

УДК 616-08+615.28+616.351+616-006

В.В. Голотюк

## ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРА НЕОАНГІОГЕНЕЗУ АНГІОПОЕТИНУ-2 У ТКАНИНІ АДЕНОКАРЦИНОМИ ПРЯМОЇ КИШКИ ПІД ВПЛИВОМ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ХЕМОПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

**Резюме.** Метою дослідження було визначити особливості експресії ангіопоетину-2 (Анг-2) у тканині інтактної кишки та раку прямої кишки (РПК) до лікування і після курсу неоад'ювантної хемопроменевої терапії (НХПТ), у тому числі на тлі полірадіомодифікації із застосуванням препаратів тегафуру і L-аргініну гідрохлориду. У 21 хворого на аденокарциному прямої кишки II-III стадій імуногістохімічно визначали експресію Анг-2 у біопсійному та операційному матеріалі до і після НХПТ. Виявлено обернену взаємозалежність ступеня диференціації РПК та рівня лікувального постпроменевого патоморфозу з одного боку, та експресії

Анг-2 у тканині пухлини – з іншого, що свідчить про можливість використання Анг-2 як маркер оцінки злоякісного потенціалу РПК і ефективності застосованої НХПТ. Встановлено, що застосування в комплексі полірадіомодифікації попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну гідрохлориду потенціє безпосередній пошкоджувальний ефект НХПТ на пухлинну паренхіму і додатково пригнічує активність пухлинно-асоційованого неоангіогенезу.

**Ключові слова:** карцинома прямої кишки, неоангіогенез, лікувальний патоморфоз, хемопроменева терапія, оксид азоту.

**Вступ.** Колоректальний рак є одним із найбільш поширених онкозахворювань у світі, поступаючись місцем у структурі причин смертності від злоякісних новоутворень лише раку легень. В умовах України переважна кількість хворих на рак прямої кишки (РПК) підлягають комплексному лікуванню із застосуванням на першому етапі променевої терапії з потенціюванням хіміопрепаратами. На жаль, відповідь новоутворів на неоад'ювантну хемопроменеву терапію (НХПТ) у силу великого числа індивідуальних характеристик пухлинного росту є непередбачуваною і часто неповною.

Відомо, що чутливість РПК до ХПТ з одного боку, як і процеси його росту та метастазування – з іншого, безпосередньо залежать від стабільності та інтенсивності кровопостачання пухлини [2, 6]. Адекватний рівень останнього забезпечується через складний багатоступеневий процес неоангіогенезу, показник інтенсивності якого вважають незалежним прогностичним фактором перебігу колоректального раку [5, 8]. Ангіогенез, який супроводжує прогресію пухлини, залежить від утворення ряду проангіогенних факторів росту пухлинними клітинами та пухлинно-асоційованими макрофагами і включає в себе широкий спектр молекул, які регулюють структуру та викликають зміни у периваскулярному середовищі, стимулюють поділ ендотеліальних клітин, їх міграцію і взаємодію з перичитами [8]. Особливе місце в регуляції пухлинного ангіогенезу відіграють ангіопоетини, зокрема ангіопоетин-2 (Анг-2), надлишкова експресія якого призводить до ініціації активного формування функціонально неповноцінних кровоносних і лімфатичних судин [5, 11].

**Мета дослідження.** Визначити особливості експресії Анг-2 у тканині інтактної кишки та РПК до лікування і після курсу неоад'ювантної хемопроменевої терапії (НХПТ), у тому числі на тлі застосування полірадіомодифікації.

**Матеріал і методи.** Проаналізовано результати обстежень 21 хворого на РПК, які перебували на лікуванні в Івано-Франківському клінічному онкологічному диспансері, з яких у 14 діагностовано II стадію (T<sub>3-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) і в семи – III стадію (T<sub>2-4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>) захворювання. Вік пацієнтів складав 61,2±1,34 року (від 48 до 72 р.), чоловіків було 12 (57 %), жінок – 9 (43 %) У всіх пацієнтів була верифікована аденокарцинома I-III ступенів диференціювання. Діагноз, стадію захворювання і наявність метастазів встановлювали відповідно до вимог доказової медицини (у ході відповідних клінічно-інструментальних обстежень, морфологічно). Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень за участю людей, викладеними в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації.

Залежно від отриманого лікування пацієнти були розподілені на дві групи: I група: 11 осіб, які отримали курс НХПТ на тлі хеморадіомодифікації препаратом фторафур із розрахунку 800 мг на добу за два прийоми per os (зранку і увечері), хворим масою до 70 кг – 1200 мг за три прийоми, хворим масою більше 70 кг – щодня упродовж усього курсу ПТ (20 сеансів фракціями по 2 Грей до сумарної вогнищевої дози 40 Грей на ділянку пухлини) з подальшим хірургічним лікуванням через 4-6 тижнів. Друга група: 10 пацієнтів, яким під час аналогічного курсу НХПТ доведено інфузійно вводили препарат тівортін у дозі 100 мл за 1 год до сеансу променевої терапії. Останній містить L-аргінін – який, будучи субстратом для індукованої синтази оксиду азоту (iNOS), є попередником утворення в пухлинній тканині NO. Тівортін вводили хворим на РПК із супутньою серцево-судинною патологією, ознаками гіпоксії, інтоксикації чи астенизації, що відповідало показам до застосування препарату.

Об'єктом нашого дослідження були фрагменти інтактної кишки на відстані 3 см від краю

пухлини і зразки РПК, отримані під час біопсії до початку лікування хворих і з операційного матеріалу. Для патогістологічного дослідження операційного матеріалу РПК вирізали по одній тканинній пластинці з трьох зон пухлини (периферичної, проміжної та центральної), після чого з них готували парафінові блоки. Виготовляли гістологічні зрізи на трьох рівнях блоку – верхньому, середньому та нижньому; аналізували по дев'ять зрізів у кожного оперованого пацієнта. Серійні парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм забарвлювали гематоксилином і еозином. Мікроскопічне дослідження та фотозйомку виконували на мікроскопі Leica DME (Німеччина) при збільшеннях  $\times 40$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$  та  $\times 400$ . Ступінь лікувального патоморфозу оцінювали за методом Г.О. Лавнікової (1976, 1979).

Імуногістохімічне визначення експресії Анг-2 проводили в зрізах біопсійного та операційного матеріалу РПК товщиною 4 мкм. Як первинні антитіла використовували анти-Анг-2 (Santa Cruz, CA, USA, розведення 1:200), як вторинні – Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Імунопозитивні тканини досліджували з використанням лазерного конфокального скануючого мікроскопа Zeiss LSM 510 з олійно-імерсійним об'єктивом 40X/1.4NA. На кожному зрізі фотографува-

ли п'ять випадково вибраних полів. Аналіз інтенсивності імуносигналу визначали з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.48.

Варіаційно-статистичний аналіз проводили за допомогою прикладної програми Statistica v.6.1, різницю між показниками вважали достовірною при  $p \leq 0,05$ .

#### Результати дослідження та їх обговорення.

В інтактній слизовій оболонці прямої кишки до лікування імуносигнал Анг-2 виявляли як у стінках судин мікроциркуляторного русла, так і в залозистому епітелії. Середній рівень експресії Анг-2 становив  $29,95 \pm 1,56$  ум.од. У судинах власної пластинки слизової оболонки експресія маркера була переважно гомогенною, рідше мала великогранулярний характер, здебільшого однакової інтенсивності по периметру судин. В епітелії крипт експресія Анг-2 була дифузною, помірної з ділянками низької інтенсивності як у люмінальній частині крипт, так і в їх глибині. У цитоплазмі епітеліальних клітин відмічено переважно дифузний розподіл експресії, у базальних відділах епітеліоцитів дещо вищої інтенсивності (рис. 1а).

У більшості випадків РПК рівень імуносигналу Анг-2 у раковій паренхімі суттєво перевищував такий в умовно-здоровій кишці ( $p=0,0074$ )

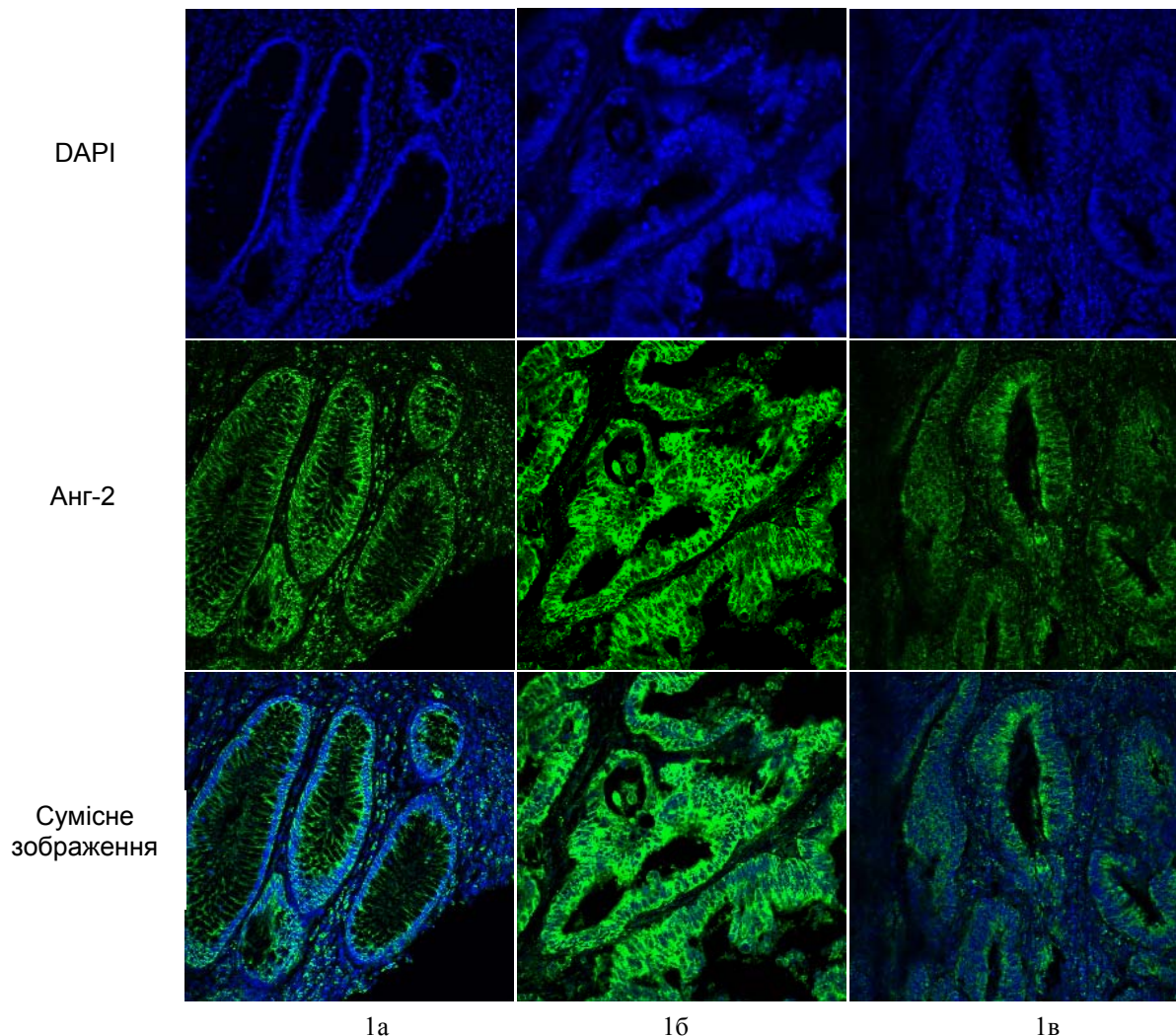


Рис. 1. Експресія Анг-2 в інтактній слизовій оболонці прямої кишки до лікування (1а); в аденокарциномі прямої кишки до- (1б) і після курсу НХПТ (1в) у хворого II групи. 3б.:  $\times 200$

і значно домінував над таким у стінках мікросудин. У середньому сумарна інтенсивність імуносигналу становила  $50,56 \pm 5,22$  ум.од., коливаючись від  $37,79 \pm 1,89$  ум.од. у високодиференційованих РПК до  $58,64 \pm 6,31$  ум.од. ( $p=0,019$ ) у низкодиференційованих. У клітинах ракового епітелію експресія Анг-2 була гомогенною та чітко візуалізувалась як у базальних, так і апікальних відділах клітин, що проявлялося здебільшого рівним контуром внутрішньої поверхні ракової залози (рис. 1б). Отримані дані узгоджуються з результатами досліджень, які описують високий рівень експресії Анг-2 у клітинах пухлинної паренхіми колоректального раку порівняно з ендотелієм судин, тканиною інтактної кишки і аденом [4, 9, 10]. При цьому зазначається, що щільність мікросудинного русла колоректального раку була втричі вищою, ніж в інтактній кишці і вдвічі – ніж у поліпах [10].

Слід зазначити, що в ряді досліджених зразків РПК, здебільшого із високим ступенем диференціювання пухлини, експресія Анг-2 у раковій паренхімі була порівняно нижчою, візуалізувалась переважно в апікальному відділі епітелію та мала нерівномірний внутрішньоклітинний циркулярний розподіл. Це дозволяло чітко прослідкувати дрібногранулярну експресію маркера у стінці судин гемомікроциркуляторного русла, хоча, поряд з цим, просвіти судин чітко не прослідковувались. Коливання середніх показників експресії Анг-2 серед досліджених зразків РПК можна пояснити різною інтенсивністю ендогенної стимуляції синтезу цього білка, оскільки відомо, що біосинтез Анг-2 регулюється на транскрипційному рівні під впливом різноманітних факторів росту і фізіологічних умов, включаючи HIF- $\alpha$ , VEGF, TGF- $\alpha$  та гіпоксію. У подальшому, діючи синергічно з VEGF, Анг-2 різко підвищує чутливість ендотелію до мітогенних сигналів. Він опосередковує дестабілізацію структур зрілих судин із подальшим їх ремоделюванням і утворенням нових кровоносних судин через втрату міжклітинних контактів, міграцію ендотеліальних клітин і ряд наступних взаємодій між ендотелієм, періцитами та екстрацелюлярним матриксом [3, 7]. Будучи практично відсутнім у сформованих судинах, рівень експресії Анг-2 різко зростає в активованому ендотелі під час ангиогенезу [1, 7].

Через 4-6 тижнів після НХПТ експресію маркера в інтактній слизовій визначали як у стінці судин власної пластинки слизової оболонки, так і в епітелії крипт, проте значно меншої інтенсивності, ніж до лікування ( $21,68 \pm 3,29$  ум. од.,  $p=0,042$ ). У зразках РПК хворих обох груп на фоні застосованої терапії інтенсивність експресії Анг-2 також значно зменшилась як у резидуальному раковому епітелії, так і в стінці гемомікросудин, де експресія маркера носила сегментарний та дрібновогнищевий характер. У раковому епітелії відмічали переважання експресії в апікальних відділах клітин, вона була нерівномірною в різних частинах залозоподібних комплексів

(рис. 1в). У полях зору з вираженою десмопластичною реакцією оточуючої стромы експресія Анг-2 у стінці сформованих судин сполучної тканини здебільшого була помірної інтенсивності, циркулярного лінійного і рідше – циркулярного дрібногранулярного характеру. Рівень експресії Анг-2 у РПК на вказаному етапі у пацієнтів обох груп був обернено пропорційним до ступеня лікувального патоморфозу ( $r=-0,79$ ). Зокрема, у випадках максимального IV ступеня патоморфозу експресія Анг-2 була наявною лише в стінці окремих судин та носила слідовий характер у вигляді дрібних гранул низької інтенсивності ( $8,64 \pm 1,31$  ум.од.). Топічні характеристики розподілу Анг-2 у тканині РПК після НХПТ у пацієнтів I і II груп суттєво не відрізнялися, проте середній сумарний рівень маркера в осіб II групи був нижчим як у цілому ( $17,54 \pm 2,37$  ум.од. проти  $20,41 \pm 1,64$  ум.од.), так і в межах підгруп з аналогічним ступенем лікувального патоморфозу згідно з патогістологічними критеріями (на 7-13 %).

### Висновки

1. Виявлена обернена взаємозалежність ступеня диференціації раку прямої кишки та рівня лікувального постпроменевого патоморфозу з одного боку, та експресії Анг-2 у тканині пухлини – з іншого, свідчить про можливість використання Анг-2 як маркера оцінки злоякісного потенціалу раку прямої кишки і ефективності застосованої неоад'ювантної хемопроменевої терапії.

2. Нижчий середній показник експресії Анг-2 після неоад'ювантної хемопроменевої терапії у пацієнтів II групи порівняно з I групою, а також у підгрупах осіб II групи з аналогічними I групі ступенями лікувального патоморфозу вказує на здатність полірадіомодифікації із застосуванням попередника оксиду азоту, окрім потенціювання безпосередньої пошкоджувальної діючої дії неоад'ювантної хемопроменевої терапії на пухлинну паренхіму, пригнічувати активність пухлинно-асоційованого неоангіогенезу.

### Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати вказують на доцільність подальшого поглибленого вивчення молекулярних механізмів неоангіогенезу у хворих на РПК з метою дослідження механізмів лікувальних антибластомних впливів і можливого прогнозування їх ефективності.

### Література

1. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system / H.G. Augustin, G.Y. Koh, G. Thurston, K. Alitalo // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2009. – Vol. 10, № 3. – P. 165-177.
2. Correlation of dynamic contrast-enhanced MRI perfusion parameters with angiogenesis and biologic aggressiveness of rectal cancer: Preliminary results / D.M. Yeo, S.N. Oh, C.K. Jung [et al.] // J. Magn. Reson. Imaging. – 2013. – Vol. 42, № 2. – P. 474-480.
3. Eilken H.M. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis / H.M. Eilken, R.H. Adams // Curr. Opin. Cell Biol. – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 617-625.

4. Expression of angiopoietin-2 is correlated with vascularization and tumor size in human colorectal adenocarcinoma / H.L. Wang, C.S. Deng, J. Lin [et al.] // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 213, № 1. – P. 33-40.
5. Fagiani E. Angiopoietins in angiogenesis / E. Fagiani, G. Christofori // *Cancer Letters.* – 2013. – Vol. 328. – P. 18-26.
6. Perfusion parameters of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with rectal cancer: correlation with microvascular density and vascular endothelial growth factor expression / Y.E. Kim, J.S. Lim, J. Choi [et al.] // *Korean J. Radiol.* – 2013. – Vol. 14, № 6. – P. 878-885.
7. Qin Yu. The dynamic roles of angiopoietins in tumor angiogenesis / Yu Qin // *Future Oncol.* – 2005. – Vol. 1, № 4. – P. 475-484.
8. Ramzan Z. Genotypic characteristics of resistant tumors to pre-operative ionizing radiation in rectal cancer / Z. Ramzan, A.B. Nassri, S. Huerta // *World J. Gastrointest. Oncol.* – 2014. – Vol. 6, № 7. – P. 194-210.
9. Relationship of angiopoietins expression with microvessel density (MVD) in human colorectal tumors / P.Q. Shen, Z.L. Chen, F.C. Xiao, X.D. Shen // *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* – 2006. – Vol. 35, № 2. – P. 194-198.
10. Role of Ang-2, Tie-2 and VEGFR-2 in angiogenesis in colorectal carcinoma and their prognostic value / X. Liu, Y. Li, J. Wei, Y. Zhao // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* – 2012. – Vol. 32, № 11. – P. 1658-1662.
11. Sun W. Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy / W. Sun // *J. Hematol. Oncol.* – 2012. – Vol. 11, № 5. – P. 63.

### ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА НЕОАНГИОГЕНЕЗА АНГИОПОЭТИНА-2 В ТКАНИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПРЯМОЙ КИШКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХЕМОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

*В.В. Голотюк*

**Резюме.** Целью исследования было определить особенности экспрессии Анг-2 в ткани интактной кишки и рака прямой кишки (РПК) до лечения и после курса неoadьювантной хемолучевой терапии (НХЛТ), в том числе на фоне полирадиомодификации с применением препаратов тегафура и L-аргинина гидрохлорида. У 21 больного аденокарциномой прямой кишки II-III стадий иммуногистохимически определяли экспрессию Анг-2 в биопсийном и операционном материале до- и после НХЛТ. Выявлено обратную взаимозависимость степени дифференциации РПК и уровня лечебного постлучевого патоморфоза с одной стороны, и экспрессии Анг-2 в ткани опухоли – с другой, что свидетельствует о возможности использования Анг-2 в качестве маркера оценки злокачественного потенциала РПК и эффективности примененной НХЛТ. Установлено, что применение в комплексе полирадиомодификации предшественника биосинтеза оксида азота L-аргинина гидрохлорида потенцирует непосредственный повреждающий эффект НХЛТ на опухолевую паренхиму и дополнительно подавляет активность опухолево-ассоциированного неоангиогенеза.

**Ключевые слова:** карцинома прямой кишки, неоангиогенез, лечебный патоморфоз, хемолучевая терапия, оксид азота.

### FEATURES OF NEOANGIOGENESIS MARKER ANG-2 EXPRESSION IN RECTAL ADENOCARCINOMA TISSUES UNDER THE INFLUENCE OF NEOADJUVANT CHEMORADIOTHERAPY

*V.V. Holotiuk*

**Abstract.** The aim of the study was to determine Ang-2 expression patterns in intact colon tissue and rectal cancer (RC) before treatment and after a course of neoadjuvant chemoradiotherapy (NCRT), including with the polyradiomodification using tegafur and L-arginine hydrochloride. Ang-2 expression was determined by immunohistochemistry in the biopsy and surgical material before and after NCRT in 21 patients with adenocarcinoma of the rectum stage II-III. There was an inverse correlation between differentiation degree of RC and the level of post-radiation therapeutic pathomorphosis on the one hand, and the level of Ang-2 expression in tumor tissue – on the other, which suggests the possibility of using Ang-2 as a marker for assessing the malignant potential of the RC and the NHLT application effectiveness. It was found that the use of nitric oxide biosynthesis precursor L-arginine hydrochloride as a component of polyradiomodification potentiates direct NCRT damaging effect on tumor parenchyma and also suppresses the activity of tumor-associated neoangiogenesis.

**Key words:** rectal cancer, neoangiogenesis, therapeutic pathomorphosis, chemoradiotherapy, nitric oxide.

SHEE "National Medical University" (Ivano-Frankivsk)

Рецензент – проф. Р.В. Сенютювич

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 3 (75). – P. 38-41

Надійшла до редакції 28.04.2015 року