



УДК 61.616.3.616.-006.66.577.29

УРОВЕНЬ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ТКАНИ ОПУХОЛИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

О.И. КИТ
Е.М. ФРАНЦИЯНЦ
Е.А. НИКИПЕЛОВА
Е.Ф. КОМАРОВА

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

e-mail: rnioi@list.ru

В работе проведен анализ результатов исследования тканевого уровня некоторых факторов роста и неоангиогенеза послеоперационного материала больных раком толстой кишки. Развитие патогенного механизма создания сосудистой сети в злокачественной опухоли различных отделов толстой кишки имеет как общие, так и отличительные черты. Отмечены выраженные гендерные различия в ткани опухоли, связанные с экспрессией различных факторов роста.

Ключевые слова: рак толстой кишки, факторы роста, ткань опухоли, линия резекции.

В настоящее время компоненты тканевой фибринолитической системы рассматриваются как важнейшие агенты, способные уменьшить уровень внеклеточных матричных гликопротеинов и активировать некоторые ростовые факторы и прометаллопротеазы, что и обеспечивает прогрессивный рост опухоли [6]. К таким факторам, прежде всего, относят VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, EGF-эпидермальный фактор роста и IGF-1 и IGF-II – инсулиноподобные факторы роста, как одни из наиболее значимых цитокинов, способных стимулировать пролиферативные процессы, модулировать рост тканей, в том числе и патологических, и образование новых сосудов *in vivo* и *in vitro*.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является одним из наиболее сильных ангиогенных цитокинов, который, специфически действуя на эндотелиоциты, призван стимулировать образование новых сосудов. VEGF способны продуцировать как нормальные, так и опухолевые клетки человека в ответ на действие гипоксии, факторов роста (TGF, IGF, EGF), воспаления, а раковые клетки – вследствие генетических мутаций [4, 10, 16]. Семейство инсулиноподобного фактора роста включает в себя IGF-1 и IGF-2, их рецепторы и белки – переносчики. Факторы IGF-1 и IGF-2 являются сильными стимуляторами пролиферации клеток, а также обладают антиапоптотическим действием. [20].

Целью настоящего исследования стало изучение уровня некоторых факторов роста и неоангиогенеза в злокачественных опухолях прямой и сигмовидной кишки.

Материалы и методы. В основу работы положен анализ результатов исследования послеоперационного материала, полученного от 73 больных (43 женщин и 30 мужчин) с первичными аденокарциномами (st III) сигмовидного и прямого отделов толстой кишки. Возраст больных составил от 38 до 74 лет. Верификация характера процесса проводилась в патоморфологической лаборатории РНИОИ. В ходе оперативных вмешательств производилось удаление аденокарциномы с последующим биохимическим исследованием ткани опухоли, а также визуально неизмененных участков кишки, отступая 10 см (линия резекции = условно интактная ткань) от края опухолевой ткани.

В образцах тканей методом иммуноферментного анализа определяли содержание: активной формы фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF-A), трансформирующего фактора роста (TGF-β₁), эпидермального фактора роста (EGF), инсулиноподобных факторов роста (IGF-I и IGF-II).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли с помощью t- критерия Стьюдента.

Корреляционные зависимости исследовали с помощью критерия Пирсона (r).

Результаты исследования и их обсуждение. Как видно из результатов, представленных в таблице 1, во всех образцах ткани злокачественной опухоли уровень VEGF-A превышал показатель в соответствующей интактной ткани: для прямой кишки – в 11,7 раза, для сигмовидной кишки – в 8 раз. При этом уровень фактора роста эндотелия сосудов в ткани опухоли прямой кишки был выше, чем в ткани опухоли сигмовидной кишки на 25,2%, а показатель в соответствующих образцах интактной ткани не имел достоверных различий.

Таблица 1

Уровень факторов роста в ткани злокачественных опухолей различных отделов толстой кишки

Показатели	Прямая кишка		Сигмовидная кишка	
	опухоль	линия резекции	опухоль	линия резекции
1	2	3	4	5
VEGF-A пг/г тк	3113,9±21,4 ¹	265,1±21,9	2487,6±21,2 ^{1,2}	312,6±31,6



Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
IFR-1 мкг/г тк	14,9±1,4 ¹	8,5±0,7	14,4±1,7 ¹	3,4±0, 2 ²
IFR-2 нг/г тк	7,2±0,7 ¹	3,1±0,74	7,6±0,9 ¹	3,5±0,7
TGF-β ₁ пг/г	469,7±15,8 ¹	245,4±14,3	267,9±25,7 ^{1,2}	216,6±14,7
EGF пг/г тк	125,7±11,4 ¹	45,7±5,6	53,3±6,1 ^{1,2}	38,4±4,5

Примечание: ¹ – достоверно по отношению к показателям по линии резекции;² – достоверно по отношению к показателям в ткани прямой кишки.

Полученными результатами согласуются с данными литературы, в которых было показано, что уровень VEGF и его рецептора играют ключевую роль в проявлении и развитии рака толстой кишки и, вероятно, могут интерпретироваться как показатели злокачественности опухоли [11, 19, 7].

Учитывая появившиеся в литературе сообщения о существовании разницы в риске развития рака толстой кишки, связанным с полом, биологические механизмы которого пока остаются неизвестными [12], представляло интерес изучение экспрессии VEGF-A в исследуемых образцах ткани в зависимости от пола больных.

Таблица 2

Уровень факторов роста в ткани злокачественных опухолей различных отделов толстой кишки в зависимости от пола больных

Показатели	Пол	Прямая кишка		Сигмовидная кишка	
		опухоль	линия резекции	опухоль	линия резекции
VEGF-A пг/г тк	м	1543,2±17,2	215,2±17,1	1277,1±59,2	297,6±11,6
	ж	3599,8±27,9 ¹	381,3±22,7 ¹	1899,6±82,2 ¹	320,1±15,2
IFR-1 мкг/г тк	м	13,1±2,1	8,2±0,5	12,3±1,1	5,4±0, 2
	ж	13,7±1,3	9,6±0,9	11,5±2,2	4,6±0,2
IFR-2 нг/г тк	м	8,6±0,9	3,9±0,4	8,2±0,9	3,4±0,7
	ж	4,9±0,6 ¹	3,4±0,5	5,8±0,2 ¹	3,5±0,4
TGF-β ₁ пг/ г тк	м	172,8±11,2	248,6±25,3	277,7±15,7	204,6±14,7
	ж	576,3±21,8 ¹	282,2±21,1	294,9±19,2	221,1±12,8
EGF пг/г тк	м	150,5±16,2	43,5±3,2	64,8±5,1	38,4±2,3
	ж	109,1±12,4 ¹	47,2±4,7	21,8±1,2 ¹	38,4±3,3

Примечание: ¹ – достоверно по отношению к показателям у мужчин.

Оказалось, что уровень VEGF-A в ткани злокачественной опухоли различных отделов толстой кишки имел выраженные гендерные отличия, причем в обоих случаях показатель в ткани опухоли женщин был выше, чем у мужчин: для прямой кишки – в 2,3 раза, для сигмовидной кишки – в 1,5 раза (табл.2). При этом различия в уровне указанной изоформы фактора роста эндотелия сосудов в интактной ткани были выявлены только для прямой кишки: уровень у женщин был выше в 1,8 раза.

Известно, что индукторами VEGF как в норме, так и патологии, помимо прочего, являются инсулиноподобные факторы роста – IGF-1 и IGF-2 [10].

Было установлено увеличение экспрессии IGF-1 и IGF-2 в ткани злокачественной опухоли больных раком прямой и сигмовидной кишки относительно соответствующей интактной ткани. Для IGF-1 это увеличение составило 1,7 раза и 4,2 раза соответственно вне зависимости от пола (табл.1) и не имело принципиальных различий в зависимости от пола (табл.2). При этом уровень показателя в интактной ткани прямой кишки был в 2,5 раза выше, чем в аналогичной ткани сигмовидной кишки вне зависимости от пола (табл.1) и также не имело принципиальных различий в зависимости от пола (табл.2). Уровень IGF – 2 вне зависимости от пола был повышен в ткани злокачественной опухоли прямой и сигмовидной кишки относительно соответствующей интактной ткани в среднем в 2,2 раза, а показатель в образцах интактной ткани прямой и сигмовидной кишке имел достоверных различий (табл. 1,2). Вместе с тем, значения показателя IGF-2 в ткани опухоли носили выраженный гендерный характер, при этом значения были выше в ткани опухоли больных мужского пола: для прямой кишки – в 1,8 раза, для сигмовидной кишки – в 1,4 раза (табл. 2).

Анализ направленности изменения уровня VEGF, IGF-1 и IGF-2 в исследуемых образцах тканей показал, что оба инсулиноподобных фактора роста имеют прямое влияние на содержание VEGF-A в ткани злокачественной опухоли различных отделов толстой кишки. Прослеживалась сильная положительная корреляционная связь уровня VEGF-A и IGF-1 ($r=76$; $p<0,01$) и VEGF-A и IGF-2 ($r=79$; $p<0,01$).



Помимо способности стимулировать VEGF, инсулинподобный фактор роста (IGF) представляет особый интерес в качестве эндокринного фактора риска для развития рака толстой кишки. Факторы IGF-1 и IGF-2 являются сильными стимуляторами пролиферации клеток, а также обладают антиапоптотическим действием [20]. С этих позиций полученные нами результаты указывают на то, что IGF-1 и IGF-2 являются мощными агентами пролиферации в слизистой толстой кишки, возможно, выступая факторами паракринной регуляции. В качестве примера паракринной стимуляции опухоли можно привести продукцию IGF-2 фибробластами стромы рака легкого, который взаимодействуя с рецепторами на раковых клетках, стимулирует их пролиферацию [15]. Переход клеток на аутокринный и паракринный пути регулирования своего роста приводит к утрате контактного торможения, иммортализации опухолевых клеток и автономному росту опухоли [13].

Выделено много факторов связанных со способностью ткани опухоли создавать свою сосудистую сеть, повышение экспрессии генов которых найдено в злокачественных опухолях различного генеза [1, 2, 3, 9, 17]. И одним из таких факторов является TGF- β . TGF- β играет важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей [15]. Обладая как ауто-, так и паракринным действием, TGF- β стимулирует экспрессию некоторых интегринов, внеклеточный протеолиз, ангиогенез и иммунную супрессию [14].

При исследовании уровня трансформирующего фактора роста β_1 в ткани злокачественной опухоли различных отделов толстой кишки показало его достоверное увеличение только в образцах опухоли прямой кишки – в 1,9 раза относительно интактной ткани вне зависимости от пола (табл. 1). Однако при рассмотрении показателей с учетом гендерных различий оказалось, что повышение уровня TGF- β_1 было только в злокачественных опухолях прямой кишки женщин, и оно составляло 2 раза относительно интактной ткани, которая, кстати, не имела гендерных различий (табл. 1, 2). В ткани опухоли прямой кишки мужчин этот показатель был даже несколько ниже, чем в соответствующей интактной ткани – на 30,5% (табл. 2).

Анализ направленности изменения уровня VEGF-A и TGF- β_1 в исследуемых образцах тканей опухоли женщин показал, что последний также имеет прямое влияние на содержание VEGF в ткани злокачественной опухоли прямой кишки ($r=56$; $p<0,05$) и не имеет влияния на уровень фактора роста эндотелия сосудов в ткани опухоли сигмовидной кишки.

Регуляция пролиферации клеток и создание сосудистой сети опухоли осуществляется также с помощью факторов семейства эпидермального фактора роста (EGF). EGF является сильным стимулятором роста как нормальных, так и злокачественных эпителиоцитов, увеличивая синтез ДНК и клеточную пролиферацию [8].

Было установлено повышение уровня EGF в ткани опухоли как прямой в 2,8 раза, так и сигмовидной кишки в 1,4 раза вне зависимости от пола больных (табл.1). Вместе с тем выявлены четкие гендерные различия в содержании эпидермального фактора роста. Так в ткани опухоли прямой кишки мужчин уровень EGF был в 1,4 раза выше, чем в ткани опухоли женщин, хотя соответствующие интактные ткани не имели различий в показателях (табл. 2). В ткани рака сигмовидной кишки уровень EGF был повышен относительно интактной ткани только у мужчин в 1,7 раза и превосходит показатель в ткани опухоли у женщин почти в 3 раза. Вместе с тем уровень EGF в ткани опухоли женщин был ниже, чем в соответствующей интактной ткани в 1,8 раза (табл. 2).

Анализ направленности изменения уровня VEGF-A и в исследуемых образцах тканей опухоли прямой кишки показал, что эпидермальный фактор роста имеет прямое влияние на содержание ($r=76$; $p<0,05$). В ткани опухоли сигмовидной кишки сильная положительная корреляционная связь отмечена только в отношении уровня EGF и фактора роста эндотелия сосудов у мужчин ($r=72$; $p<0,05$), тогда как для ткани опухоли женщин эта связь была средней отрицательной ($r=-53$; $p<0,05$).

Таким образом, показано, что развитие патогенного механизма создания сосудистой сети в злокачественной опухоли различных отделов толстой кишки имеет как общие, так и отличительные черты, связанные с экспрессией различных факторов роста и имеющие выраженные гендерные различия. К общим механизмам относится регулируемая IGF-1 и IGF-2 активация VEGF-A в ткани злокачественной опухоли как прямой, так и сигмовидной кишки. А различия касаются регуляторной роли трансформирующего фактора роста TGF- β_1 в отношении VEGF-A, присутствующее только в ткани опухоли прямой кишки женщин и EGF, уровень которого был высок и имел сильную корреляционную связь с VEGF-A вне зависимости от пола в ткани рака прямой кишки, в ткани рака сигмовидной кишки корреляция с VEGF-A имела противоположные знаки для мужчин и женщин. Возможно, гендерный механизм создания васкулогенной мимикрии в опухолях толстой кишки [21] станет понятным при исследовании фона половых гормонов.

Литература

1. Бабкина И.В., Осипов Д.А., Соловьев Ю.Н., Бульчева И.В., Мачак Г.Н., Алиев М.Д., Кушлинский Н.Е. Эндостатин, плацентарный фактор роста и факторы роста фибробластов первого и второго типа в сыворотке крови больных первичными опухолями костей // Бюлл. Экспер. Биол. Мед.-2009.- Том 148, №8.-С.218-222.



2. Березов Т.Т., Овчинникова Л.К., Кузнецова О.М. и др. Фактор роста эндотелия сосудов в сыворотке крови больных раком молочной железы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2009. – Т. 147. – № 9. – С. 307-313.
3. Верескунова М.И. Эндокринно-метаболические механизмы развития гиперпластических процессов органов женской репродуктивной системы в пери- и постменопаузе. Автореферат диссер. ... к.м.н. – 2011 -Ростов-на-Дону – 23с.
4. Герштейн Е.С., Дубова Е.А., Щеголев А.И., Купшинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 2-го типа при гепатоцеллюлярном раке // Бюл. exper. биол. и мед. – 2010. – Т.149. – №6. – С.689-692.
5. Коган Е.А. Автономный рост и прогрессия опухолей // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2002. – Т. 12, №4. – С. 45-49.
6. Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Ткачук В. А. Система активаторов плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенезе. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 139-156.
7. Bendardaf Riyad, Buhmeida Abdelbaset, Hilska Marja et al. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival// *Anticancer Res.* – 2008. – 28, №68. – P. 3865-3870.
8. de Cupis A., Favoni R.E. Oestrogen/growth factor cross-talk in breast carcinoma: a specific target for novel antioestrogens // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1997. – Vol. 18, № 7. – P. 245- 251.
9. Elice F, Jacoub J, Rickles FR, Falanga A, Rodeghiero F. Hemostatic complications of angiogenesis inhibitors in cancer patients. *Am J Hematol* 2008;83(11):862-870.
10. Ferrara N., Gerber H.P., Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 669 – 676.
11. Huang Zong-hai, Chen Zhi, Qian Wei-feng et al. Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов в колоректальном раке // *J. FirstMil. Med. Univ.* – 2001. – 21, №3. – P.206-208.
12. Karner-Hanusch Judith, Marian Brigitte. Genderspezifische Aspekte bei kolorektalen Tumoren// *Wien. Med. Wochenschr.* – 2006. – 156, №19-20. – P. 541-544.
13. Lichtenberger Beate M., Tan Poi Kiang, Niederleitner Heide et al. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development // *Cell.* – 2010. – 140, №2. – P. 268-279.
14. Matthews E., Yang T., Janulis L. Down-regulation of TGF-beta1 production restores immunogenicity in prostate cancer cells <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945501>// *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 83, № 4. – P. 519- 525.
15. Narkiewicz J., Lapinska-Szumczyk S., Zurawa-Janicka D. Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta1 genes in primary endometrial cancer // *Oncol. Rep.* – 2009. – Vol. 2, № 6. – P.1529- 1537.
16. Rak J., Yu J.L., Klement G. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth // *J. Investig. Dermatol. Symp.* – 2005. – Vol. 5. – P. 24 – 33.
17. Tang X, Zhang Q, Shi S, Yen Y, Li X, Zhang Y, Zhou K, Le AD. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1alpha/VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2010 Jan 1;126(1):90-103.
18. Tobin S.W., Douville K., Benbow U. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11791181>Consequences of altered TGF-beta expression and responsiveness in breast cancer: evidence for autocrine and paracrine effects // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21, № 1. – P. 108- 118.
19. Wu Zhi-ping, Chen Ming-qing, Wang Xi-cai et al. Клиническое значение изменения уровня VEGF у больных колоректальным раком// *China J. Cancer Prev. and Treat.* – 2004. – 11, №11. – P. 1171-1173.
20. Yu H., Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression // *J Natl. Cancer Inst.* – 2000. – Vol. 92. – P. 1472-1489.
21. Zhang Jing, Gao Qing. Исследование развития васкулогенной мимикрии в опухолях желудочно-кишечного тракта// *World Chin. J. Dig.* – 2007. – 15, №7. – P. 725-728.

MARKERS OF CELL PROLIFERATION AND NEOANGIOGENESIS IN THE TUMOR TISSUE OF THE COLON

O.I. KIT
E.M. FRANTZIYANTZ
E.A. NIKIPELOVA
E.F. KOMAROVA

Rostov Research Oncological Institute

e-mail: rmioi@list.ru

In the article analyzed the results of the study of tissue levels of certain growth factors and neoangiogenesis postoperative material of patients with colorectal cancer. The development of the pathogenic mechanism of a vascular network in tumor different x sections of the colon has both common and distinctive features. Gender differences in tumor tissue associated with the expression of various growth factors is marked.

Keywords: colorectal cancer, growth factors, tumor tissue, the line of resection.