

ФАКТОРЫ РОСТА В ТКАНИ РАКА ПИЩЕВОДА РАЗЛИЧНОГО ГИСТОГЕНЕЗА

Кит О. И., Франциянц Е. М., Колесников Е. Н., Черярина Н. Д., Козлова Л. С.,
Погорелова Ю. А., Розенко Л. Я.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, e-mail: super.gormon@yandex.ru

В последние десятилетия драматически изменилось биологическое поведение опухоли в сторону снижения дифференцировки и увеличивающегося вовлечения регионарных лимфоузлов, что диктует необходимость изучения патогномоничных факторов, определяющих рост и прогрессию опухоли. Целью настоящего исследования явилось изучение уровня некоторых факторов роста в ткани злокачественной опухоли пищевода, ее перифокальной зоны и ткани по линии резекции. Методом ИФА с использованием стандартных тест-систем определяли уровень ростовых факторов – VEGF-A и его рецептора VEGF-R1, VEGF-C и его рецептора VEGF-R3, EGF, IFR-1 и IFR-2, TGF- β 1. Установлено, что ткань плоскоклеточного рака имеет более высокий, чем в аденокарциноме уровень EGF и TGF- β 1, тогда как в ткани аденокарциномы выше содержание VEGF-C и IFR-1; перифокальная зона плоскоклеточного рака не имеет достоверных отличий от показателей ростовых факторов в соответствующей условно интактной ткани, тогда как в аденокарциноме уровень большинства изученных факторов (кроме EGF и TGF- β 1) занимает промежуточное положение между показателями в ткани опухоли и условно интактной ткани; в условно интактной ткани при плоскоклеточном раке большинство изученных показателей (кроме VEGF-C и IFR-1) превосходят таковые в соответствующей ткани при аденокарциноме.

Ключевые слова: ткань аденокарциномы и плоскоклеточного рака пищевода, факторы роста.

GROWTH FACTORS IN TISSUES OF ESOPHAGEAL CANCER OF DIFFERENT HISTOGENESIS

Kit O. I., Frantsiyants E. M., Kolesnikov E. N., Cheryarina N. D., Kozlova L. S.,
Pogorelova Y. A., Rosenko L. Y.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: super.gormon@yandex.ru

In recent decades, biological behavior of tumor has changed dramatically towards its differentiation and the increasing involvement of regional lymph nodes, which requires studying pathognomonic factors determining tumor growth and progression. The purpose of the study was to analyze levels of some growth factors in tissues of malignant esophageal tumors, their perifocal zone and along the resection line. Levels of VEGF-A and its receptor VEGF-R1, VEGF-C and its receptor VEGF-R3, EGF, IFR-1 and IFR-2, TGF- β 1 were measured by ELISA using standard test systems. Tissue of squamous cell carcinoma had higher levels of EGF and TGF- β 1 compared to adenocarcinoma, while VEGF-C and IFR-1 levels were higher in adenocarcinoma tissues; indices of growth factors in perifocal zone of squamous cell carcinoma were similar to that in the corresponding conditionally intact tissue, while levels of the majority of the studied factors in adenocarcinoma (except EGF and TGF- β 1) were between the indices in tumor and intact tissues; the majority of the studied parameters (except VEGF-C and IFR-1) in conditionally intact tissue in squamous cell carcinoma exceeded that in the corresponding tissue in adenocarcinoma.

Keywords: tissue of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus, growth factors.

Рак пищевода (РП) входит в пятерку наиболее частых причин смерти среди онкологических больных в мире. Заболеваемость в России составляет 6,4 на 100 тыс.: 7,0 и 1,1 у мужчин и женщин соответственно. В структуре смертности мужского населения России РП в 2012 г. составил 5,6 %, женского – 0,79 %. Стандартизованные показатели смертности практически не отличаются от показателей заболеваемости, что является индикатором неблагоприятного прогноза течения заболевания [1]. До настоящего времени не удается добиться принципиального улучшения действия существующих методов или найти новые

пути, способные обеспечить получение удовлетворительного терапевтического эффекта при лечении рака пищевода.

В последние десятилетия драматически изменилось и биологическое поведение опухоли в сторону снижения дифференцировки и увеличивающегося вовлечения регионарных лимфоузлов, что диктует необходимость изучения патогномоничных факторов, определяющих рост и прогрессию опухоли. Факторы роста представляют собой биологически активные соединения, продуцируемые неспецифическими клетками многих тканей, являющиеся основными переносчиками митогенного сигнала. Они осуществляют контроль за ростом и дифференцировкой и регулируют функциональное состояние гладких мышечных клеток, такое как секреция компонентов экстрацеллюлярного матрикса, сократительная активность ткани, экспрессия различных рецепторов, межклеточные контакты, а также ангио- и лимфангиогенез [3]. Ангиогенез – сложный процесс, в регуляции которого участвуют как стимулирующие, так и ингибирующие факторы [10]. Доминирование факторов, стимулирующих ангиогенез, т.е. факторов, которые способствуют росту новых сосудов, приводит к активации неоангиогенеза. Особое значение имеют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF) и трансформирующие факторы роста « α » и « β », которые известны как факторы «запуска» ангиогенеза [8]. Известно, что главным инициатором прорастания кровеносных сосудов в опухолевую ткань считается VEGFA, который является специфическим митогенным сигналом для эндотелиальных клеток, запускающим механизмы клеточного деления и миграции. VEGF-индуцированная сосудистая сеть опухоли имеет ряд структурных и функциональных особенностей, которые обеспечивают рост и прогрессию опухоли, среди них повышенная проницаемость и хаотичное расположение сосудов. VEGF-C и VEGF-D вовлекаются в регуляцию лимфангиогенеза – процесса, влияющего на способность опухоли к метастазированию [5]. Инсулиноподобные факторы роста являются для большинства клеток мощными факторами миграции и стимулируют клеточную подвижность, что происходит в процессе образования метастазов [9].

Одним из перспективных диагностических и прогностических маркеров является уровень экспрессии в опухоли эпидермального фактора роста (EGF). Доказано, что EGF, связываясь со своими рецепторами, способствует развитию клеточной пролиферации опухолевых клеток по паракринному и аутокринному механизмам и их выживанию [7]. Повышенный уровень EGF и его рецепторов определен как компонент многих видов онкологических заболеваний (рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, колоректальный рак и др.). TGF 1 является мультипотентным цитокином, важным

модулятором клеточного роста, воспаления, пролиферации, дифференцировки и апоптоза [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня некоторых факторов роста в ткани злокачественной опухоли пищевода, ее перифокальной зоны и ткани по линии резекции.

Материалы и методы. Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ». Обязательным условием включения в обследование было добровольное информированное согласие всех больных. Исследовали образцы тканей, полученных от 36 больных, поступивших на оперативное лечение в РНИОИ: 27 – плоскоклеточный рак пищевода, 9 – аденокарцинома. Все больные имели II стадию процесса (G2). Гистологический контроль осуществлялся во всех случаях. Возраст больных составил от 38 до 74 лет. В ходе оперативных вмешательств производилось удаление злокачественных образований пищевода с последующим биохимическим исследованием образцов тканей: опухоли, непосредственно прилегающей к опухолевому очагу (перифокальная зона), а также визуально неизмененных участков пищевода, отступая 3–5 см от края опухолевой ткани (линия резекции или условно здоровая ткань). В 10 % цитозольных фракциях ткани, приготовленных на калий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащим 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА методом ИФА с использованием стандартных тест-систем определяли уровень ростовых факторов – VEGF-A и его рецептора VEGF-R1 (BenderMedSystem, Австрия), VEGF-C и его рецептора VEGF-R3 (BenderMedSystem, Австрия), EGF (Biosource, США), IFR-1 и IFR-2 (Mediagnost, США), TGF- β 1 (BenderMedSystem, Австрия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ MicrosoftExcel (Windows XP). Данные таблиц представлены в виде $M \pm m$. Разницу отличий оценивали по критерию Стьюдента и считали достоверной при $p < 0,05$. Анализ корреляции между параметрами определяли по коэффициенту линейной корреляции Пирсона (r), корреляцию считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Исторически плоскоклеточный рак пищевода и аденокарцинома всегда воспринимались как единая болезнь, и не существовало дифференцированного подхода к их лечению. К настоящему моменту времени накопилось немало исследований, подтверждающих гипотезу о том, что эти две гистологические формы злокачественной опухоли пищевода являются собой разные болезни со своими собственными этиологией, эпидемиологией, прогнозом и ответом на проводимое лечение [2].

Учитывая различные этиопатогенетические факторы развития двух гистотипов рака пищевода, интерес представляло сравнительное изучение уровня факторов роста в условно интактной ткани пищевода, полученной по линии резекции при оперативном лечении

больных плоскоклеточным раком пищевода и аденокарциномой (таблица). Установлено, что уровень VEGF-C и IFR-1 и VEGF-R3 в образцах ткани по линии резекции при плоскоклеточном раке и аденокарциноме не имел достоверных отличий (таблица). Вместе с тем уровни VEGF-A, VEGF-R1, EGF, TGF- β 1 и IFR-2 имели выраженные отличия. Так, уровень VEGF-A в ткани плоскоклеточного рака превосходил аналогичный показатель в условно интактной ткани при аденокарциноме в 3,2 раза, VEGF-R1 был выше в 1,8 раза в условно интактной ткани при плоскоклеточном раке пищевода относительно соответствующей ткани при аденокарциноме.

Показатели факторов роста в тканях при плоскоклеточном раке пищевода и аденокарциноме

Показатели	исследуемая ткань					
	плоскоклеточный рак			аденокарцинома		
	опухоль	перифок. зона	линия резекции	опухоль	перифок. зона	линия резекции
VEGF-A	1953,6 \pm 174,6 ^{1,2}	344,5 \pm 29,6	350,5 \pm 32,4 ³	2114,3 \pm 196,3 ^{1,2}	357,4 \pm 33,8 ¹	109,8 \pm 8,7 ²
VEGF-R1	72,4 \pm 6,5 ^{1,2,3}	13,1 \pm 1,2 ³	11,4 \pm 0,9 ³	20,2 \pm 2,1 ^{1,2}	7,9 \pm 0,8 ¹	6,2 \pm 0,4 ²
VEGF-A/ VEGF-R1	26,9 \pm 3,1 ³	26,2 \pm 2,4 ³	30,7 \pm 2,9 ³	104,6 \pm 9,8 ^{1,2}	45,2 \pm 4,3 ¹	17,7 \pm 1,6 ²
VEGF-C	7,7 \pm 0,8 ^{1,2,3}	3,5 \pm 0,6 ³	2,5 \pm 0,4	20,6 \pm 1,9 ^{1,2}	5,6 \pm 0,6 ¹	2,5 \pm 0,3 ²
VEGF-R3	9,6 \pm 0,8	8,2 \pm 0,7	8,1 \pm 0,8	9,1 \pm 0,9 ¹	8,7 \pm 0,6	7,0 \pm 0,6
VEGF-C/ VEGF-R3	0,8 \pm 0,09 ^{1,2,3}	0,4 \pm 0,06 ³	0,3 \pm 0,05	2,3 \pm 0,4 ^{1,2}	0,6 \pm 0,05 ¹	0,4 \pm 0,05 ²
EGF	229,1 \pm 21,3 ^{1,3}	251,3 \pm 51,2 ³	168,7 \pm 32,7 ³	130,4 \pm 11,7 ^{1,2}	72,8 \pm 6,4	73,7 \pm 7,5
TGF- β 1	4279,9 \pm 362,4 ^{1,2,3}	2719,3 \pm 198,4 ³	2975,6 \pm 203,4 ³	2615,6 \pm 253,2 ^{1,2}	1424,2 \pm 165,3	1190,1 \pm 98,7
IFR-1	10,2 \pm 1,1 ^{1,2,3}	16,4 \pm 1,8 ³	17,4 \pm 1,5	31,7 \pm 2,9 ^{1,2}	23,5 \pm 2,1 ¹	17,4 \pm 1,6 ²
IFR-2	7,2 \pm 0,7 ^{1,2}	17,4 \pm 2,6	13,8 \pm 1,1 ³	6,3 \pm 0,6 ²	15,2 \pm 1,3 ¹	7,3 \pm 0,8 ²

Примечание: ¹ – достоверно по отношению к показателям в условно интактной ткани по линии резекции; ² – достоверно по отношению к показателям в ткани соответствующей перифокальной зоны; ³ – достоверно по отношению к показателям в соответствующей ткани при аденокарциноме.

Вместе с тем соотношение VEGF-A/VEGF-R1, характеризующее уровень свободного VEGF-A, было в 1,7 раза ниже в условно интактной ткани при аденокарциноме. Содержание EGF, TGF- β 1 и IFR-2 в условно интактной ткани при плоскоклеточном раке превосходило показатели в соответствующих образцах при аденокарциноме в 2,3 раза, 2,5 раза и 1,9 раза соответственно.

В образцах ткани плоскоклеточного рака пищевода найдено, что уровень VEGF-A и его рецептора VEGF-R1 превышал показатель в соответствующей ткани по линии резекции в 5,6 раза и 6,4 раза соответственно, а в аденокарциноме – в 19,3 раза и 3,3 раза соответственно (таблица). При этом коэффициент VEGF-A/VEGF-R в ткани плоскоклеточного рака, определяющий уровень свободного VEGF-A, не имел достоверных отличий от показателя в условно интактной ткани, а в ткани аденокарциномы превосходил нормативный показатель в 5,9 раза. Содержание VEGF-C в ткани плоскоклеточного рака было в 2,7 раза ниже, чем в ткани аденокарциномы, а уровень VEGF-R3 не имел достоверных отличий. Естественно, соотношение VEGF-C/ VEGF-R3 в ткани плоскоклеточного рака было ниже, чем в аденокарциноме, в 2,9 раза. Уровень EGF в ткани плоскоклеточного рака не имел достоверных различий от показателя линии резекции, а в ткани аденокарциномы был выше в 1,8 раза. Содержание TGFβ1 в ткани плоскоклеточного рака было выше, чем в соответствующей ткани по линии резекции, в 1,4 раза, в ткани аденокарциномы – в 2,2 раза. Содержание IGF-I и IGF-II в ткани плоскоклеточного рака было снижено относительно соответствующей ткани по линии резекции в 1,7 раза и 1,9 раза соответственно. В ткани аденокарциномы уровень инсулиноподобных факторов роста имел принципиальные отличия. Так, содержание IGF-I было повышено относительно ткани по соответствующей линии резекции в 1,8 раза и превосходило показатель в ткани плоскоклеточного рака в 3,1 раза, содержание IGF-II не имело достоверных отличий от значений соответствующей интактной и ткани и показателя в ткани плоскоклеточного рака.

Достаточно неожиданным оказалось, что все показатели изученных ростовых факторов в перифокальной зоне плоскоклеточного рака пищевода не имели достоверных отличий от значений в условно интактной ткани по линии резекции (табл.). Вместе с тем наши результаты согласуется с данными О. И. Кита и соавт. [12], полученными при изучении ростовых факторов в ткани перифокальной зоны рака толстой кишки.

Несколько иная ситуация отмечена в ткани перифокальной зоны аденокарциномы. Не имели достоверных отличий от показателей в условно интактной ткани только уровень EGF и TGFβ1. Содержание VEGF-A и VEGF-R1 в перифокальной зоне аденокарциномы было повышено относительно соответствующей интактной ткани в 3,3 раза и 1,3 раза соответственно, а VEGF-A/VEGF-R1 – в 2,6 раза. Относительно ткани аденокарциномы эти показатели были снижены: VEGF-A – в 5,9 раза, VEGF-R1 – в 2,6 раза и VEGF-A/VEGF-R1 – в 2,3 раза. Уровень VEGF-C в перифокальной зоне аденокарциномы был в 2,2 раза выше, чем в условно интактной ткани, но в 3,7 раза ниже, чем в ткани аденокарциномы, а VEGF-R3 был в 1,2 раза выше, чем в условно интактной ткани по линии резекции, и не имел достоверных отличий от показателя в ткани аденокарциномы. Соотношение VEGF-C/VEGF-

R3 в исследуемой ткани в 1,5 раза превосходил показатель в условно интактной ткани, но был снижен в 3,8 раза относительно ткани опухоли. Содержание IGF-I и IGF-II в ткани перифокальной зоны аденокарциномы повышалось относительно интактной ткани в 1,3 раза и 2,1 раза соответственно, однако, относительно ткани опухоли IGF-I был снижен в 1,3 раза, а IGF-II, напротив, повышен в 2,4 раза.

Таким образом, показано, что развитие патогенного механизма создания сосудистой сети в ткани плоскоклеточного рака и аденокарциномы пищевода имеет как общие, так и отличительные черты, связанные с экспрессией различных факторов роста. К общим механизмам относится активация VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R1, VEGF-R3, TGF- β_1 и EGF в ткани злокачественной опухоли вне зависимости от ее гистогенеза. А различия касаются содержания IGF-I и IGF-II. Считается, что IGF наряду с EGF являются индукторами VEGF как в норме, так и в патологии [8]. Однако сильная положительная корреляционная связь уровней VEGF-A и IGF-1 ($r=76$; $p<0,01$), но не IGF-II, прослеживалась только в ткани аденокарциномы, тогда как в ткани плоскоклеточного рака эта связь носила отрицательный характер VEGF-A и IGF-1 ($r= - 81$; $p<0,01$) и VEGF-A и IGF-2 ($r= -79$; $p<0,01$). То же касается и VEGF-C: сильная положительная корреляционная связь с IGF-1 ($r=79$; $p<0,01$), но не IGF-II в аденокарциноме, и сильная отрицательная связь с IGF-1 ($r= - 83$; $p<0,01$) и с IGF-2 ($r= -87$; $p<0,01$) при плоскоклеточном раке. Вероятно, в плоскоклеточном раке индуктором VEGF-A и VEGF-C является только EGF, с которым прослеживается сильная корреляционная связь: $r=75$ ($p<0,01$) и $r=77$ ($p<0,01$) соответственно, а в аденокарциноме активаторами факторов ангио- и лимфангиогенеза выступают IGF-1 и EGF ($r=76$ при $p<0,01$ и $r=79$ при $p<0,01$ с VEGF-A и $r=78$ при $p<0,01$ и $r=77$ при $p<0,01$ с VEGF-C).

Необходимо остановиться на характеристике изученных показателей в перифокальных зонах двух видов злокачественной опухоли пищевода. Как было показано, уровень всех ростовых факторов в этом регионе при плоскоклеточном раке не имел достоверных различий с показателями в соответствующей условно интактной ткани по линии резекции. Значения же некоторых факторов роста в перифокальной зоне аденокарциномы занимали промежуточное положение между показателями в соответствующей условно интактной и злокачественной ткани. Это свидетельствовало о том, что метаболизм ткани перифокальной зоны при этом типе злокачественной опухоли пищевода был нарушен, и она представляла собой «опухолевое поле» с частичной потерей тканевого контроля, изменением тканевой системы регуляции, способствующей злокачественному росту, как фактору нарушения механизма устойчивости гомеостатических систем (4). Термин «опухолевое поле» обозначен как «тканевой регион, пространственно окружающий злокачественную опухоль, не имеющий морфологических признаков

злокачественной перестройки, но обладающий определенными биохимическими признаками, присущими и самой опухоли». Считается, что изменения показателей метаболизма в этом регионе происходят значительно быстрее и интенсивнее, чем в отдаленных от опухоли частях организма. Этому способствует комплекс неслучайных обстоятельств и, прежде всего, опухолевый ангиогенез, как необходимое условие для поддержания в периферийных клетках опухоли прооксидантного состояния, ее развития вдоль заранее подготовленных сосудистых путей, метастазирования отдельных опухолевых клеток. Опухолевое поле отражает природу самих клеток, формирующих это поле и ставших таковыми под воздействием продуктов новообразования. Более того, опухолевое поле, как своеобразное предопухолевое состояние с несомненными биохимическими признаками неопластического процесса, предлагается именовать онкогенным, вызывающим опухоли.

И наконец, при сравнении изученных показателей в условно интактной ткани при плоскоклеточном раке и аденокарциноме обращает внимание низкий уровень некоторых факторов роста и их рецепторов при аденокарциноме относительно значений при плоскоклеточном раке. Это касается содержания VEGF-A, VEGF-R1, EGF, IFR-2 и TGF- β 1. Вероятно, это связано с тем, что аденокарцинома, как правило, развивается на фоне так называемого пищевода Баррета – одного из серьёзных осложнений гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, при которой в эпителиальной выстилке слизистой оболочки пищевода обнаруживается метаплазия, т.е. вместо плоского многослойного эпителия появляется нехарактерный цилиндрический эпителий (11). В этом эпителии, судя по полученным результатам, снижена активность ангиогенеза, нарушены регуляция обменных и восстановительных процессов, стабилизация внутриклеточной матрицы из коллагена, рост клеток эпителия, эндотелия и фибробластов, дифференцировка и апоптоз, о чем свидетельствует низкое содержание EGF и TGF- β 1 [6].

Анализируя в целом полученные результаты, необходимо отметить, что плоскоклеточный рак и аденокарцинома имеют не только различную этиологию, но и различный уровень ростовых факторов в ткани, на которой развиваются.

Выводы:

1. Ткань плоскоклеточного рака имеет более высокий, чем в аденокарциноме, уровень EGF и TGF- β 1, тогда как в ткани аденокарциномы выше содержание VEGF-C и IFR-1.
2. Перифокальная зона плоскоклеточного рака не имеет достоверных отличий от показателей ростовых факторов в соответствующей условно интактной ткани, тогда как в аденокарциноме уровень большинства изученных факторов (кроме EGF и TGF- β 1) занимает промежуточное положение между показателями в ткани опухоли и условно интактной ткани.
3. В условно интактной ткани при плоскоклеточном раке большинство изученных

показателей (кроме VEGF-C и IFR-1) превосходят таковые в соответствующей ткани при аденокарциноме.

Список литературы

1. Давыдов М. И., Аксель Е. М. (ред.). Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. – М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. – 226 с.
2. Деньгина Н. В. Современные терапевтические возможности при раке пищевода // Практическая онкология. – 2012; 13(4): 277-288.
3. Имянитов Е. Н., Хансон К. П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. – СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2007. – 211 с.
4. Черезов А. Е. Общая теория рака: тканевый подход. – Изд. МГУ, 1997. – 252 с.
5. Alitalo K., Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002; (1): 219-227.
6. Annes J. P., Munger J. S., Rifkin D. B. Making sense of latent TGF-beta activation. *J. Cell. Sci*. 2003; 116: 217-224.
7. Duffy M. J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *J. Cancer Treatment Reviews*. 2011; (2): 151-159.
8. Ferrara N., Gerber H.P., Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9 (6): 669-676.
9. Firth S. M., Baxter R. C. Cellular action of the insuline-like growth factor binding proteins. *Endocrine reviews*. 2002; 23(6): 824-854.
10. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med*. 2003; 9(6): 685-693.
11. Kenneth K., Wang, M. D, Richard E. S. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Updated Guidelines 2008 for the diagnosis, Surveillance and Therapy of Barrett's Esophagus. *Am J. Gastroenterol*. 2008; 103: 788-797.
12. Kit O. I., Frantsiyants E. M., Nikipelova E. A., Komarova E. F., Kozlova L. S., Tavaryan I. S. et al. Changes in markers of proliferation, neoangiogenesis and plasminogen activation system in rectal cancer tissue. *Eksp. Klin. Gastroenterol*. 2015; (2): 40-45. Russian.