

ДИНАМИКА МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА НА ФОНЕ НЕОАДЪЮВАНТНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПРИ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Ким¹, И.В. Высоцкая¹, Н.Е. Кушлинский², В.П. Летягин², Е.С. Герштейн²

¹ММА им. И.М. Сеченова; ²НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

CHANGES IN ANGIOGENESIS MARKERS DURING NEOADJUVANT TREATMENT FOR LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

E.A. Kim¹, I.V. Vysotskaya¹, N.E. Kushlinsky², V.P. Letyagin², E.S. Gershtein²

¹I.M. Sechenov Moscow Medical Academy; ²Research Institute of Clinical Oncology,
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The impact of various neoadjuvant treatment regimens on the level of enzyme immunoassay-determined angiogenic markers of endothelial growth factor and its type 2 receptor in tumor cytosol and serum was assessed in 30 patients with locally advanced breast cancer (BC). The findings suggest the promises for studies of neoangiogenesis factors mainly in tumor tissue for their possible use as prognostic biological markers in patients with BC.

Key words: vascular endothelial growth factor, type 2 vascular endothelial growth factor receptor, angiogenesis, breast cancer, neoadjuvant therapy

Злокачественная опухоль объемом $> 1-2$ мм³ для своего дальнейшего роста нуждается в кислороде и питательных веществах, а следовательно, в собственной системе кровоснабжения [1]. В процессе неоангиогенеза (образование новых кровеносных сосудов из уже существующих) ключевая роль отведена фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), представляющему собой гомодимерный белок с молекулярной массой 46—48 кДа [2, 3]. На поверхности эндотелиальных клеток VEGF взаимодействует со специфическими тирозинкиназными рецепторами VEGFR-1 (flt-1) и VEGFR-2 (flk-1/KDR) [4—6]. Доказано, что именно через связывание с рецептором 2-го типа VEGF осуществляет свои основные ангиогенные эффекты, такие как стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток, увеличение сосудистой проницаемости, подавление апоптоза и противоопухолевого иммунного ответа [7—9].

Интерес к проблеме неоангиогенеза при раке молочной железы (РМЖ) за последние годы возрос многократно, что позволило по-новому взглянуть на взаимосвязь экспрессии ангиогенных факторов в опухолевой ткани с прогнозом заболевания и эффективностью проводимого лечения [10—12]. Кроме того, разработка и внедрение таргетных препаратов с антиангиогенным действием являются приоритетной целью современных онкологических научных исследований [13, 14]. Однако данные по многим вопросам регуляции и прогностического значения VEGF и его рецепторов при местно-распространенном РМЖ противоречивы. Анализ динамических изменений уровней маркеров ангиогенеза, проведенный не только в опухоли, но и в сыворотке крови на фоне тради-

ционной цитотоксической терапии, может стать основой более рационального назначения антиангиогенных препаратов.

Цель исследования — оценка влияния различных схем неоадъювантного лечения на содержание VEGF и VEGFR-2 в цитозоле опухоли и сыворотке крови больных местно-распространенным РМЖ, определение клинической значимости этих показателей и их связи с основными клинико-морфологическими характеристиками РМЖ.

Материалы и методы

Основой настоящей работы послужил анализ 120 исследований, проведенных у 30 пациенток, наблюдавшихся и получавших лечение по поводу первичного местно-распространенного РМЖ в клиниках ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2005—2006 гг. Возраст женщин находился в пределах от 23 до 69 лет, средний возраст составил 48 лет. Из них у 33,3% больных менструальная функция была сохранена, 23,3% — находились в состоянии перименопаузы и 43,3% — в постменопаузе.

У всех пациенток клинический диагноз РМЖ был подтвержден данными морфологического исследования опухоли. Начальный местно-распространенный рак (IIb стадия) был выявлен у 40% пациенток, более поздние стадии (IIIa—IIIc) — в 60% случаев.

Основным гистологическим вариантом РМЖ был инфильтративный протоковый рак — 77% наблюдений, в 10% случаев отмечена дольковая форма опухоли. Инфильтративный протоковый рак с преобладанием внутрим протокового компонента обнаружен у 10% больных. В 1 клиническом случае наблюдалась смешанная форма РМЖ. Раковые эмболы в кровеносных и лимфатических

сосудах как фактор неблагоприятного клинического течения РМЖ выявлены по периферии опухоли у 40% пациенток, у остальных 60% этот признак отсутствовал.

По характеру неоадьювантной терапии больные были разделены на 3 равные группы: 1-я получила 2 курса химиотерапии (ХТ) по схеме FAC (5-фторурацил, доксорубин, циклофосфан), 2-я — лучевую терапию (ЛТ) на область молочной железы и зоны регионарного лимфооттока со средним фракционированием дозы (3 Гр) до суммарной очаговой дозы (СОД) 40–44 Гр по изоэффекту. Пациенткам 3-й группы проведена сочетанная терапия — ХТ + ЛТ.

Через 2,5–3 нед у всех пациенток по клиническим и рентгенологическим данным оценена степень регрессии в процессе проведения предоперационного лечения. У 53,3% больных местнораспространенным РМЖ определялся эффект > 50% на проводимую терапию, в 46,7% случаев — < 50% регрессии. С учетом достигнутых результатов органосохраняющие операции (радикальные резекции) удалось выполнить у 43,3% пациенток, в 56,7% случаев проведена радикальная мастэктомия с сохранением грудных мышц.

Выраженность лечебного патоморфоза оценивали при гистологическом исследовании операционного материала: у 33,3% больных выявлены признаки II, у 30% — III, у 16,7% — IV степени патоморфоза. В 20% наблюдений определены изменения, соответствующие 0–I степени дегенеративных изменений в опухолевой ткани.

Рецепторный статус опухоли установлен у всех больных до и после проведенного лечения. Опухоли, отрицательные по обоим типам рецепторов, до неоадьювантной терапии и после комбинированного лечения составляли 50 и 36,7% наблюдений соответственно. Положительный статус опухоли по 1–2 типам рецепторов до лечения выявлен в 50%, после лечения — в 63,3% случаев.

Гиперэкспрессия Her-2/neu (реакция 3⁺) имела место в опухолях 23,4% больных, в остальных случаях (76,6%) гиперэкспрессии Her-2/neu не обнаружено.

Всем больным определение содержания VEGF и VEGFR-2 проводили дважды в сыворотке крови и цитозолях опухоли, полученной до специфического лечения в результате выполнения трепано- или корбиопсии, а после — из операционного материала.

Содержание маркеров устанавливали с помощью стан-

дартных наборов для выполнения прямого иммуноферментного анализа: Human VEGF ELISA («BioSource International»), Quantikine® Human VEGF Immunoassay — для определения VEGF и Quantikine® Human VEGFR-2 Immunoassay («R&D systems», США) — для VEGFR-2.

Результаты

Оба изучаемых фактора были обнаружены во всех образцах опухоли и сыворотки крови. При этом достоверной взаимосвязи между содержанием VEGF в сыворотке крови и в цитозоле опухолей больных РМЖ не было ($R=0,69$; $p>0,05$). Достоверной корреляционной связи между тканевым уровнем VEGFR-2 и его значениями в крови также не выявлено ($R=0,12$; $p>0,05$).

Значения экспрессии VEGF и VEGFR-2 в первичной опухоли достоверно коррелировали между собой (рис. 1; $R=0,39$; $p<0,05$), в то время как в сыворотке крови такой связи между уровнями исследуемых факторов не наблюдалось. Этот факт прослеживался и в отношении предоперационной терапии: динамика опухолевых уровней VEGF и VEGFR-2 часто была аналогичной.

На уровень VEGF в сыворотке крови достоверно оказывали влияние возраст и менструальный статус больных: у молодых женщин с сохранной менструально-овариальной функцией содержание VEGF было достоверно выше, чем у пациенток старших возрастных групп, находящихся в постменопаузе (табл. 1; $p<0,05$). Однако при оценке цитозольных фракций подобной закономерности не отмечено.

Статус рецепторов эстрогенов не оказывал значимого влияния на тканевую экспрессию VEGF и его рецептора, тогда как в положительных по рецепторам прогестерона опухолях уровень VEGF был существенно выше (379,5 пг/мг белка),

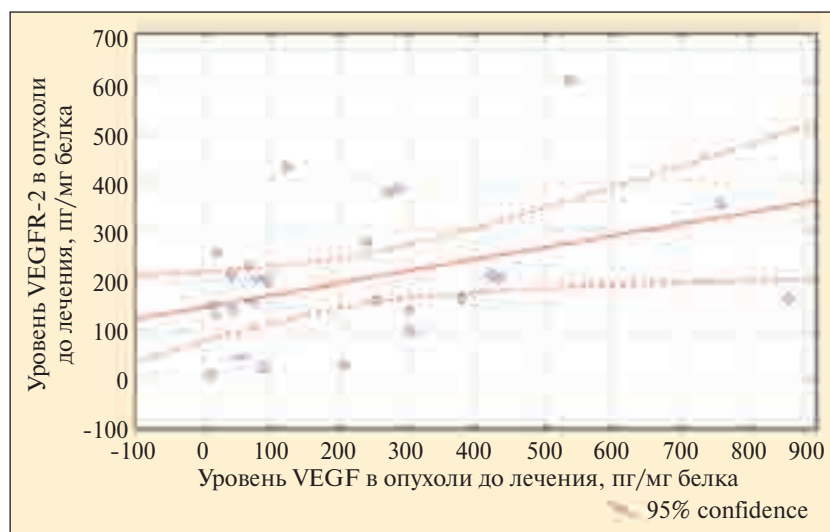


Рис. 1. Взаимосвязь содержания VEGF и VEGFR-2 в цитозоле опухолей больных РМЖ до лечения

Таблица 1. Содержание VEGF и VEGFR-2 в сыворотке крови больных РМЖ с учетом их возраста и менструального статуса

Показатель	Число больных	Медиана (квартили), пг/мл VEGF	Медиана (квартили), пг/мл VEGFR-2
Возраст, годы:			
< 40	5	338 (214—356)	11,2 (8,7—12,4)
40—55	17	134 (86,7—224)	10,5 (9,9—12,1)
> 55	8	165 (90,6—253)	10,2 (9—11,7)
Менструальный статус:			
сохранная менструальная функция	10	281 (197—408)	11,8 (9,1—13,8)
перименопауза	7	149 (93—437)	11 (10—11,8)
постменопауза	13	94,5 (75,4—135)	10 (9,7—10,4)

чем в рецепторонегативных (88 пг/мг белка). Данные статистически достоверны ($p < 0,05$).

В ходе исследования содержание VEGF и VEGFR-2 в сыворотке крови установлены следующие закономерности: у больных с положительным по рецепторам эстрогенов РМЖ изучаемые маркеры выше по сравнению с рецепторотрицательными опухолями, хотя значения не достигли статистической значимости. Обратная тенденция наблюдалась относительно рецепторов к прогестерону: показатели свободного VEGF в сыворотке крови были выше в группе больных с рецепторонегативными опухолями.

Анализ взаимосвязи содержания VEGF и VEGFR-2 в ткани РМЖ с такими прогностически неблагоприятными факторами, как гиперэкспрессия Her-2/neu и наличие раковых эмболов в лимфатических и кровеносных сосудах, выявил, что с этими показателями взаимосвязана только экспрессия VEGFR-2 (табл. 2).

Концентрация рецептора оказалась достоверно выше в новообразованиях с наличием раковых эмболов по периферии опухоли ($p < 0,05$) и при гиперэкспрессии белка Her-2/neu ($p < 0,05$). Необходимо отметить также достоверное увеличение уровня растворимого VEGFR-2 в сыворотке крови больных с гиперэкспрессией Her-2/neu в опухоли ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования VEGFR-2 как маркера гиперэкспрессии Her-2/neu в первичной опу-

холи, а следовательно, как дополнительного прогностического фактора у больных РМЖ.

При сравнительном анализе содержания ангиогенных факторов в сыворотке крови на фоне проведения неoadъювантного лечения во всех 3 группах в целом мы наблюдали возрастание уровней VEGF, причем степень и направление этих изменений не зависели от стадии РМЖ и степени лечебного патоморфоза.

Растворимый VEGFR-2 менялся более разнонаправленно, однако четких закономерностей в динамике маркера в каждой конкретной группе нами не обнаружено. Таким образом, изменения сывороточных маркеров не имели определяющего значения и не зависели от вида специфического лечения.

Показатели динамики экспрессии VEGF и VEGFR-2 в опухоли достоверно коррелировали с их исходными значениями. При этом нам удалось определить условные пороговые значения исследуемых показателей в первичной опухоли — 120 пг/мг белка для VEGF и 200 пг/мг белка — для VEGFR-2 (рис. 2).

Содержание VEGF и VEGFR-2 в опухоли больных РМЖ выше указанных значений достоверно снижается после проведения специфического лечения ($p < 0,05$). При значениях ниже пороговых уровней содержание этих маркеров существенно не меняется либо даже возрастает после неoadъювантной терапии, т.е. противоопухолевая терапия оказывает незначительное влияние на активность ангиогенеза в опухолевой ткани, данные статистически достоверны ($p < 0,05$). С учетом полученных данных возможно назначение более адекватной и эффективной схемы неoadъювантной терапии больных местно-распространенным РМЖ, включающей антиангиогенные препараты.

При оценке динамики содержания VEGF и VEGFR-2 в сыворотке крови и в цитозоле опухолей на фоне проведения неoadъювантного лечения в общей группе пациенток не выявлено значимых корреляций полученных изменений с клинической стадией заболевания, размером первичной опухоли, степенью злокачественности.

Однако нам удалось определить важную зависимость тканевой экспрессии и маркеров VEGF и VEGFR-2 от эффекта проведенной терапии. Так, бо-

Таблица 2. Содержание VEGFR-2 в опухоли больных РМЖ в зависимости от статуса Her-2/neu и наличия раковых эмболов

Показатель	Число больных	Медиана VEGFR-2, пг/мг белка	Квартили VEGFR-2
Статус Her-2/neu:			
0—1 ⁺	19	165,2	145,9—208,9
3 ⁺	7	204,3	36,4—327,7
Раковые эмболы:			
нет	18	165,2	136,6—208
есть	12	183,6	132,0—258,3

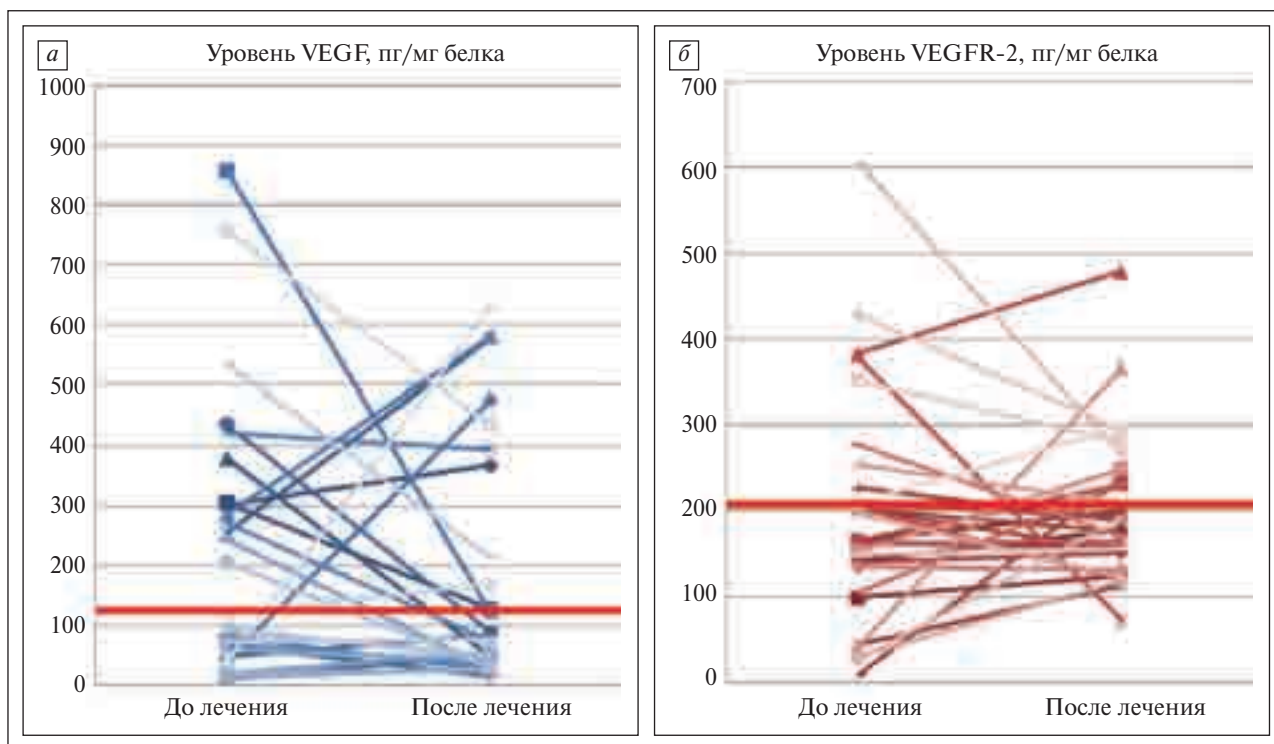


Рис. 2. Сравнение уровней VEGF (а) и VEGFR-2 (б) в цитозоле опухоли больных РМЖ до и после проведения неoadъювантной терапии

лее выраженные изменения в опухолевых клетках (IV степень лечебного патоморфоза) достоверно коррелировали с низкими значениями VEGF и VEGFR-2 в остаточной опухоли (табл. 3, $p < 0,05$).

При этом динамика показателей в сыворотке крови не зависела от выраженности посттерапевтических изменений в опухоли, т.е. большей целесообразностью обладает определение экспрессии маркеров ангиогенеза в опухоли, а не в крови больных РМЖ.

На следующем этапе выполнен анализ зависимости экспрессии изучаемых ангиогенных факторов в ткани опухоли от вида проводимого предоперационного лечения: ХТ, ЛТ или ХТ + ЛТ (рис. 3).

Так, в опухолях пациенток, получавших лекарственное лечение, только в 30% случаев содержание VEGF снизилось. У 70% больных наблюдалось возрастание исследуемого показателя. Аналогичные данные получены при исследовании динамики экспрессии VEGFR-2 в этой группе (см. рис. 3а).

При этом увеличение уровней VEGF и VEGFR-2 наблюдали в опухолях больных преимущественно со IIb стадией РМЖ, а снижение либо возрастание их в незначительных пределах отмечено у больных более поздними стадиями заболевания (IIIb—IIIc).

Необходимо отметить важную тенденцию: увеличение как самого фактора, так и его рецептора происходило в цитозолях опухоли со слабо выраженными признаками лечебного патоморфоза (0—II степень). Снижение показателей коррелировало с лечебным патоморфозом III—IV степени в остаточной опухоли.

Проведение ЛТ в монорежиме не оказывало значимого влияния на процессы неоангиогенеза: показатели исследуемых факторов менялись как в сторону увеличения (50%), так и в сторону уменьшения (50%). С другой стороны, отмечено, что при исходно высоком уровне VEGF (>120 пг/мг белка) выраженность лечебного патоморфоза не превышала 0—II степени, следовательно, проведение ЛТ в высокоvascularизированных тканях оказалось малоэффективным при любой стадии РМЖ (см. рис. 3б).

Таблица 3. Содержание VEGF и VEGFR-2 в опухоли больных РМЖ после лечения в зависимости от степени лечебного патоморфоза

Степень лечебного патоморфоза	Число больных	Медиана (квартили)	
		VEGF, пг/мг белка	VEGFR-2, пг/мг белка
0—I	6	367,2 (77,3—436)	203,9 (161,4—268,3)
II	10	123,3 (75—394,9)	154,9 (131,5—183,0)
III	9	51,5 (42,6—168,9)	249,4 (200,3—295,3)
IV	5	46,5 (27,1—51)	170 (131,6—191,7)

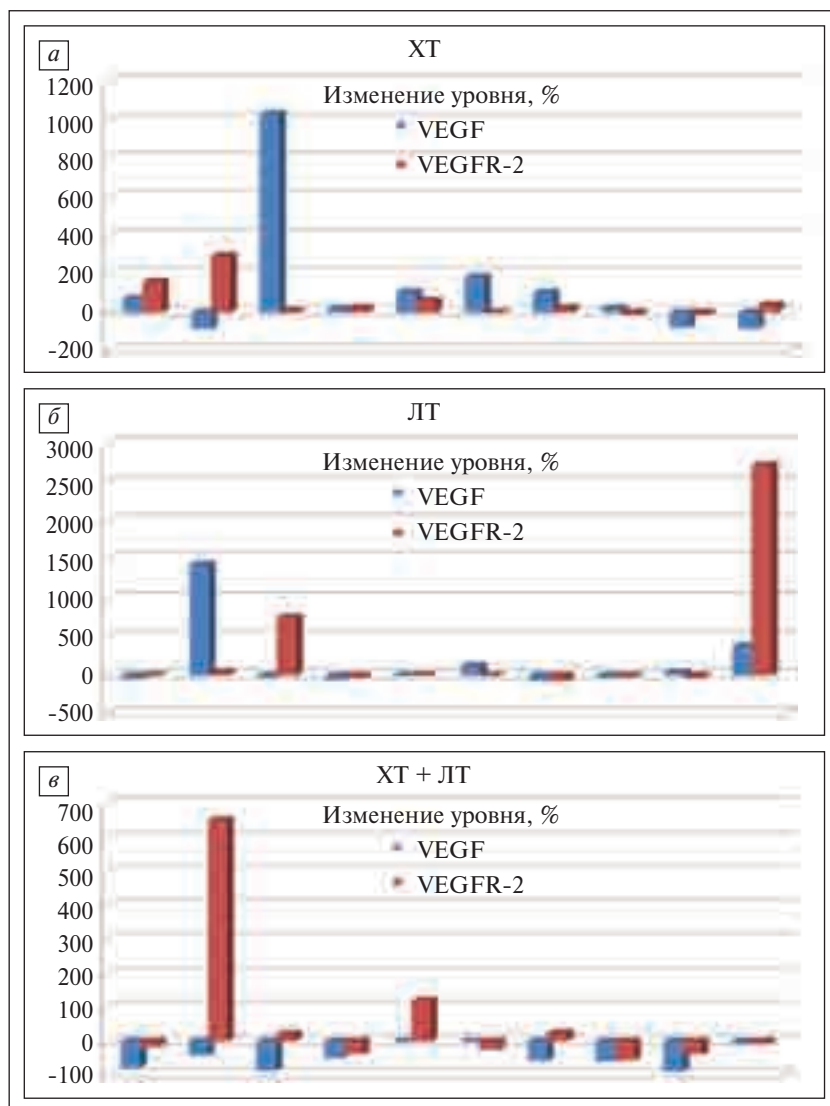


Рис. 3. Изменение содержания VEGF и VEGFR-2 в цитозолях опухолей больных РМЖ, получавших: а — ХТ; б — ЛТ; в — ХТ + ЛТ

В группе больных, получавших ХТ + ЛТ, в исследованных образцах опухоли содержание VEGF равномерно снижалось у всех пациенток (100%).

Динамика экспрессии VEGFR-2 не была такой однозначной: у 60% больных происходило снижение содержания рецептора после проведенного лечения, у 40% — увеличение. Значения VEGFR-2 в цитозолях опухоли возрастали у пациенток с IIb—IIIc стадиями болезни и снижались при IIb—IIIa стадиях. Однако при этом четкой зависимости динамики изменений изучаемых факторов от степени лечебного патоморфоза не выявлено (см. рис. 3, в).

Выводы

Количественное определение ангиогенных факторов именно в опухолевой ткани наиболее адекватно отражает активность неоангиогенеза при местно-распространенном РМЖ. Хотелось бы подчеркнуть перспективность исследования рецепторов VEGF, в частности VEGFR-2, с последующей возможностью использования их в качестве новых биологических маркеров прогноза заболевания и чувствительности больных РМЖ как к общепринятым схемам противоопухолевого лечения, так и к новейшим антиангиогенным препаратам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182—6.
2. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы. *Бюлл экп биол мед* 2002;133:604—12.
3. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669—76.
4. Жукова Л.Г., Жуков Н.В., Личиницер М.Р. Экспрессия рецепторов VEGF FLT-1 и FLK-1 на опухолевых клетках — новый фактор прогноза при местно-распространенном раке молочной железы. *Бюлл экп биол мед* 2003;135:478—81.
5. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000;5:3—10.
6. Shibuya M., Ito N., Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:59—83.
7. Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. и др. Фактор роста эндотелия сосудов, его рецепторы и антиапоптотические белки BCL-2 и АКТ при раке молочной железы. *Маммология* 2006;(3):63—8.
8. Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;(20):4368—80.
9. Speirs V., Atkin S.L. Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer* 1999;80(5—6):898—903.
10. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Биологические маркеры рака молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации. *Маммология* 2005;(1):65—70.
11. Sledge G.W. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol* 2002;29(Suppl 11):104—10.
12. Harmey J.H., Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 2002;24:280—3.
13. Hope S. Rugo Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data. *Oncologist* 2004;9(Suppl 1):43—9.
14. Miller K.D. Issues and challenges for antiangiogenic therapies. *Breast Cancer Res* 2002;75:45—50.