

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ЭСТРОГЕНОВ В АКТИВАЦИИ ФАКТОРОВ РОСТА АНГИО- И ЛИМФОГЕНЕЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ МЕЛАНОМЫ B16/F10

Бандовкина В.А., Франциянц Е.М., Черярина Н.Д., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, Ростов-на-Дону, 14 линия, 63), e-mail: super.gormon@yandex.ru

Злокачественная опухоль нуждается в собственной сосудистой системе, обеспечивающей ее кислородом, питательными веществами и принимающей участие в метастазировании. Одним из главных факторов, обеспечивающих неоангио- и нелимфогенез, является система факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) с рецепторами. Регуляция экспрессии VEGF и VEGF-R осуществляется гормонами, в частности эстрогенами. Результаты исследования показывают, что перевод стероидного фона на эстроновое доминирование стимулирует неоангио- и нелимфогенез в опухоли, а затем и в перифокальной зоне и неповрежденной коже. По мере роста меланомы, в указанных структурах происходит накопление эстрогена, на фоне снижения насыщенности эстрадиолом, эстриолом и тестостероном. Таким способом меланома осуществляет аутокринно-паракринную регуляцию, стимулируя повышение VEGF-A и VEGF-C, а также VEGF-R1 и VEGF-R2 в собственных клетках и окружающих тканях.

Ключевые слова: меланома B16/F10, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A, VEGF-C), рецепторы фактора роста эндотелия сосудов, эстрон, эстрадиол, тестостерон.

REGULATORY ROLE OF ESTROGENS IN ACTIVATION OF ANGIOGENESIS AND LYMPHOGENESIS GROWTH FACTORS IN PATHOGENESIS OF B16/F10 MELANOMA

Bandovkina V.A., Frantsiyants E.M., Cheryarina N.D., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K.

Rostov Research Institute of Oncology. Rostov-on-Don, 344037 14 Line 63. Russia. E-mail: super.gormon@yandex.ru

Malignant tumor needs its own vascular system providing it with oxygen and nutrients and participating in metastasis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor system is one of the main factors providing neoangiogenesis and neolymphogenesis. Hormones, estrogens in particular, regulate VEGF and VEGF-R expression. The results of the study demonstrate that steroid profile switch to estrone dominance stimulates neoangiogenesis and neolymphogenesis in tumor and then in perifocal zone and intact skin. During the melanoma growth, estrone accumulates in the mentioned structures with a decrease in saturation with estradiol, estriol and testosterone. In this way melanoma performs autocrine/paracrine regulation, stimulating an increase of VEGF-A and VEGF-C, as well as VEGF-R1 and VEGF-R2 in its cells and surrounding tissues.

Keywords: B16/F10 melanoma, vascular endothelial growth factor (VEGF-A, VEGF-C), vascular endothelial growth factor receptors, estrone, estradiol, testosterone.

Злокачественная опухоль объемом более 1 мм³ нуждается в собственной системе кровообращения, что дает неоплазме способность к автономному развитию, а также возможность метастазирования [4]. Основными агентами неоангио- и нелимфогенеза является семейство факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF), представленные VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, осуществляющими свой биологический эффект в результате взаимодействия с тирозинкиназными рецепторами R₁, R₂ и R₃. Физиологический ангиогенез представляет собой ответ либо на гормональную стимуляцию (в репродуктивной системе), либо на изменение в окружающей среде, в частности гипоксию [4]. Исследование VEGF при злокачественных процессах указало на повышение экспрессии этого фактора роста в опухолевых клетках [1]. Процессы неоангио- и нелимфогенеза находятся под воздействием

индукторов и ингибиторов, в норме секреция тканевых ингибиторов превалирует над индукторами [2]. С возрастом соотношение половых гормонов, а также баланс эстрогенов меняется, в частности с повышением в тканях эстрогена. Следовательно, гормональная регуляция факторов роста и их рецепторов также может претерпевать изменения. Некоторые исследователи полагают, что ангиогенез в нормальных тканях находится под гормональным контролем, а при злокачественной трансформации этот контроль меняется [7]. Считают, что VEGF играет важную роль при раке молочной железы, стимулируя рост и распространение опухоли посредством комплексных паракринных и аутокринных воздействий [1]. Меланома кожи - одно из самых злокачественных онкологических заболеваний, характеризующееся высокой частотой метастазирования. Клетки меланомы способны к синтезу гормонов и факторов роста, в них обнаружены рецепторы стероидных гормонов [3]. Экспериментальные исследования позволяют изучить насыщенность как самой опухоли, так и окружающих ее тканей в процесс роста меланомы, понять процессы, в результате которых происходит нарушение локальных механизмов регуляции нормального клеточного роста.

Целью исследования явилось изучение регуляторной роли различных эстрогенов на экспрессию VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R1 и VEGF-R2 в опухоли и окружающих ее тканях на этапах роста перевивной меланомы B16/F10 самцам мышей C57BL/6.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на самцах мышей линии C57BL/6 (n=40), 8-недельного возраста с начальной массой 24-26 г. Животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышшиной, метастазирующей в легкие меланомы B16/F10. Культура клеток меланомы B16/F10 была предоставлена РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные были разделены на 2 группы (контрольную и опытную) случайным образом: 10 животных в контрольной группе и 30 животных в опытной. Перевивка меланомы B16 производилась путем подкожного введения в правую заднюю лапку мышам опытной группы 0,5 мл взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса (2×10^5 клеток опухоли в среде 199) по стандартным методикам. Контрольной группе животных вводили 0,5 мл физиологического раствора. В первую, вторую и третью недели эксперимента животных быстро декапитировали и выделяли опухоль, перифокальную зону и

неповрежденную кожу. Из тканей получали 10%-ные цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, в которых стандартными ИФА методами определяли уровень эстрадиола - E₂, эстриола - E₃, эстрона E₁, тестостерона общей и свободной формы – T_{общ} и T_{св}, а также VEGF-A, VEGF-C и их рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета Statistica 6,0 (Stat-Soft, 2001). Оценка достоверности произведена с использованием t-критерия Стьюдента. Уровень P<0,05 принимали как значимый.

Результаты исследований представлены на 1, 2 и 3-ю недели после перевивки опухоли B16/F10, когда вес опухоли достигал в среднем 115,7, 4089,3 и 5990 мг соответственно. Полученные результаты исследования уровня гормонов и факторов роста сравнивали с показателями в интактной коже мышей контрольной группы (табл. 1, 2).

Таблица 1

Уровень половых гормонов в опухоли и окружающих ее тканях на этапах роста меланомы B16/F10

	Эстрадиол (нМоль/гТК)	Эстриол (нМоль/гТК)	Эстрон (пгМоль/гТК)	T (нМоль/гТК)	T _{св.} (пМоль/гТК)
Интактная кожа	0,47±0,02	2,26±0,18	202,8±15,4	53,7±1,4	67,7±3,2
1 неделя, опухоль, средний вес 115,7 мг					
Кожа	0,29±0,015 ¹	2,65±0,17	221,9±17,1	28±0,19 ¹	2,5±0,2 ¹
Опухоль	0,39±0,02	1,7±0,14	285,0±19,4 ¹	36,9±0,9 ¹	9,76±0,7 ¹
п/зона	0,41±0,03	3,85±0,21 ¹	176,5±11	32±1,4 ¹	3,94±0,25 ¹
2 неделя, опухоль, средний вес 4089,25 мг					
Кожа	0,3±0,01 ¹	2,52±0,15	114,4±9,8 ¹	27,3±1,3 ¹	1,9±0,14 ¹
Опухоль	0,29±0,01 ¹	0,93±0,04 ¹	417,98±20,5 ¹	31,9±1,7 ¹	13,96±0,9 ¹
п/зона	0,45±0,02	3,12±0,2 ¹	120,4±8,3 ¹	25,8±1,6 ¹	7,67±0,5 ¹
3 неделя, опухоль, средний вес 5990 мг					
Кожа	0,26±0,01 ¹	1,86±0,14	268,9±16,2 ¹	17,1±0,7 ¹	0,76±0,04 ¹
Опухоль	0,29±0,01 ¹	0,86±0,03 ¹	417,7±23 ¹	20,5±0,5 ¹	4,09±0,3 ¹
п/зона	0,34±0,01 ¹	2,05±0,15	319±21 ¹	21,3±0,8 ¹	1,98±0,11 ¹

Примечание: 1 – достоверно по отношению к показателям в интактной коже p<0,05.

В ткани опухоли в первую неделю было установлено повышение уровня эстрона в 1,4 раза и снижение эстриола в 1,3 раза на фоне увеличения концентрации VEGF-A и VEGF-C и их рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 в 8,7, 6,2, 1,9 и 8,2 раза соответственно. Учитывая тот факт, что андрогены являются предшественниками в цепи синтеза эстрогенов, исследовали насыщенность тканей общей и свободной формой тестостерона. В опухоли на первую неделю перевивки было установлено снижение уровня тестостерона в 1,5 раза, а свободной формы в 6,9 раза.

Вторая неделя опухолевого роста характеризовалась еще большим повышением уровня эстрона в меланоме – в 2,1 раза, на фоне снижения концентрации E₂ и E₃ в 1,6 и 2,4 раза

соответственно. При этом насыщенность опухоли тестостероном оставалась такой же сниженной, как и в первую неделю – в 1,7 и в 6,9 раза, по сравнению с интактной кожей.

Таблица 2

Факторы роста эндотелия сосудов в опухоли и окружающих ее тканях на этапах роста меланомы B16/F10

Показатель	VEGF-A пг/гтк	VEGF-C пг/гтк	VEGF-R1 нг/гтк	VEGF-R2 нг/гтк
Интактные животные				
кожа	209,1±15,1	6480±128	1,5±0,1	27,2±1,4
1 неделя роста B16 (вес опухоли 115,7 мг)				
кожа	293,3±16,2 ¹	23000±500 ¹	3±0,2 ¹	45,4±3,1 ¹
опухоль	1812,9±154 ¹	40100±1200 ¹	2,9±0,12 ¹	222,5±15,3 ¹
п/зона	783,3±62 ¹	11500±600 ¹	10,1±0,78 ¹	75,7±5,1 ¹
2 неделя роста B16 (вес опухоли 4089,3 мг)				
кожа	275,1±18 ¹	19450±700 ¹	2,9±0,11 ¹	33,3±1,4 ^{1,2}
опухоль	10139,7±421 ^{1,2}	168400±1572 ^{1,2}	44,0±1,1 ^{1,2}	399,6±20,8 ^{1,2}
п/зона	1272,7±95 ^{1,2}	113800±5620 ^{1,2}	9,6±0,7 ¹	72,5±6,7 ¹
3 неделя роста B16 (вес опухоли 5990,1 мг)				
кожа	348,2±24 ¹	55000±782 ^{1,2}	2,9±0,1 ¹	108,9±7,1 ^{1,2}
опухоль	12933,9±600 ¹	161900±2450 ¹	38,6±1,2 ¹	351,1±26,5 ¹
п/зона	5210,3±232 ^{1,2}	106900±5678 ¹	7,47±0,54 ¹	567,5±31,2 ^{1,2}

Примечание: 1 - достоверно по отношению к показателям в ткани интактных животных; 2 - достоверно по отношению к показателям в предыдущий срок исследования $p < 0,05$.

Во вторую неделю роста меланомы в опухоли отмечен максимальный прирост концентраций: уровень VEGF-A превысил показатели в контрольной группе в 48,5 раза, а показатели в первую неделю – в 5,6 раза; насыщенность опухоли VEGF-C возросла в 25,9 раза по сравнению с интактной кожей и в 4,2 раза по сравнению с показателями в первую неделю. Концентрации рецепторов выросли: VEGF-R1 в 29 раз, а VEGF-R2 в 14,7 раза по сравнению с контролем и в 15 и в 1,8 раза соответственно по сравнению с первой неделей опухолевого роста.

На завершающем этапе роста меланомы, т.е. через 3 недели от момента перевивки, уровень эстрогена в опухоли оставался, как и во вторую неделю эксперимента, повышенным в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой. При этом насыщенность эстрадиолом и эстриолом была снижена в 1,6 и в 2,6 раза соответственно. Достоверно снизились показатели общей и свободной формы тестостерона в опухоли по сравнению со второй неделей эксперимента: в 1,6 и в 3,4 раза соответственно. Что касается системы факторов роста, то их концентрации и уровень рецепторов в меланоме не изменился по сравнению с предыдущим сроком исследования, оставаясь выше показателей в контрольной группы: VEGF-A - в 61,8 раза, VEGF-C – в 24,9 раза, VEGF-R1 - в 25,7 раза и VEGF-R2 - в 12,9 раза.

Ближайшим окружением опухоли является ее перифокальная зона. В исследовании были установлены изменения как гормонального уровня, так и насыщенности факторами роста и их рецепторами на протяжении роста меланомы B16/F10. В первую неделю роста меланомы в перифокальной зоне был установлен рост уровня эстриола в 1,7 раза на фоне снижения показателей общего и свободного тестостерона в 1,7 и в 17,2 раза соответственно по сравнению с интактной кожей. При этом концентрация VEGF-A и VEGF-C превысила показатели в интактной коже в 3,7 и в 1,8 раза соответственно. Однако максимальный прирост был установлен в концентрации VEGF-R1 - увеличился в 6,7 раза, в то время как VEGF-R2 - в 2,8 раза. Во вторую неделю эксперимента уровень эстриола в перифокальной зоне оставался повышенным в 1,4 раза, но при этом снизилась концентрация эстрогена – в 1,7 раза по сравнению с интактной кожей. Насыщенность перифокальной зоны тестостероном была ниже нормы: в 2,1 раза общей формой и в 8,8 раза – свободной. Уровень VEGF-A в перифокальной зоне увеличился в 1,6 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования в 1,6 раза, тогда как VEGF-C - в 9,9 раза. При этом уровень рецепторов оставался таким же, как и в первую неделю исследования, превышая показатели интактной кожи VEGF-R1 в 6,4 раза, а VEGF-R2 в 2,7 раза. В третью неделю роста меланомы насыщенность перифокальной зоны эстроном превысила показатели контрольной группы в 1,6 раза на фоне сниженного в 1,4 раза эстрадиола, уровень эстриола не отличался от контроля. Насыщенность зоны, окружающей меланому, тестостероном оставалась сниженной, в 2,5 раза – общей формой тестостерона и в 34,2 раза – свободной формой андрогена. При этом уровень Тсв. в конце эксперимента была в 3,9 раза ниже, чем во вторую неделю. Насыщенность перифокальной зоны VEGF-A продолжала расти, превышая показатели предыдущего этапа в 4,1 раза, а контрольной группы в 24,9 раза. Насыщенность перифокальной зоны VEGF-C превышала норму в 16,5 раза, не отличаясь от показателей во вторую неделю эксперимента. Уровень VEGF-R1 не имел достоверных отличий от показателей во вторую неделю, превышая норму в 5 раз, а вот насыщенность перифокальной зоны VEGF-R2 оказалась максимальной, повысившись в 20,9 раза по сравнению с контрольной группой и в 7,8 раза по сравнению с показателями во вторую неделю.

Была исследована неповрежденная кожа у мышей с перевивной меланомой B16/F10 на всех сроках эксперимента. Уже на первую неделю эксперимента в коже снизился уровень эстрадиола в 1,6 раза, общего тестостерона – в 1,9 раза и свободной формы Т – в 27,1 раза. При этом насыщенность неповрежденной кожи VEGF-A повысилась в 1,4 раза, VEGF-C – в 3,5 раза, VEGF-R1 – в 2 раза, а VEGF-R2 – в 1,7 раза. На вторую неделю эксперимента в коже продолжилось снижение эстрогенов и андрогенов – за счет снижения эстрогена в 1,8 раза, эстрадиола в 1,6 раза, общего тестостерона в 2 раза и свободной формы в 35,6 раза.

Насыщенность кожи факторами роста и их рецепторами во вторую неделю роста меланомы практически не отличалась от первой: уровень VEGF-A превышал показатели контрольной группы в 1,3 раза, VEGF-C – в 3 раза, VEGF-R1 – в 2 раза, VEGF-R2 в 1,4 раза. В третью неделю роста меланомы в неповрежденной коже уровень эстрогена превысил норму в 1,3 раза, на фоне сниженного в 1,8 раза эстриола, в 3 раза Т и в 89 раз св Т. При этом насыщенность кожи VEGF-A оставалась повышенной в 1,7 раза, а VEGF-C – в 8,5 раза по сравнению с контролем и в 2,8 раза по сравнению с показателями во вторую неделю эксперимента. Уровень VEGF-R1 в коже превышал норму в 1,9 раза, а VEGF-R2 – возрос в 2,9 раза по сравнению с предыдущим этапом роста и в 4 раза по сравнению с контролем.

Анализируя полученные результаты, можно сказать, что в процессе роста меланомы B16/F10 в опухоли преобладающим эстрогеном оказался эстрон, повышение уровня которого происходит на фоне снижения концентрации эстрадиол и эстриола (неактивного метаболита эстрогенов), а также андрогенов (предшественников в цепи синтеза). Скорее всего, это связано с изменением субстратной специфичности и/или активности ферментов синтеза и метаболизма стероидов, однако это требует дальнейшего исследования. Несмотря на то что в начале эксперимента (1-я и 2-я недели) в окружающих опухоль перифокальной зоне и неповрежденной коже уровень эстрогена даже снизился, к концу эксперимента его количество превысило показатели контрольной группы. Возможно, клетки опухоли являлись «ловушкой» необходимых для собственного роста гормонов и факторов роста, оттягивая необходимые вещества из близлежащих регионов. Для подтверждения этого предположения мы рассчитали среднее содержание эстрогена в опухоли и окружающих ее тканях на разных этапах роста меланомы. В результате подтвердили, что в 1-ю и во 2-ю недели средняя концентрация эстрогена в опухоли и окружающих ее тканях не превышала показатели в контрольной группе, концентрируясь в меланоме, а к 3-й повысилась в 1,7 раза. К концу эксперимента, когда меланома оказалась достаточно насыщена эстроном, его уровень повысился и в окружающих тканях. В процессе роста меланомы перифокальная зона и неповрежденная кожа оказываются опухолевым полем, подчиненным ее метаболической «программе», а конкретно инверсии синтеза стероидов в пользу эстрогена. На протяжении всего эксперимента в ткани опухоли существенно вырос уровень как VEGF-A и VEGF-C, так и их рецепторов. Причем для опухоли был более выражен прирост VEGF-A и его рецептора, чем VEGF-C и VEGF-R2. В окружающих опухоль тканях установлен значительный рост VEGF A и C и их рецепторов к 3-й недели эксперимента, к тому моменту, когда в этих тканях произошло накопление эстрогена. S. Hyder с соавторами продемонстрировали, что в составе гена VEGF находятся две последовательности, гомологичные эстроген-чувствительным элементам и специфически связывающие обе формы рецепторов эстрогенов

– α и β [8]. Ранее нами было установлено изменение гормонального статуса и повышение уровня VEGF и VEGF-R в пигментных новообразованиях кожи у людей [5; 6]. Для перифокальной зоны приоритетным оказалось повышение уровня VEGF-A, а для неповрежденной кожи – VEGF-C. Считают, что ключевым регулятором роста кровеносных сосудов является VEGF-A, тогда как VEGF-C регулирует преимущественно лимфоангиогенез [1]. Очевидно, повышение насыщенности тканей эстроном оказало стимулирующее действие на усиленную экспрессию факторов роста и их рецепторов. Таким образом, одним из патогенетических моментов роста переросшей меланомы B16 явилась аутокринная регуляция с помощью измененного стероидогенеза, экспрессии VEGF и их рецепторов, затем по мере роста переросшая в парокринное действие на окружающие ткани. В результате чего произошло расширение опухолевого поля с преобразованием гормонального фона и насыщенности факторами неоангио- и нелимфоангиогенеза перифокальной зоны и неповрежденной кожи.

Список литературы

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Адамян Л.В., Огнерубов Н.А. Фактор роста эндотелия сосудов – клинически значимый показатель при злокачественных новообразованиях // Вестник ТГУ. - 2014. – Т. 19, № 1. - С. 10-20.
2. Мнихович М.В., Гершзон Д., Брикман М., Давидзон Я., Гаврилюк А.А., Фомина Л.В., Гуминский Ю.И., Вернигородский С.В., Мигляс В.Г. Морфогенетические механизмы клеточных взаимодействий в процессе ангиогенеза // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2012. – Т. 1, № 3. - С. 53-65.
3. Молочкова В.А., Демидова Л.В. Меланоцитарные невусы и меланома кожи. - М. : Литтерра, 2012. - 105 с.
4. Спринджук М.В. Ангиогенез // Морфология. - 2010. – Т. 4, № 2. – С. 4-13.
5. Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Комарова Е.Ф., Позднякова В.В., Погорелова Ю.А. Гормональный профиль меланомы и окружающих ее тканей // Молекулярная медицина. - 2014. - № 6. - С. 48-51.
6. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Бандовкина В.А., Позднякова В.В., Черярина Н.Д. Сравнительная оценка экспрессии факторов роста в пигментных новообразованиях кожи // Молекулярная медицина. – 2015. - № 1. - С. 14-16.
7. Greb R.R., Maier I., Walwiner D., Kiesel L. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions // Br. J. Cancer. - 1999. - V. 81, № 2. - P. 225-231.

8. Hyder S.M., Nawaz Z., Chiappetta C., Stancel G.M., Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor // Cancer Res. - 2000. - Vol. 60, № 12. - P. 3183-3190.

Рецензенты:

Непомнящая Е.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, зав. лабораторией изыскания новых противоопухолевых средств ФГБУ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.