

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГОРМОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕОВАСКУЛЯЦИИ ПРИ РАЗНЫХ ВАРИАНТАХ РОСТА ОПУХОЛЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Франциянц Е.М., Розенко Л.Я., Спиридонова Д.А., Шейко Е.А.

ФБГУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: RNION@list.ru

Практически не изучена взаимосвязь половых гормонов и факторов ангиогенеза при различных вариантах опухолевого процесса в шейке матки. Целью явилось изучение степени корреляционной связи между показателями гормонального статуса и показателями факторов роста в тканях рака шейки матки, при различных вариантах роста опухоли РШМ (рака шейки матки). В тканях злокачественных опухолей рака шейки матки, взятых от 32 больных (эндофитной и экзофитной формы роста) методом ИФА определяли уровень E1, E2, E3 и их метаболитов 2ОНЕ1 и 16 α -ОНЕ1, P4, VEGA, эпидермальный фактор роста. При узловом варианте роста РШМ (экзофитный рост) в опухолевом очаге происходит стимуляция неоваскуляризации в большей степени, чем при диффузном (эндофитном) варианте роста, о чем свидетельствуют более высокие значения VEGF. Были выявлены положительные корреляции между VEGF и уровнем эстрадиола, эстрона; отрицательные корреляции между значениями 16 α -ОНЕ1 и EGF. Именно эстрадиол является более мощным регулятором неоваскуляризации, чем прогестерон. При узловом варианте роста опухоли коэффициенты корреляции между эстрадиолом и ведущим фактором неоваскуляризации VEGF выше, чем при диффузном росте.

Ключевые слова: половые гормоны, ростовые факторы ангиогенеза, экзофитный и эндофитный вариант роста РШМ.

POSSIBLE MECHANISMS OF HORMONE-INDUCED NEOVASCULATION IN DIFFERENT VARIANTS OF GROWTH OF CERVICAL TUMORS

Frantsiyants E.M., Rozenko L.Y., Spiridonova D.A., Sheiko E.A.

FSBI "NMRC of Oncology", Rostov-on-Don, e-mail: RNION@list.ru

The relationship between sex steroids and angiogenesis factors has not been practically studied in various variants of the tumor process in the cervix. The aim was to study the indicators of hormonal status, growth factors and their relationship in the tissues of cervical cancer, with different variants of the growth of the neoplasm. In the tissues of malignant tumors of cervical cancer taken from 32 patients (endophytic and exophytic forms of growth), the level of E1, E2, E3 and their metabolites 2ONE1 and 16 α -ONE1, P4, VEGA, EGF was determined by ELISA. In the exophytic variant of growth in the tumor focus, the activation of neoangiogenesis is most pronounced, while in the endophytic variant of growth, moderate stimulation of both the angiogenic and lymphangiogenic signaling pathways occurs. There were found positive correlations of VEGF with the level of estradiol, estrone; negative correlations of 16 α -ONE1 with EGF levels. It is estradiol that is a more powerful regulator than progesterone. We have shown that in the exophytic variant of tumor growth, the correlative connections between estradiol and the leading factor of neoangiogenesis VEGF are higher and stronger than in the case of endophytic carcinoma growth.

Keywords: sex hormones, growth factors of angiogenesis, cervical cancer, exophytic and endophytic cervical growth variant.

По данным GLOBOCAN [1], ежегодно в мире диагностируется рак шейки матки (РШМ) более чем у 500 тыс. женщин, при этом в течение первого года болезни смерть наступает у более половины заболевших. Согласно российской статистике, в 2017 г. ежегодный прирост заболеваемости рака шейки матки (РШМ) равнялся в среднем 2,1%, риск заболеть РШМ возрос до 8%. В России смертность от онкологических заболеваний весьма высока, занимает второе место среди причин смерти населения [2]. В 2017 году в России от злокачественных новообразований умерло 290,7 тыс. больных, что в общей структуре

смертности составляет 15,9% [2]. Высокий показатель одногодичной летальности был выявлен у молодых женщин, которые уже имели III-IV стадию заболевания [2].

Этиология рака шейки матки, как и большинства опухолей, неизвестна, патогенез заболевания изучен не до конца, этим объясняется большое количество работ, посвященных изучению этой проблемы. В последнее время для понимания биологической природы опухоли, определения степени ее распространения, прогноза течения заболевания стали активно изучать роль молекулярно-биологических факторов и процессов в опухолях РШМ [3; 4]. В настоящее время возникает настоятельная необходимость углубленного изучения молекулярных механизмов канцерогенеза опухолей РШМ, выявления их биологического потенциала, эндокринно-метаболического статуса тканей опухолей, определения маркеров метаболической активности опухолевых клеток. Рост заболеваемости РШМ как во всем мире, так и в России требует разработки новых путей к прогнозированию исхода заболевания и выбору индивидуальных подходов при определении стратегии противоопухолевого лечения [2]. Эти знания необходимы для разработки новых способов противоопухолевой терапии РШМ и повышения эффективности противоопухолевых воздействий. В этой связи актуальным остается вопрос изучения свойств биологических маркеров, характеризующих процессы роста и метастазирования опухоли.

Ангиогенез в опухоли, регулируемый на уровне микросреды собственной ткани, представляет собой процессы, связанные также с регуляцией условно здоровой ткани, окружающей опухоль. Микроокружение опухоли содержит чрезмерное количество проангиогенных факторов (VEGF, EGF и др.), происходящих как из опухолевых, стромальных и инфильтрирующих иммунных клеток [5]. VEGF является мощным стимулирующим фактором ангиогенеза, проявляющим биологическую активность не только в клетках стромы опухоли, но и во внеклеточном пространстве. В своей работе Potente M., Carmeliet P. [6] показали наличие высокой внеклеточной концентрации VEGF и эстрадиола (E2) в тканях гормонозависимой опухоли по сравнению с окружающей опухоль условно неизменной тканью. Большинство видов рака зависит от экспрессии E2, как было показано Garvin S., Dabrosin C. [7]. Авторы показали, что VEGF и E2 значительно коррелируют в нормальной ткани груди, но авторами не были выявлены корреляции между E2 и VEGF в опухолях. Dabrosin C. [8] в своих исследованиях продемонстрировала значительную корреляцию E2 и внеклеточного VEGF в нормальной ткани молочной железы, тогда как для прогестерона корреляция с VEGF не была выявлена. Отсутствие корреляции было зафиксировано между FGF-2 и E2, между FGF-2 и прогестероном (P4). Было показано [8], что именно эстрадиол является более мощным регулятором уровня свободного VEGF по сравнению с P4. Уровень свободного FGF-2 не зависит от половых стероидов в молочной

железе [8]. Индукция E2 свободного внеклеточного VEGF может быть одним из механизмов, участвующих в канцерогенезе половых стероидзависимых гормонов в молочных железах. Таким образом, вероятно, стероидные гормоны способны влиять на увеличение экспрессии факторов неоплазии. Таким образом, содержание таких VEGF и E2, вне зависимости от состояний окружающей опухоль ткани и репродуктивной функции у женщин, будут локально синтезироваться в ткани опухоли, и их концентрация будет поддерживаться на высоком уровне [7; 8].

Целью работы явилось исследование локального стероидогенеза, факторов неоплазии и их взаимосвязи при эндофитном (Энф) диффузном и экзофитном (Экз) узловым вариантам роста рака.

Материал и методы исследования

В исследование вошли 32 больных РШМ (возрастом от 31 до 51 года), от всех было получено информированное согласие. Женщины находились во второй фазе менструального цикла или были перименопаузального возраста. Все женщины, вошедшие в исследование, имели патогенетические прогностические неблагоприятные репродуктивные и половые факторы для развития злокачественного процесса на шейке матки: ранняя половая жизнь, роды после 27 лет, большое число родов и аборт. У всех, в соответствии с классификацией TNM и FIGO, диагностировали опухоль в стадии процесса T_{1b2-2b}N_xM₀. Диагноз был подтвержден гистологически. Опухоли подразделялись на эндофитную и экзофитную в зависимости от варианта ее роста. Были изучены ткани опухоли РШМ, полученные при оперативном лечении. В качестве сравнения была исследована интактная ткань шейки матки от пациенток, оперированных по поводу миомы матки.

Из полученных после оперативного вмешательства тканей опухолей РШМ готовили 10%-ный гомогенат. Методом ИФА определяли уровень E1, E2, E3 и их метаболитов 2ОНЕ1 и 16α-ОНЕ1, P4, VEGF, EGF при помощи стандартных тест-систем: (E1) (DVC, Канада); (E2), (E3), (P4) («Хема», Россия); 2-ОНЕ1 и 16α-ОНЕ1 (IBL, InternationalGmbH, Германия); (VEGF-A), (EGF) (Biosource, США). Использовали программу Statistica (версия 10). Изучаемые данные проверялись на соответствие нормальному распределению по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения групп больных по количественным признакам, имеющим нормальное распределение, использовались методы параметрической статистики, достоверность результатов оценивали по t-критерию Стьюдента. Корреляцию оценивали по коэффициенту линейной корреляции Пирсона (r), для анализа достоверности корреляции использовали параметрический критерий χ^2 Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

При обследовании женщин была проведена оценка фоновых заболеваний на шейке матки и сопутствующей гинекологической патологии. Были получены следующие результаты: у женщин с энд. опухолью определялись различные деформации и рубцы на шейке матки в 1,5 раза чаще, чем при экз. форме опухоли (66,1% против 44,9%, $p < 0,05$). Исходно ВПЧ-инфицирование имелось у 39,7% и 42,9% больных соответственно с экз. и энд. формами опухолей. По характеристике сопутствующей патологии (сахарный диабет, гипертоническая болезнь, хронические заболевания легких и т.д.) больные с различными формами в целом не отличались. Однако было обнаружено, что больные с диффузной формой роста опухоли в 1,6 раза чаще, чем при узловом характере роста, страдают ожирением – 78,6% против 48,7%.

В таблице представлены результаты других биологических факторов в тканях рака шейки матки, при узловом и диффузном росте опухоли.

Уровень половых гормонов и факторы роста в интактной и опухолевой ткани при экзофитном и эндофитном вариантах роста РШМ ($M \pm m$)

Показатели	Интактная ткань шейки матки	Эндофитный рост РШМ	Экзофитный рост РШМ
E1 (пМ/г тк)	550,0±37,2	249,0±31,2 ¹	250,0±29,0 ¹
E2 (пМ/г тк)	1,8±0,05	0,5±0,04 ¹	0,6±0,1 ¹
E3 (пМ/г тк)	12,1±1,3	3,7±0,4 ¹	3,5±0,4 ¹
Суммарные эстрогены	14,3±1,2	4,6±0,4 ¹	4,2±0,1 ¹
2-OHE1 (нг/г тк)	3,4±0,2	2,4±0,15	2,6±0,3
16α-OHE1 (нг/г тк)	1,1±0,8	1,4±0,2	1,2±0,1
2-OHE1/16α-OHE1	3.0±0,01	1,7±0,01 ¹	2,2±0,09 ¹
P4 (нг/г тк)	77,2±6,2	17,9±1,6 ¹	27,6±2,3 ¹
VEGF (пг/г тк.)	167.0±7,1	1184,3±96,3 ¹	3320.0±217,0 ¹
EGF (пг/г тк.)	83,2±7,1	102,7±8,3	193,0±17,4 ¹

¹ $P \leq 0,05$ по отношению к условно интактной ткани шейки матки.

В ткани злокачественной опухоли шейки матки при обоих вариантах роста содержание суммарных эстрогенов было ниже в 3 раза ($P \leq 0,05$) относительно интактной

ткани шейки матки; уровень E1 в 2 раза ниже контрольных значений ($P \leq 0,05$), уровень E2 при энд. в 3,6 раза и при экз. в 3 раза ниже контрольных значений, $P \leq 0,05$ (таблица).

Статистически значимых отличий по содержанию 2-гидроксиэстрон (2-OHE1) и 16 α -гидроксиэстрон (16 α -OHE1) не было получено. Однако при изучении коэффициентов отношения уровня 2-OHE1 к показателям 16 α -OHE1 были получены достоверные отличия. Коэффициент отношения 2-OHE/16 α -OHE1 в ткани опухоли оказался сниженным при энд. росте на 44% ($p \leq 0,05$), а при экз. росте РШМ был ниже на 26,7% ($p \leq 0,05$).

Полученные нами данные указывают на незначительное содержание P4 в опухолях шейки матки, что квалифицируется нами как прогестероновый дефицит. Так, по отношению к контрольным показателям содержание прогестерона при эндофитном варианте роста было ниже в 4,3 раза, а при экзофитном росте в 2,8 раза ($p \leq 0,05$).

Полученные нами данные не противоречат результатам, описанным в работе Бебнева Т.Н. и др. [9], было отмечено, что дисбаланс в системе метаболизма стероидов в репродуктивных органах женщины играет решающее значение для развития опухолевых процессов в шейке матки [9], особенно важно оценивать сдвиг соотношения между отдельными половыми гормонами и их метаболитами [10]. Было показано, что при раке шейки матки высокий уровень E2 и низкое содержание P4 оказывают негативное влияние на продолжительность сроков жизни [9]. В работе Ling Ding и соавт. показана также негативная роль метаболита эстрогена 16 α -ОН, и особенно его равновесие с 2 α -ОН-эстроном [11]. В своей работе Lopez-Pulido E.I. et al. [12] показали существование отрицательной корреляции между содержанием эндогенного прогестерона и экспрессии опухолевых маркеров при данной патологии. Авторы делают заключение, что обнаружение рецепторов стероидных гормонов в ткани опухоли не оставляет сомнений в том, что гормоны репродуктивной системы у женщин играют значимую роль в развитии процессов, приводящих к раку шейки матки [13]. Прогестерон играет важную роль в активации, приводящей к канцерогенезу [14]. P4 является одним из наиболее существенных регуляторов действия женских половых гормонов [14]. Этот гормон влияет на множество эстрадиол-индуцированных эффектов в матке, чрезмерная экспрессия P4 может приводить к необратимым последствиям в дифференцировке и снижению функциональных возможностей клеток женской репродуктивной системы. P4 способен подавлять рост и пролиферацию клеток [14]. Эффекты прогестерона могут быть обусловлены его способностью контролировать число рецепторов эстрогенов во всех структурах матки, вызывая их понижение [14]. Также отмечен тот факт, что P4 способствует нарушению взаимодействия между женскими половыми гормонами и их рецепторами в цитозоле, увеличивает количество биологических факторов, связывающих рецепторы эстрогенов и тем самым число связанных с хроматином рецепторов [14]. Есть мнение, что

влияние прогестерона на эффекты женских половых гормонов следует рассматривать не в качестве суммарного антиэстроген-эффекта, а как собственное специфическое действие P4, которое во многом противоположно действию эстрогенов [14]. Так, в литературе [14] было показано, что прогестерон не оказывает подавляющего действия на эстрадиол-индуцирующий синтез трансформирующего фактора роста В, который способен тормозить пролиферирующие процессы.

Значения показателей факторов неангиогенеза по отношению к нормальным значениям стали выше: VEGF при энд. варианте роста в 7,1 раза, при экз. варианте роста в 19,9 раза ($p \leq 0,05$); EGF в 2,3 раза только при экз. форме рака ($p \leq 0,05$). При сравнении этих показателей между группами с экз. и энд. формой роста опухоли отчетливо видно увеличение значений VEGF в 2,8 раза ($p \leq 0,05$), а EGF в 1,8 раза, при экз. варианте роста опухоли. Нами было установлено, что для опухолей с одной гистологической структурой, но макроскопически различным характером роста (диффузном - энд. и узловым - экз.) - существование двух различных паттернов количественного содержания ростовых факторов. Высокие показатели значений VEGF в ткани опухоли, вне зависимости от формы ее роста, свидетельствуют об активации процессов роста новых сосудов. Значимое превышение значений VEGF при узловой форме по отношению к диффузной форме роста объясняет особые свойства этого типа опухоли к повышению кровоточивости, и именно этот молекулярный фактор может быть использован в качестве основополагающего клинического признака для определения стратегии дальнейших терапевтических воздействий. Поскольку клетки эндотелия во вновь образованных сосудах опухоли не образуют нормального монослоя, они не могут выполнять обычную барьерную функцию, к тому же большие концентрации VEGF являются мощным фактором повышения проницаемости и обструкции просветов сосудов, что может объяснить аномально высокую проницаемость опухолевой сосудистой сети и обусловить ее склонности к кровотечениям. Наши результаты согласуются с данными литературы [5; 9; 12] о том, что чрезмерная экспрессия фактора VEGF приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки в ткани опухоли, что вызывает дезорганизацию сосудов и усугубляет гипоксию в органе, при этом состоянии происходит увеличение миграции клеток опухоли. Известно стимулирующее влияние гипоксии и белков, ассоциированных с гипоксией, на неангиогенез и васкулогенез в опухолевой ткани. В многочисленных исследованиях была показана прямая корреляция между высоким уровнем гипоксии и агрессивностью опухоли [1; 8].

Одной из функций EGF является изменение метаболической активности в клетке или ткани, которая ускоряет рост ткани. Было обнаружено, что EGF стимулирует рост фибробластов, новых митохондрий, используемых для обработки энергии. По уровню

экспрессии этого фактора можно судить о восприимчивости опухоли к противоопухолевому воздействию. Эпидермальный фактор роста ускоряет рост эпидермальных тканей, стимулирует рост новых сосудов за счет влияния на экспрессию VEGF. Полученные нами результаты согласуются с этими представлениями. EGF оказывает прямое влияние на процессы стимуляции экспрессии VEGF в опухоли.

К специфическим особенностям при узловом росте РШМ можно отнести тот факт, что не было обнаружено отличий по состоянию экспрессии VEGF между опухолью и визуально неизменной тканью шейки матки. При этом рост экспрессии VEGF практически не зависит от экспрессии EGF. Напротив, при диффузной форме роста опухоли экспрессия VEGF выше в самой опухоли, по сравнению с визуально неизменной тканью шейки матки, и была выявлена прямая зависимость от уровня EGF. Так, оказалось, что при росте экз. в очаге опухоли происходит резкая стимуляция образования новых сосудов, в то время как при энд. эти процессы менее активны.

Таким образом, в опухоли наблюдалось статистически значимое снижение концентрации основных показателей гормоногенеза (E1, E2, E3 и P4) и резкое возрастание показателей для факторов неоангиогенеза (VEGF, EGF) (табл. 1).

Данные корреляционного анализа свидетельствовали о среднем уровне корреляции: между экспрессией VEGF и синтезом (E1): при эндофитном росте - $r=56$, $p<0,05$; при экзофитном росте - $r=69$, $p<0,05$. Была выявлена высокая коррелятивная связь между экспрессией VEGF и уровнем (E2): при энд. росте - $r=72$, $p<0,05$; при экз. росте - $r=89$, $p<0,05$. Отрицательная корреляционная связь была определена между содержанием EGF и 16-а-ОНЕ1 (при эндофитном росте $r_1=-63$, при экзофитном росте $r_2=-69$; $p_{1,2}<0,05$). При узловом варианте роста опухоли коррелятивные связи между (E2) и VEGF выше, прочнее и выражены более рельефно, чем при диффузном варианте роста карциномы. У остальных изученных показателей не было обнаружено коррелятивных отношений между собой.

Таким образом, можно прийти к заключению, что у больных РШМ без предоперационной терапии, вне зависимости от формы роста опухоли, эстрадиол является более мощным регулятором уровня VEGF, чем прогестерон, поскольку в этом случае была отмечена более высокая коррелятивная связь. В то же время стероидные гормоны не оказывают выраженного влияния на уровень EGF.

Список сокращений

EGF – эпидермальный фактор роста

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

E1 - эстрон

E2 - эстрадиол

Е3 - эстриол

16 α ОНЕ1 – 16-гидроксиэстрон

2ОНЕ1 – 2-гидроксиэстрон

Список литературы

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers In 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018. P. 1-31.
2. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с.
3. Кайрбаев М.Р., Чингисова Ж.К., Кукубасов Е.К., Шалбаева Р.Ш., Досаханов Ж. Молекулярные маркеры рака шейки и тела матки как прогностические факторы // *Clinical medicine of Kazakhstan*. 2013. № 3. С. 43-46.
4. Hida K., Maishi N., Torii C., Hida Y. Tumor angiogenesis-characteristics of tumor endothelial cells. *Inst. J. Clin. oncol.* 2016. vol. 21. P. 206-221.
5. Hyder S.M. Regulation of tumor angiogenesis by the local environment. *Frontiers in Bioscience*. 2010. Vol. 15. no. 1. P. 195-212.
6. Potente M., Carmeliet P. The link between angiogenesis and endothelial metabolism. *Annu.Rev.Physiol.* 2017. vol. 79. P. 43-66.
7. Garvin S., Dabrosin Ch. In vivo measurement of tumor estradiol and Vascular Endothelial Growth Factor in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2008. no. 8. Article 73.
8. Dabrosin C. Positive correlation between estradiol and vascular endothelial growth factor but not fibroblast growth factor-2 in normal human breast tissue in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. no. 22. P. 8036-8041.
9. Бебнева Т.Н., Муйжнек Е.Л., Роговская С. И., Киселёв В. И., Ашрафян Л. А., Хамошина М. Б. Патогенетическое лечение неопластических процессов шейки матки: новые подходы // *Доктор ру., Гинекология Эндокринология*. 2016. № 3. С. 9-14.
10. Франциянц Е.М., Верескунова М.И., Козлова Л.С., Моисеенко Т.И., Черникова Н.В., Гурнак В.В., Кучкина Л.П., Ежова М.О. Факторы роста и система активации плазминогена в опухолях органов женской репродуктивной системы // *Молекулярная медицина*. 2017. № 2. С. 55-59.

11. Ling Ding, Chunliang Liu, Qin Zhou, Meijuan Feng, Jintao Wang. Association of estradiol and HPV/HPV16 infection with the occurrence of cervical squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* 2019. vol. 17. no. 3. P. 3548-3554.
12. Lopez-Pulido E.I., Muñoz-Valle J.F., Del Toro-Arreola S., Jave-Suárez L.F., Bueno-Topete M.R., Estrada-Chávez C., Pereira-Suárez A.L. High expression of prolactin receptor is associated with cell survival in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2013. vol. 13. no. 1. P. 103.
13. López-Romero R., Garrido-Guerrero E., Rangel-López A., Manuel-Apolinar L., Piña-Sánchez P., Lazos-Ochoa M., Mantilla-Morales A., Bandala C, Salcedo M. The cervical malignant cells display a down regulation of ER- α but retain the ER- β expression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013. vol. 8. no. 6. P. 1594-602.
14. Chung S.H., Lambert P.F. Prevention and treatment of cervical cancer in mice using estrogen receptor antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A.* 2009. vol. 106. no. 46. P. 19467-19472.