

УДК 611.018:576.5:616-006 (575.2) (04)

НЕОАНГИОГЕНЕЗ В КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ АДЕНОМАХ И АДЕНОКАРЦИНОМАХ

Г.А. Хамидуллина, Н.В. Жарков, Е.Н. Серeda

Рассматривается высокий уровень экспрессии белка p53 аденокарциномы толстой кишки с повышенным уровнем ангиогенеза и высоким уровнем экспрессии раково-эмбрионального антигена (РЭА).

Ключевые слова: аденома; аденокарцинома; раково-эмбриональный антиген; неоангиогенез.

Процесс опухолевого неоангиогенеза играет решающую роль в росте опухолей, вызывая увеличение их размеров (до нескольких миллиметров в диаметре) [1, 2]. Начало ангиогенной активности носит название “переключение на ангиогенетический фенотип” и является критическим шагом в прогрессии туморогенеза. Неоваскуляризация является одним из основных признаков, вызывает процесс неопластической прогрессии с последующим метастазированием [3, 4]. Известно, что подсчет плотности микрососудов в опухоли является сильным предсказательным маркером по риску метастазирования рака молочной железы [5, 6].

Экспериментальные исследования *in vitro* показывают, что мутации гена p53 ассоциированы с активацией опухолевой неоваскуляризации через индукцию положительного ангиогенетического фактора [7, 8]. Кейзер с соавт. [9] предположил, что существует путь, по которому мутированный p53 может запускать экспрессию васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF). С другой стороны, мутации p53 приводят к сниженной регуляции отрицательных ангиогенетических факторов.

Мутации в p53 опухолевом гене-супрессоре являются наиболее частыми генетическими альтерациями при раке у человека. Примерно 50 % колоректальных карцином и метастазов в печень (22–70 %) проявляют инактивацию гена p53, являющуюся результатом действия ряда механизмов, включая потерю гетерозиготности и соматических точечных мутаций.

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) вырабатывается в тканях пищеварительного тракта и поджелудочной железы эмбриона и плода. Это

гликопротеин с молекулярной массой 175000–200000 Да. Он вырабатывается в тканях эмбриона. Однако, после рождения ребенка синтез его подавляется, в очень малых количествах он обнаруживается только в некоторых тканях взрослого: кишечной, печеночной, поджелудочной железе. Но при наличии опухолевого процесса концентрация РЭА в крови значительно повышается. При доброкачественных заболеваниях уровень РЭА имеет тенденцию оставаться в нижней части диапазона патологических значений.

При нелеченых злокачественных опухолях уровень РЭА возрастает постоянно, причем в начальной стадии его рост имеет экспоненциальный характер. Уровень РЭА коррелирует со стадией опухоли толстой кишки (классификация по Дьюку – А: 8 %; В: 42 %; С: 56 %; D: 94 %), а предоперационный уровень РЭА также коррелирует с продолжительностью безрецидивного послеоперационного периода и степенью выживаемости.

Цель исследования – анализ *in vivo* роли p53 в опухолевой неоваскуляризации по отношению к предраку, раннему и инфильтративному колоректальному раку. Мы использовали иммунофенотипирование в срезах аденом с дисплазией, первичных ранних и инфильтративных колоректальных раков, а также “переходной” слизистой оболочки кишки рядом с опухолью. Эти результаты коррелировали с подсчетом сосудов в опухоли и уровнем экспрессии раково-эмбрионального антигена.

Материал и методы. Проанализировали микропрепараты архива лаборатории патоморфологии КазНИИ онкологии и радиологии 120 пациентов со спорадическими аденомами, 140

пациентов со спорадическими аденокарциномами. Кроме того, изучали “переходную” слизистую оболочку толстой кишки 120 пациентов, прооперированных по поводу рака толстой кишки (рядом с опухолью). Все образцы были фиксированы в забуференном 10%-ном формалине в течение 12–24 часов. Серийные срезы толщиной 5 мкм наклеивали на силанизированные предметные стекла (DakoCytomation, Denmark) и по одному из микропрепаратов каждого случая окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике, остальные использовали при иммунофенотипировании.

Иммуногистохимия. Иммунофенотипирование образцов ткани проводили по стандартной методике EnVision (DakoCytomation, Denmark). Предварительно срезы тканей депарафинировали в ксилоле и дегидратировали в батарее спиртов до дистиллированной воды. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в течение 30 минут в 0,3%-ной перекиси водорода на метаноле. Затем срезы для раскрытия антигенов помещали в скороварку “Tefal”, где их под давлением на слабом режиме выдерживали в течение четырех минут в цитратном буфере (0,01 М, рН 6,0). Неспецифическое окрашивание блокировали путем инкубации с нормальной бычьей сывороткой в течение 10 минут, после чего на срез наносили моноклональные антитела (monoclonal mouse anti-human carcinoembryonic antigen (CEA), clone П-7, DakoCytomation, Denmark, титр 1:200; anti-human hematopoietic progenitor cell, CD34, class II, clone QBEnd 10, DakoCorporation, USA, RTU; monoclonal mouse anti-human p53 protein, clone DO-7, DAKO A/S, Denmark, титр 1:100) с инкубацией срезов в течение 18 часов при +4 °С. Отрицательный контроль выразился в отсутствии первичных моноклональных антител так же, как и вторичных антител в протоколе проведения иммунофенотипирования.

Методы количественной оценки результатов. Процент опухолевых клеток с чистой окраской был оценен полуколичественно с использованием светового микроскопа (Leica DMLS, Швейцария) при увеличении $\times 200$. В тех случаях, когда p53-положительные ядра опухолевых клеток составляли менее 10 %, иммуногистохимически их рассматривали как отрицательные или низкой экспрессии, а с более чем 10 % положительных ядер клеток рассматривали как p53-положительные [10]. Внутриопухолевые микрососуды выявлялись анти-CD34 моноклональными антителами. Срезы просматривали при

увеличении $\times 400$ и $\times 1000$ для обнаружения зон с наиболее интенсивной неоваскуляризацией, т. е. так называемых “горячих точек”. В каждой опухоли были выбраны две зоны с наиболее высокой плотностью окрашенных сосудов, микрососуды были подсчитаны на увеличении $\times 200$ ($\times 20$ объектив и $\times 10$ окуляр). Подсчитывали по 5 полей в каждой из этих двух “горячих точек”, что давало общую площадь 2,5 мм². Плотность внутриопухолевых микрососудов (ВМС) оценивали как среднее от подсчета сосудов, полученную во всех 10 подсчитываемых полях. Любую положительно окрашенную структуру, которая была явно отделена от соседних микрососудов, оценивали как один подсчитываемый микрососуд. Ни просвет сосудов, ни эритроциты не использовали для оценки структуры в качестве микрососуда. Измерение плотности микрососудов проводили с использованием компьютеризированного полуавтоматического анализа рисунка (Leica IM 1000, version 1.20, release 19, Швейцария) в 16 полях (общая площадь 1 мм²) на двух участках наиболее высокой неоваскуляризации. Измерения проводили с постоянным порогом и коррекцией оттенка по воспроизводимости.

Статистические методы. Корреляция между результатами подсчета сосудов, экспрессией p53 и раково-эмбрионального антигена была оценена с использованием корреляционного теста ряда Пирсона и Спирмена. Связи между статусом p53 и экспрессией CD34 были исследованы тестом хи-квадрат (χ^2), $p < 0,050$ рассматривалось как статистически значимое.

Результаты и обсуждение. Гиперэкспрессия иммуногистохимически определяемого белка p53 была обнаружена в 78,6 % (110/140) первичных аденокарцином, в 90,9 % (100/120) аденом с различной степенью малигнизации и в 50,0 % (60/120) в “переходной” слизистой рядом с опухолью. Средняя плотность ВМС в первичной опухоли варьировала между 17,6 и 70,6 микрососудами в поле зрения $\times 200$ (среднее количество $44,9 \pm 3,7$), в аденомах с различной степенью малигнизации – между 20,6 и 64,4 микрососудами в поле зрения $\times 200$ (среднее количество $39,8 \pm 3,5$), в “переходной” слизистой рядом с опухолью – между 18,4 и 77,6 микрососудами в поле зрения $\times 200$ (среднее количество $33,2 \pm 3,5$) (таблица 1).

Из данных таблицы 1 видно, что отмечается тенденция к повышению плотности ВМС от “переходной” слизистой к аденомам и затем аденокарциномам. Однако статистической значимой разницы между плотностью ВМС в аденокарци-

Таблица 1 – Плотность ВМС в зависимости от экспрессии p53

Образец ткани	Кол-во случаев	Средняя плотность ВМС (интервал)	Плотность ВМС в p53+ тканях	Плотность ВМС в p53- тканях
Аденокарцинома	140	44,9±3,7 (17,6-70,6)	42,9±3,3	33,1±1,7
Аденома	120	39,8±3,5 (20,6-64,4)	42,0±3,5	28,6±3,5
“Переходная” слизистая	120	33,2±3,5 (18,4-77,6)	42,4±3,5	26,6±3,5
Итого	380			

номах, аденомах и “переходной слизистой рядом с опухолью не обнаружено ($p > 0,050$).

Плотность микрососудов в аденокарциномах, экспрессирующих p53 (42,9±3,3), была значительно выше, чем в раках без экспрессии белка p53 (33,1±1,7) ($p < 0,050$). Плотность микрососудов в аденомах с различной степенью малигнизации, экспрессирующих ядерный белок p53 (42,0±3,5) также была несколько выше, чем в аденомах без экспрессии p53 (28,6±3,5), ($p > 0,050$). Плотность микрососудов в “переходной” слизистой рядом с аденокарциномой, экспрессирующей белок p53 (42,4±3,5), была также выше, чем в “переходной” слизистой, не экспрессирующей p53 (26,6±3,5), $p > 0,050$.

Отмечалась прямая корреляционная зависимость между экспрессией p53 и плотностью ВМС ($r = 0,550$, $p < 0,050$), а также с РЭА ($r = 0,480$, $p = 0,004$). Несколько ниже отмечалась корреляция между плотностью ВМС и РЭА (0,36). Данные статистически значимы ($p < 0,050$).

При корреляции экспрессии p53 и плотностью ВМС, а также с РЭА при аденомах с фокусами малигнизации статистически значимых данных не получено, т. е. плотность внутриопухолевых микрососудов не коррелирует с уровнем p53 и степенью злокачественности.

В “переходной” слизистой рядом с опухолью обнаружена статистически достоверная корреляция между уровнем p53 и плотностью ВМС, а также раково-эмбриональным уровнем.

Выводы

Результаты исследований показали увеличенную экспрессию белка p53 в аденокарциномах с повышенным ангиогенезом и высоким уровнем раково-эмбрионального антигена. Показано, что при увеличении уровня экспрессии белка p53 в аденомах с фокусами малигнизации также отмечается усиление неоангиогенеза. Полученные данные подтверждают наблюдения по критической роли p53 в регулировании ангиогенеза опухоли.

В дальнейшем целесообразно продолжить проведение исследований о влиянии различных мутаций в гене p53 на ангиогенетическую активность опухоли и определение механизма изменения экспрессии VEGF или других ангиогенетических факторов.

Литература

1. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? // J. Natl. Cancer Inst. 1990. V. 4–6. P. 82.
2. Folkman J., Watson K., Ingber D., Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia // Nature. 1989. V. 339. P. 58–61.
3. Horak E.R., Leak R., Klenk N., Le Jene S., Smith K. et al. Angiogenesis, assessed by platelet endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival breast carcinoma // Lancet. 1992. V. 340. P. 1120–1124.
4. Gasparini G., Harris A.L. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool // J. Clin. Oncol. 1995. V. 13. P. 765–782.
5. Zhang L., Yu D., Hu M., Xiong S., Lang A., Ellis L.M., Pollock R.E. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression // Cancer res. 2000. P. 3655–3661.
6. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.O. p53 mutations in human cancers // Science. 1991. V. 253. P. 49–53.
7. Goh H.S., Chan C.S., Khine K., Smith D.R. p53 and behaviour of colorectal cancer // Lancet. 1994. V. 344. P. 233–234.
8. Степанова Е.В., Харатишвили Т.К., Личиницер М.Р. и др. Прогностическое значение экспрессии p53, HER2/NEU, Ki-67 и VEGF в хондросаркомах // Архив патологии. 2002. № 6. С. 9–12.

Медицина

9. *Kieser A., Weich H.A., Brandner G., Marme D., Kolch W.* Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression // *Oncogene*. 1994. V. 9. P. 963–969.
10. *Nakayama H., Enzan H., Miyazaki E., Kuroda N., Naruse K., Hiroi M.* Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma // *Journal of Clinical Pathology*. 2000. V. 53. P. 626–629.