклітинний рак) стадії T1bN0M0; Б — РТМ стадії T1cN0M0; В — РТМ стадії T2bN0M0; вісь абсцис — рівень VEGF (нг/мл); вісь ординат — кількість хворих (%)

Таблиця 1
Середні значення рівня VEGF у хворих на РТМ та РШМ залежно від стадії захворювання за класифікацією TNM

Локалізація та гістологічна структура пухлини	T	N	M	Кількість хворих	Рівень VEGF (M±m)
РТМ, аденокарцинома	1a	0	0	3	310,0 ± 1,8
	1b	0	0	15	326,5 ± 4,8
	1b	1	0	1	418,0
	1c	0	0	13	399,3 ± 7,2*
	1c	1	0	2	425,0 ± 24
	2b	0	0	6	427,3 ± 5,1*
	2b	1	0	1	423,0
Всього хворих				41	
РШМ, плоскоклітинний рак	1b	0	0	10	311,4 ± 16,0
	1b	1	0	1	374,0
Всього хворих				11	

* $p < 0,05$.

Таблиця 2
Розподіл хворих на РТМ в межах рівнів VEGF

Стадія	Групи порівняння		Межі рівня VEGF (нг/мл)	P (за точним методом Фішера)	
	Кількість хворих, %	Стадія			Кількість хворих, %
РТМ T1bN0M0	86,7	РТМ T1cN0M0	0,0	283,5–353,3	0,0000028
РТМ T1bN0M0	100,0	РТМ T2bN0M0	0,0	283,5–388,6	0,0000184
РТМ T1cN0M0	84,6	РТМ T2bN0M0	33,3	353,3–424,1	0,0431225

Привертає увагу факт, що значення p (за точним методом Фішера) при порівнянні значень VEGF у хворих на РТМ у міру поширення пухлинного процесу експоненціально підвищуються (див. табл. 2). Хоча і опосередковано, це свідчить, що зв'язок рівня ангіо-

генного фактора з обсягом пухлини при поширеності пухлинного процесу зменшується. Цей висновок співпадає з результатами наших експериментальних досліджень, в яких визначали зв'язок рівня VEGF з обсягом пухлини і метастатичними ураженнями легень у мишей лінії C57BL6 з карциномою 3LL [19].

Про значущість цього показника в онкогінекологічній практиці свідчить те, що рівень VEGF у 2 хворих з атипічною гіперплазією ендометрія (171 та 187 нг/мл відповідно) був суттєво нижчим, ніж у хворих на аденокарциному тіла матки стадії T1aN0M0, $p = 0,0002$; T1bN0M0, $p < 0,00001$ (див. табл. 1), та значно перевищував фізіологічні межі (у здорових жінок — до 50 нг/мл). Адаже жінки з атипічною гіперплазією ендометрія розглядаються як група ризику в онкогінекології. Про ранню зміну цього показника свідчить і той факт, що у хворої на внутрішньоепітеліальний рак шийки матки (*in situ*) рівень ангіогенного фактора (240 нг/мл) суттєво не відрізнявся від його найбільш низьких значень у хворих на плоскоклітинний рак шийки матки стадії T1bN0M0.

У 2 пацієнток з аденосквамозним РТМ (стадії T1aN0M0 та T2bN1M0) рівень VEGF становив 305 та 431 нг/мл відповідно. Рівень VEGF у першому випадку суттєво не відрізнявся від аналогічного показника у хворих з аденокарциномою такої самої стадії (див. табл. 1). У другій хворій рівень VEGF був близьким до такого у пацієнтки з аденокарциномою тіла матки стадії T2bN1M0 (див. табл. 1). Це дає підставу припустити, що за умов однакової локалізації та стадії пухлини рівень VEGF може незначною мірою залежати від гістологічної форми останньої, але для підтвердження такого припущення необхідне подальше накопичення клінічного матеріалу. Результати залежності зв'язку рівня VEGF від поширеності пухлинного процесу у хворих на РТМ або РШМ свідчать про певну діагностичну, а можливо, і прогностичну цінність цього показника.

ЛІТЕРАТУРА

1. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1974; **19**: 331–58.
2. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; **113**: 275–88.
3. McAuslan BR, Hoffman H. Endotelium stimulating factor from Walker carcinoma cells. Relation to tumor angiogenic factor. *Exp Cell Res* 1979; **119**: 181–90.
4. Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors* 1993; **9**: 259–68.
5. Brown UF, Detmer M, Claffey K. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor): a multifunctional angiogenic cytokine. *EXC* 1997; **79**: 233–69.
6. Stephan CC, Brock TA. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide. *P.R. Health Sci J* 1996; **15**: 169–78.
7. Carmeliet P, Y-S Ng, Nuyens D, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature Medicine* 1999; **5**: 495–502.
8. Chicoine MR, Silbergeld DL. Mitogens as motogens. *J Neuro-oncol* 1997; **35**: 249–57.
9. Nguyen M, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor in the urine of patients with a wide spectrum of cancer. *JNCI* 1994; **86**: 356–61.
10. Shaarawy M, El-Sharkawy SA. Biomarkers of intrinsic angiogenic and anti-angiogenic activity in patients with endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Acta Oncol* 2001; **40** (4): 513–8.
11. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 2001; **85** (1): 93–7.
12. Brown MR, Blanchette JO, Kohn EC. Angiogenesis in ovarian cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; **14** (6): 901–18.
13. Bancher-Todesca D, Obermair A, Bilgi S, et al. Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1997; **64** (3): 496–500.
14. Dunk C, Ahmed A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. *Histol Histopathol* 2001; **16** (2): 359–75.
15. Nomura S, Okamoto T, Matsuo K, et al. Serum and tissue vascular endothelial growth factor levels in hydatidiform mole. *Life Sci* 1998; **63** (20): 1793–805.
16. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; (8): 871–4.
17. Иммуносорбенты в очистке белков. Под ред Э. Руюс-лахти. М: Медицина, 1979. 59 с.
18. Шпарик ЯВ, Ковальчук ІВ, Білинський БТ. Довідник онколога. Львів: Галицька видавнича спілка, 2000. 108 с.
19. Алистратов АВ, Лисняк ІА, Яценко СМ, Винницький ВБ. Зависимость уровня фактора роста эндотелиальных клеток от характеристик роста карциномы 3LL у мышей C57BL6. *Эксперим онкол* 2002; **24** (1): 64–8.

ASSOCIATION BETWEEN THE LEVEL OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND THE DISSEMINATION OF THE TUMOR GROWTH IN PATIENTS WITH UTERINE OR CERVICAL CARCINOMA

I.O. Lisniak, O.V. Alistratov, A.B. Vinnytska, S.V. Nespriadko, V.F. Chekhun

Summary. The variability of the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) was investigated in patients with uterine or cervical carcinoma. The angiogenic factor level was measured by an immunoenzyme method in the blood serum. The VEGF level was shown to correlate significantly with the dissemination of the primary tumor process.

Key Words: vascular endothelial growth factor, uterine carcinoma, cervical carcinoma, immunoenzyme method.

Адреса для листування:

Лісняк І.О.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України