КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ VEGFR-2 В ОПУХОЛЯХ И СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Ким[1], А.М. Платова[2], И.В. Высоцкая[1], Е.С. Герштейн[2], В.П. Летягин[2], Н.Е. Кушлинский[2], Е.Е. Миронова[2]

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

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE VEGFR-2 IN THE TUMORS AND BLOOD SERA OF THE BREAST CANCER PATIENTS

E.A. Kim[1], A.M. Platova[2], I.V. Visotzkaya[1], E.S. Gershteyn[2], V.P. Letyagin[2], N.E. Kushlinskiy[2], E.E. Mironova[2]

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

The analysis of the changes of the content of the angiogenic factor VEGFR-2 in the cytosol of the tumor and blood sera of the 30 breast cancer patients determined by immunoenzyme method during neoadjuvant therapy is given. Likewise the correlation of this index with the main clinicomorphological characteristics of the disease is assessed. The obtained results suggest on the possibility of the use of VEGFR-2 as the one of the diagnostic markers of the breast cancer. The index dynamics didn't depend on the given therapy type but nonetheless the correlation of the VEGFR-2 content in the residual tumor after preoperative therapy with the grade of the treatment pathomorphosis is determined.

Патологический ангиогенез является неотъемлемой частью опухолевого процесса, так как обеспечивает растущую опухоль кислородом и питательными веществами [1, 2]. Основным регулятором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов VEGF, обладающий специфическим митогенным действием в отношении эндотелия сосудов [3, 4]. В большинстве научных публикаций, посвященных неоангиогенезу при раке молочной железы (РМЖ), определено неблагоприятное прогностическое значение гиперэкспрессии VEGF в опухоли [5—8], а также как фактора, предсказывающего вероятную резистентность к традиционным видам лекарственного и лучевого лечения [9].

Свои ангиогенные эффекты VEGF реализует через специфические тирозинкиназные рецепторы, расположенные на поверхности эндотелиальных клеток, — VEGFR-1 (flt-1) и VEGFR-2 (flk-1/KDR) [10—12]. Установлено, что на эндотелиальных клетках преимущественно экспрессируется рецептор VEGFR-2 и, по-видимому, VEGF осуществляет свои биологические эффекты через связывание именно с этим рецептором [13, 14].

По данным литературы, исследований, посвященных оценке клинического значения рецепторов VEGF, экспрессия которых обнаруживается в опухолевой ткани, немного, а результатов о соотношении уровня растворимых VEGFR-1 и VEGFR-2 в сыворотке крови с клинико-морфологическими особенностями РМЖ практически не представлено. Однако перспективность изучения этого направления несомненна. Так, показано, что уровни VEGF, рецепторов VEGFR-1, VEGFR-2 и антиапоптозного белка Bc1-2 были достоверно выше в ткани РМЖ по сравнению с окружающими гистологически неизмененными тканями. При этом экспрессия VEGF и VEGFR-2 существенно увеличивалась в отрицательных по рецепторам прогестерона опухолях [15].

В другой работе авторы выявили, что у пациентов с положительным рецепторным статусом и низкой экспрессией VEGFR-2 в опухоли адъювантная гормонотерапия тамоксифеном достоверно увеличивала продолжительность безрецидивной выживаемости, и наоборот, лечение тамоксифеном не имело длительного эффекта у больных пременопаузального возраста с высоким уровнем VEGFR-2 в опухоли [16].

Рецепторы VEGF (в частности, VEGFR-2) могут быть перспективной мишенью для современной таргетной терапии, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения экспрессии этих факторов у больных РМЖ [1, 10].

Цель нашего исследования — определить возможную взаимосвязь содержания VEGFR-2 в опухоли и сыворотке крови больных РМЖ с основными клинико-морфологическими критериями заболевания, а также проанализировать изменения показателей VEGFR-2 на фоне неоадъювантной терапии.

Материалы и методы

В исследование включены 30 больных местно-распространенным РМЖ в возрасте от 23 до 69 лет (медиана — 49,5 года), проходивших обследование и лечение в клиниках ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2005—2006 гг. Менструальная функция была сохранена у 10 (33,3%) женщин, 7 (23,3%) пациенток находились в состоянии перименопаузы и у 13 (43,3%) была постменопауза. Распределение больных в зависимости от стадии заболевания (Классификация злокачественных опухолей по системе TNM, Методические рекомендации 2002 г., 6-е изд.) представлено на рис. 1.

В большинстве гистологических препаратов — 23 (76,7%) наблюдения — выявлен инфильтративный протоковый рак (ПИР), в 3 (10%) образцах — инфильтративный дольковый рак (ДИР). ПИР с преобладанием внутрипротокового компонента обнаружен у 3 (10%) больных и у 1 пациентки выявлена смешанная форма РМЖ. Всем пациенткам проводилась неоадъювантная терапия: в 1-й группе 10 больных получили 2 курса предоперационной полихимиотерапии по схеме FAC, во 2-ю группу вошли 10 больных, которым проводилась сочетанная химиолучевая терапия (химиотерапия по схеме FAC+лучевая терапия РОД 3 Гр, СОД 28—40 изоГр), остальные 10 пациенток, составившие 3-ю группу, получили только лучевую терапию на область молочной железы и зоны регионарного метастазирования средними фракциями РОД 3 Гр × 10—11 фракций до СОД 28—40 Гр по изоэффекту. В зависимости от достигнутого эффекта выполнены оперативные вмешательства в объеме: радикальной резекции — у 13 (43,3%) больных местнораспространенным РМЖ, радикальной мастэктомии с сохранением грудных мышц — у 17 (56,7%) пациенток. По данным гистологического исследования, в операционном материале чаще всего обнаруживались признаки лечебного патоморфоза II степени — 10 (33,3%) пациенток, III степени — 9 (30%) больных, IV степени — 5 (16,7%). В 6 (20%) наблюдениях определены изменения, соответствующие 0—I степени патоморфоза. Оценены также основные клинико-морфологические факторы прогноза РМЖ: размер опухолевого узла, степень злокачественности, количество пораженных регионарных лимфатических узлов, статус рецепторов к эстрогенам и прогестерону в опухоли, экспрессия Her-2, наличие раковых эмболов в лимфатических и кровеносных сосудах по периферии опухоли.

До начала неоадъювантного лечения всем больным проводилось определение уровня VEGFR-2 в сыворотках крови и лизатах опухоли, полученной в результате трепанобиопсии. Динамика содержания рецептора оценена в опухоли в результате исследования операционного материала, в сыворотке крови больных — через 3—6 нед после хирургического лечения. Содержание VEGFR-2 в цитозолях и сыворотке крови определяли с помощью набора «Quantikine® Human VEGFR2 Immunoassay» (R&D systems, США) для прямого иммуноферментного анализа.

Достоверность отличия средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Корреляционные зависимости определяли с помощью теста корреляции рангов Спирмана. При сравнении и анализе взаимосвязи показателей использовали непараметрические тесты: U-критерий Манна — Уитни, медианный тест, критерий Вальда — Вольфовица. Во всех случаях различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проведена на персональном компьютере с помощью программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc).

Результаты исследования

Мы обнаружили VEGFR-2 во всех полученных образцах опухоли и сыворотках крови до начала специфического лечения. Содержание VEGFR-2 в крови составляло от 7,9 до 17,8 нг/мг (медиана — 10,5 нг/мг). В образцах опухоли значения VEGFR-2 находились в пределах от 8,4 до 606,4 пг/мг белка (медиана — 165,2 пг/мг белка). Оценивая соотношение рецептора в двух исследуемых субстратах, мы не выявили достоверной корреляционной связи между содержанием VEGFR-2 в ткани и его сывороточной концентрацией (R=0,12, p=0,57).

Анализ полученных данных до начала специфического лечения в зависимости от основных клинико-морфологических характеристик РМЖ представлен в табл. 1. Значимых взаимосвязей содержания рецептора VEGFR-2 в сыворотке крови с возрастом, состоянием менструальной функции пациенток, распространенностью процесса и рецепторным статусом опухоли не обнаружено. Тем не менее отмечено достоверное увеличение медианных значений растворимого VEGFR-2 у больных с гиперэкспрессией Her-2 (p=0,04).

Оценка опухолевой экспрессии изучаемого рецептора выявила более интересные наблюдения. Содержание VEGFR-2 в опухоли было ниже у женщин в постменопаузе и у пациенток старше 55 лет по сравнению с молодыми больными с сохранной менструально-овариальной функцией. Однако эти различия не были достоверны.

Также нами не найдено значимой зависимости содержания VEGFR-2 в опухоли от ее размера, гистологического типа и степени злокачественности, но выделена тенденция положительной зависимости концентрации VEGFR-2 от стадии заболевания: медианные значения показателя превалировали в цитозолях РМЖ у больных с IIIb стадией по сравнению с группой больных со IIa стадией. Возможно, это свидетельствует о необходимости в исследуемом факторе на стадии максимального местного роста РМЖ и постепенной утрате его значения в первичной опухоли на стадии метастазирования.

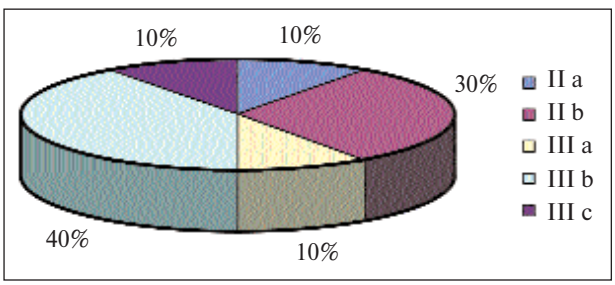

Рис. 1. *Распределение больных по стадиям РМЖ*

Рецепторный статус опухоли не оказывал значимого влияния на тканевую экспрессию VEGFR-2. Проведенный анализ взаимосвязи содержания рецептора в ткани РМЖ с такими прогностически неблагоприятными факторами, как гиперэкспрессия Her-2 и наличие раковых эмболов в лимфатических и кровеносных сосудах по периферии опухоли, показал, что экспрессия VEGFR-2 имеет определенное клиническое значение: его цитозольная концентрация достоверно выше в опухолях с наличием раковых эмболов по периферии (p=0,01) и гиперэкспрессией белка Her-2 (p=0,03).

На следующем этапе нашего исследования мы оценили влияние предоперационной терапии на содержание VEGFR-2 в сыворотке крови и опухоли.

В сыворотке крови уровень VEGFR-2 уменьшился у 12 больных на 0,1—4,8 нг/мл (медиана — 1,4 нг/мл), из них 50% наблюдений сделано в группе пациенток, получавших только лучевую терапию. Увеличение показателей VEGFR-2 чаще всего наблюдали в группе больных, которым проведена химиолучевая терапия — 38% случаев, диапазон значений — от 1,0 до 42,5%, медиана составила 8,7% (рис. 2).

Определена положительная корреляция между исходными значениями VEGFR-2 в сыворотке крови и его показателями после проведения специфического лечения (R=0,45, p=0,024).

Клиническая стадия заболевания, экспрессия Her-2, степень лечебного патоморфоза в остаточной опухоли не оказывали значимого влияния на динамику содержания растворимого VEGFR-2.

В результате анализа изменений VEGFR-2 в сыворотке крови в зависимости от рецепторного статуса опухоли получены следующие данные: концентрация этого показателя после неоадъювантной терапии, как правило, увеличивалась у больных с положительным по рецепторам прогестерона РМЖ (медиана — 1,5 нг/мл), в то время как в группе рецепторотрицательных опухолей VEGFR-2 чаще снижался после лечения (медиана — 0,4 нг/мл, p=0,018). Анализируя влияние эстрогенового статуса опухоли, можно сделать вывод, что медианные показатели изменений содержания сывороточного VEGFR-2 оказались практически одинаковыми в обеих группах.

Наличие раковых эмболов в просветах лимфатических и кровеносных сосудов приводило к возрастанию уровня VEGFR-2 в сыворотке крови (медиана — 1,4 нг/мг), в то время как

Таблица **1**. *Содержание VEGFR-2 в цитозолях опухолей и сыворотке крови больных РМЖ в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания*

Характеристика	число больных, *n*	VEGFR-2 в сыворотке крови, нг/мл	VEGFR-2 в опухоли, пг/мг белка
Возраст			
моложе 40 лет	5	11,2 (8,7—12,4)	161 (141—208,2)
40—55 лет	17	10,5 (9,9—12,1)	202,9 (142—277,8)
старше 55 лет	8	10,2 (9,0 — 11,7)	156,4 (103,4—165)
p		Н/д	Н/д
Менопаузный статус			
сохр. менстр. функция	10	11,8 (9,1—13,8)	208,9 (146,7—247)
перименопауза	7	11,0 (10—11,8)	165,1 (104,8—202,9)
менопауза	13	10,0 (9,7—10,4)	153,1 (89,2—240,3)
p		Н/д	Н/д
Стадия			
IIa	3	11,0 (10,6—11,3)	163 (156,4—183,6)
IIb	9	10,5 (9,1—12,8)	161 (141—202,9)
IIIa	3	10,3 (9,8—10,4)	209,7 (203—294,4)
IIIb	12	11,5 (9,0—12,2)	184 (103,4—233,5)
IIIc	3	10,7 (10,4—11,4)	153 (89,3—379,8)
p		Н/д	Н/д
Размер опухоли			
T2	15	10,3 (9,3—11,7)	165,2 (145,9—207)
T4	15	11,4 (9,8—12,2)	165,1 (102—240,1)
p		Н/д	Н/д
Метастазы в лимфатич. узлы			
N0	4	11,6 (10,9—11,7)	156,4 (120—173,3)
N1	11	9,4 (8,8—12,1)	161 (92,3—205,6)
N2	12	10,9 (9,9—12,2)	206,3 (157,5—278,3)
N3	3	10,7 (10,4—11,4)	153,1 (89,3—379,8)
p		Н/д	Н/д
Статус Her-2			
0–2+	19	10,3 (9,0—11,5)	165,2(145,9—208,9)
2/3Р3+	7	12,2 (11,1—12,9)	204,3(36,4—327,7)
p	*5*	0,04*	0,03**
Раковые эмболы			
есть	12	10,9 (9,9—12)	183,6 (132 - 258,3)
нет	18	10,5 (9,0—11,7)	165,2 (136,6 - 208)
p		—	0,01**
Статус РЭ			
+	13	11,7 (9,9—12,8)	163 (43,7—204,3)
—	17	10,3 (9,4—11,1)	197 (141—277,8)
p		Н/д	Н/д
Статус РП			
+	9	10,7 (9,3—11,5)	202,9 (150—208,2)
—	21	10,4 (9,5—12,3)	163 (104,8—226,8)
p		Н/д	Н/д

Примечание. *p* — уровень достоверности. Н/д — различия недостоверны.
* Тест Манна — Уитни, ** тест Вальда — Вольфовица.

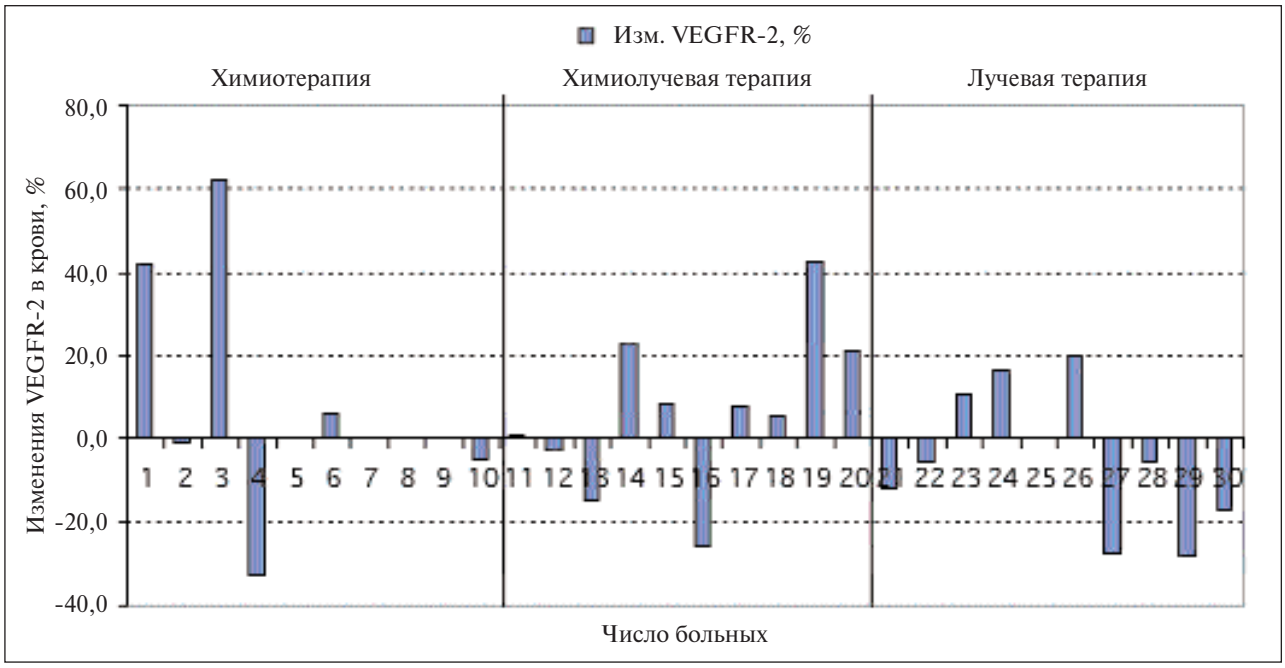

Рис. 2. *Изменение содержания VEGFR-2 в сыворотках крови больных РМЖ в зависимости от вида предоперационного лечения*

в 60% наблюдений отсутствия эмболов исследуемый фактор достоверно снижался после проведения специфической терапии (медиана — 0,5 нг/мл, p=0,02).

Особый интерес в нашей работе был уделен оценке влияния предоперационной терапии на содержание рецептора VEGFR-2 в опухоли, а также сопоставлению полученных данных с эффектом лечения. VEGFR-2 снизился в 14% наблюдений (2—81%, медиана — 23%). У остальных пациентов содержание ангиогенного фактора, напротив, увеличилось, однако эти изменения не были достоверны. Показатели динамики экспрессии VEGFR-2 достоверно положительно коррелировали с его исходными значениями: т.е. чем выше была изначально концентрация VEGFR-2 в опухоли, тем в большей степени она снижалась после неоадъювантной терапии (R=-0,79, p<0,05). Динамика опухолевой экспрессии VEGFR-2 после проведения предоперационного лечения была направлена как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения во всех 3 группах больных, причем степень этих изменений в целом была незначительна (рис. 3).

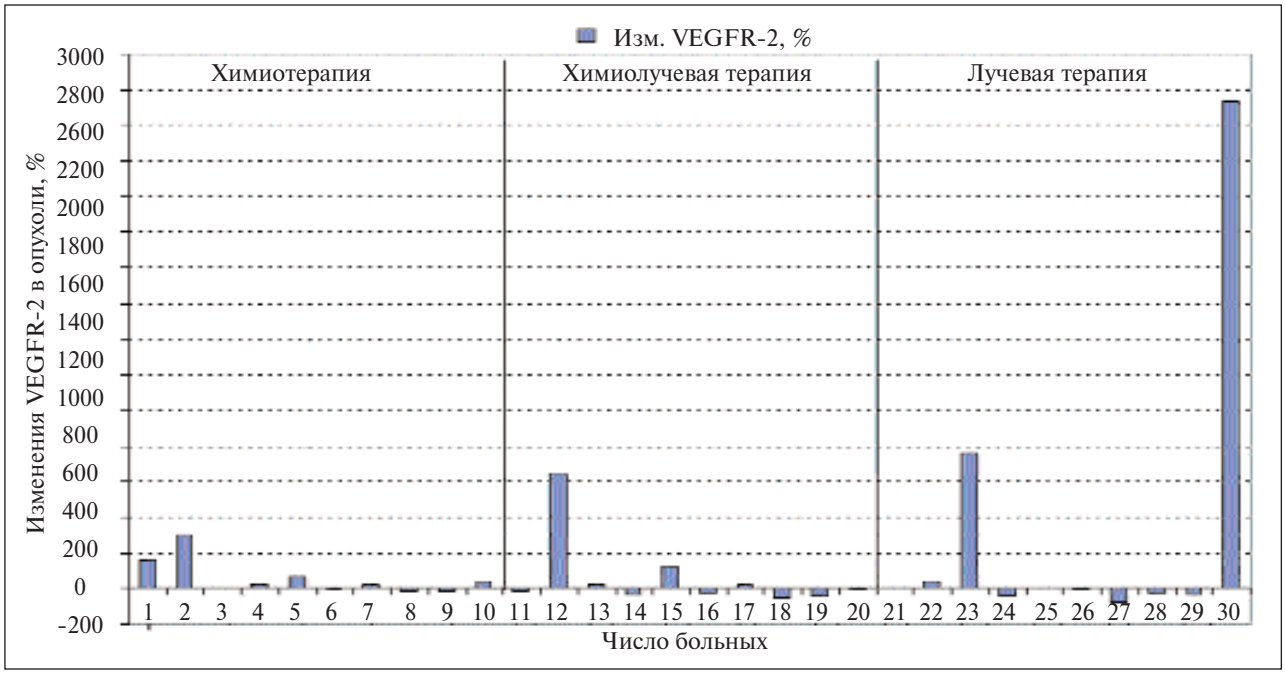

Рис. 3. *Изменение содержания VEGFR-2 в цитозолях опухолей больных РМЖ в зависимости от вида предоперационного лечения*

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

Лечебный патоморфоз, стадия	Число больных, *n*	VEGFR-2, пг/мг	
		M±*m*	медиана квартили
0—I	6	240,6±130,1	203,9* 161,4—268,3
II	10	155,1±44,6	154,9 131,5—183,0
III	9	245,4±73,6	249,4 200,3—295,3
IV	5	165,2±37,7	170,0 131,6—191,7

*p=0,04 (критерий Крускала — Уоллиса).

Возраст больных не влиял на изменение уровней VEGFR-2 в ткани опухоли в процессе неоадъювантной терапии, но определилась достоверная взаимосвязь динамики VEGFR-2 с менструальным статусом: концентрация VEGFR-2 в опухоли оставалась высокой у больных с сохранной менструальной функцией (медиана — 201,9 пг/мг белка) по сравнению с группой пациенток, находящихся в перименопаузе (медиана — 131,6 пг/мг белка, p=0,01).

У больных с множественными метастазами в регионарные лимфоузлы (N3) уровень VEGFR-2 в опухоли оказался достоверно выше после проводимого лечения, чем у больных РМЖ без поражения регионарных лимфоузлов (N0) — p=0,03. В то же время в группе пациентов с опухолями, отрицательными и по рецепторам эстрогенов, и по рецепторам прогестерона, также достоверно чаще происходило снижение уровня VEGFR-2 на фоне терапии по сравнению с рецептороположительными опухолями (p<0,05).

Определена четкая зависимость тканевой экспрессии VEGFR-2 от эффекта проведенной терапии, установленного при гистологическом исследовании операционного материала (табл. 2): чем более выражены изменения (IV степень лечебного патоморфоза), тем меньше был уровень VEGFR-2 в остаточной опухоли (p<0,05).

В целом, наше исследование выявило отсутствие достоверной корреляции между показателями VEGFR-2 в сыворотках крови и цитозолях опухоли. Опухолевая экспрессия VEGFR-2 была взаимосвязана с такими неблагоприятными факторами, как гиперэкспрессия Her-2 и наличие раковых эмболов по периферии опухоли, и, следовательно, обладала прогностической значимостью. Предоперационная терапия влияла на уровни VEGFR-2 в обоих исследуемых субстратах, однако направление и степень изменений не зависели от вида лечения. В то же время определена значимая взаимосвязь концентраций изучаемого ангиогенного фактора в опухолевой ткани с выраженностью лечебного патоморфоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Биологические маркеры рака молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации. Маммология 2005;(1):65—70.
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995;1:27—31.
3. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы. Бюлл эксп биол мед 2002;133(6):604—12.
4. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. EXS 2005;94:209—31.
5. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. Oncologist 2000;5 (Suppl. 1):37—44.
6. Linderholm B.K., Lindh B., Beckman L. et al. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. Clin Breast Cancer 2003;4(5):340—7.
7. Relf M., LeJeune S., Scott P.A. et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. Cancer Res 1997;57(5):963—9.
8. Toi M., Inada K., Suzuki H. et al. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. Breast Cancer Res Treat 1995;36(2):193—204.
9. Foekens J.A., Peters H.A. et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. Cancer Res 2002;61(14):5407—14.
10. 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 эксп биол мед 2003;135(5):478—81.
11. Devries C., Escobedo J.A., Ueno H. et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 1992;255:989—91.
12. 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.
13. 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.
14. Terman B.I., Vermazen M.D., Carrion M.E. et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun 1992;34:1578—86.
15. Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Анурова О.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы первого и второго типа при раке молочной железы. Вопр онкол 2005;51(3):317—21.
16. Ryden L., Jirstrom K., Bendahl P.O. et al. Tumor-specific expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 but not vascular endothelial growth factor or human epidermal growth factor receptor-2 is associated with impaired response to adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer. J Clin Oncol 2005;23(21):4695—704.