

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

This article is published with open access at License: Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 01.08.2017. Revised: 27.08.2017. Accepted: 30.08.2017.

THE SIGNIFICANCE OF ANGIOGENESIS IN TUMORIGENESIS AND PROGNOSIS OF PROSTATE CANCER

I. I. Yakovtcova, P. V. Tkachenko, I. V. Ivakhno

Kharkiv medical academy of postgraduate education

Abstract

Angiogenesis is a key factor in tumor growth, invasion, and metastasis. The aim of the present study is to investigate the diagnostic and predictive value of prostatic cancer (PC) angiogenesis by immunohistochemically examination of CD34, VEGF and Ki-67 in 40 cases of PC, 8 cases of nodular hyperplasia and 8 cases of intraepithelial neoplasia. It was found that the density of microvessels and intensity data of stroma but not epithelium VEGF staining in PC more than in benign pathology, and increased with risk of recurrence and as the differentiation of cancer was reduced. Results indicate that the vascularization is a sign of growth and progression of PC and may be used as predictor of the disease.

Key words: prostatic cancer, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, microvessel density.

ЗНАЧЕННЯ АНГІОГЕНЕЗУ В ТУМОРОГЕНЕЗІ І ПРОГНОЗИ РАКУ ПЕРЕДМУХІРОВОЇ ЗАЛОЗИ

І. І. Яковцова, П. В. Ткаченко, І. В. Івахно

Харківська медична академія післядипломної освіти

Резюме

Ангіогенез є ключовим фактором пухлинного росту, інвазії і метастазування. З метою вивчення діагностичного та прогностичного значення васкуляризації раку передміхурової залози проведено імуногістохімічне дослідження експресії CD34, VEGF та Ki-67 40 випадків раку передміхурової залози (РПЖ), 8 випадків нодулярної гіперплазії і 8 випадків інтраепітеліальної неоплазії. Встановлено, що щільність мікросудин і експресія VEGF стромы, але не епітелію в РПЖ більші, ніж при доброякісній патології, зростали по мірі зниження диференціювання раку і підвищення ризику рецидивування. Результати вказують, що васкуляризація служить показником зростання і прогресії РПЖ і може використовуватись як прогностичний критерій захворювання.

Ключові слова: рак передміхурової залози, ангіогенез, фактор росту ендотелію судин, щільність мікросудин.

ЗНАЧЕНИЕ АНГИОГЕНЕЗА В ТУМОРОГЕНЕЗЕ И ПРОГНОЗЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И. И. Яковцова, П. В. Ткаченко, И. В. Ивахно

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Данная работа является фрагментом научно–исследовательской работы Харьковской медицинской академии последипломного образования МОЗ Украины «Нанотехнологии в химиотерапии злокачественных опухолей у взрослых и детей», № 0113U000972 (2013-2017 рр.).

Резюме

Ангиогенез является ключевым фактором опухолевого роста, инвазии и метастазирования. С целью изучения диагностического и прогностического значения васкуляризации рака предстательной железы проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии CD34, VEGF и Ki-67 40 случаев рака предстательной железы (РПЖ), 8 случаев нодулярной гиперплазии и 8 случаев интраэпителиальной неоплазии ПЖ. Установлено, что плотность микрососудов и экспрессия VEGF стромы, но не эпителия в РПЖ больше, чем при доброкачественной патологии, возрастали по мере снижения дифференцировки рака и повышения риска рецидивирования. Результаты указывают, что васкуляризация служит показателем роста и прогрессии РПЖ и может использоваться как прогностический критерий заболевания.

Ключевые слова: рак предстательной железы, ангиогенез, фактор роста эндотелия сосудов, плотность микрососудов.

Актуальность

Рак предстательной железы (РПЖ) в Украине среди онкологических заболеваний мужского населения занимает второе место и первое у лиц старше 75 лет. Отмечается рост заболеваемости в среднем на 5,3% и смертности на 3,5% в год [1]. Рак предстательной железы (РПЖ) характеризуются неоднородностью клинического поведения. Даже без применения какой-либо терапии возможен медленный опухолевый рост, либо, не смотря на местную терапию, – быстрое распространение и метастазирование [4]. Выбор лечебной тактики пациентов РПЖ определяется прогнозом заболевания. Одним из прогностических факторов, определяющих риск метастазирования и неблагоприятного исхода раков различной локализации, является неоангиогенез [11]. По некоторым данным в РПЖ ангиогенез ассоциируется со стадией заболевания, дифференцировкой опухоли, неблагоприятным исходом [2, 7, 12], имеются научные работы, в которых эти взаимосвязи не подтверждались [6, 10], что определяет противоречивость значения ангиогенеза в РПЖ. Также отсутствуют маркеры, позволяющие оценить ангиогенез для выбора антиангиогенной терапии РПЖ [8]. Недостаточно изучено влияние стромального фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) на неоангиогенез и прогноз РПЖ [9].

Цель работы – изучение особенностей неоангиогенеза доброкачественной патологии и РПЖ для определение прогностического значения и механизмов влияния васкуляризации на туморогенез и опухолевую прогрессию.

Материалы и методы

Исследование проведено на материале оперативно удаленных предстательных желез пациентов с диагнозами: нодулярная гиперплазия предстательной железы (НГПЖ) – 8 случаев, интаэпителиальная неоплазия (ПИН) – 8 случаев, РПЖ – 40 случаев.

Средний возраст пациентов с НГПЖ составил $67,7 \pm 9,1$ лет, у пациентов с ПИН – $69,0 \pm 6,9$ лет, с РПЖ – $69,5 \pm 7,9$ лет. Средний уровень простатического специфического антигена (ПСА) крови – $5,6 \pm 3,9$ нг/мл, $7,4 \pm 5,4$ нг/мл и $19,1 \pm 28,2$ нг/мл соответственно. РПЖ были распределены по значению суммы Глисона (СГ) на ≤ 6 , 7 (3+4), 7 (4+3), 8 и 9–10 в каждой группе по 8 случаев, и на три группы риска – слабого (ПСА до 10 нг/мл, сТ1-2а, СГ 2–6), промежуточного (ПСА 10–20 нг/мл, или сТ2b, или СГ 7) и высокого (ПСА более 20, или сТ2с, или СГ 8–10) – 4 (10%), 10 (25%) и 26 (65%) соответственно [3].

Проводился расчет плотности микрососудов (ПМС) в поле зрения при увеличении микроскопа $\times 200$. Площадь сосудов измерялась (в $\mu\text{м}^2$) на микрофотографиях с использованием программы ImageJ для морфометрии.

Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием первичных моноклональных антител (МКАТ) фирмы ДАКО (Дания), Ready-to-Use к CD 34 для подсчета ПМС и их площади, VEGF – фактора неоангиогенеза, Ki-67 – маркера пролиферативной активности. Для оценки иммуногистохимической реакции использовали общепринятую полуколичественную шкалу – учитывался процент экспрессирующих маркер клеток в поле зрения: 0 – отсутствие экспрессии, 1 – 1–33% клеток, 2 – 34–66% клеток, 3 – 67–100% клеток. Слабая едва различимая экспрессия VEGF, соответствующая 0–1 степени расценивалась как негативная [6, 9, 12].

Для статистического исследования связи между признаками применялись непараметрические методы Спирмана и хи-квадрат Пирсона. Для установления различия между группами исследования использовался t-критерий Стьюдента. Статистически значимым считалось значение $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

ПМС в РПЖ составила $80,1 \pm 41$ и колебалась в широких пределах от 10 до 210. ПМС в РПЖ была в 5 и 3 раза больше, чем в НГПЖ ($15,0 \pm 11$) и ПИН ($27,7 \pm 10,3$). Таким образом, при ПИН выявлено повышение показателя ПМС ($p < 0,05$) по сравнению с НГПЖ и значительно большее повышение при РПЖ ($p < 0,0001$). Еще одним показателем ангиогенеза является размер кровеносных сосудов [4]. Средняя площадь сосудов в РПЖ составила 493 ± 139 и была значительно меньше, чем при НГПЖ – 1090 ± 532 ($p < 0,005$) и ПИН – 751 ± 169 ($p < 0,03$).

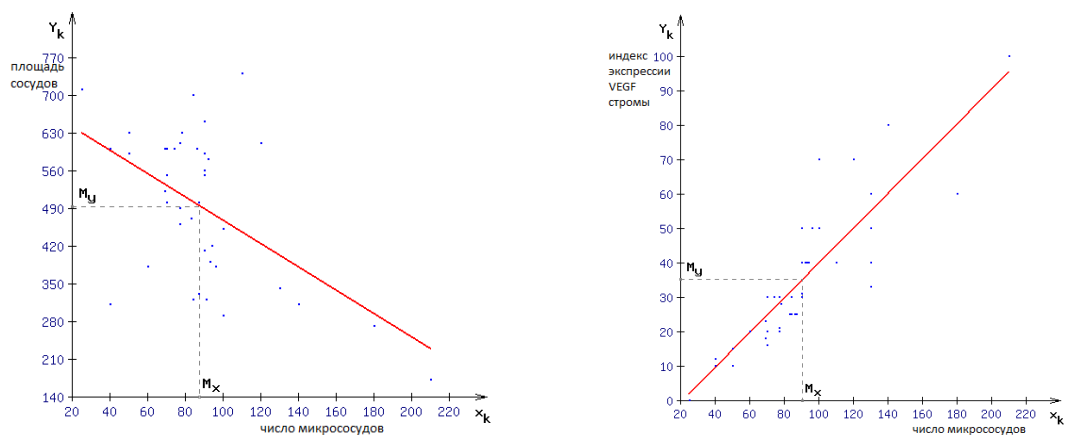


Рис. 1. Графики зависимости: слева – показателей ПМС и площади сосудов ($r = -0,52, p < 0,05$), справа – ПМС и стромального VEGF ($r = 0,9, p < 0,001$).

Прослежена обратная взаимосвязь между ПМС и их площадью ($p < 0,05$) в РПЖ – чем больше число сосудов, тем меньше их размер. Таким образом, низкий показатель площади сосудов, как и высокое их число, являются критериями неоангиогенеза.

Рассматривая особенности ангиогенеза в РПЖ в зависимости от дифференцировки и принадлежности к группам риска, выявлено, что при возрастании СГ от 6 до 8 ПМС увеличивалась. Так ПМС при РПЖ с СГ 6 составила $62,3 \pm 22$, с СГ 7 (3+4) – $79,7 \pm 20$, с СГ 7 (4+3) – $97,8 \pm 37$, с СГ 8 – $104,2 \pm 43$, с СГ 9–10 – $94,8 \pm 29,3$. ПМС в РПЖ с СГ 7 (4+3), 8 и 9–10 была статистически значимо больше, чем при СГ 6 ($p < 0,05$). Соответственно площадь сосудов была наибольшая в РПЖ с СГ 6 – $572 \pm 114,6$, незначительно снижалась при РПЖ с СГ 7 (3+4) – 537 ± 123 , и СГ 9 (4+3) – 505 ± 150 . Наименьшая площадь сосудов была при РПЖ с СГ 8 – 356 ± 109 , что статистически значимо меньше, чем при РПЖ с СГ 6 ($p < 0,005$), 7 (3+4) ($p < 0,03$) и 7 (4+3) ($p < 0,05$).

Таблица 1

Зависимость показателей ангиогенеза от принадлежности пациентов к группам риска

Признак	Группа риска	Слабого	Промежуточного	Высокого
Плотность микрососудов		$62,2 \pm 25$	$70,5 \pm 22$	$99,8 \pm 34^*$
Площадь сосудов, мкм ²		637 ± 50	537 ± 141	$454 \pm 131^*$
Ki-67 эндотелия, %		$0,12 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,04$
VEGF эпителия, %		50	70	76,9
VEGF стромы, %		0	10	$57,7^*$

Примечание: * – наличие статистически значимого различия между группами риска по соответствующему признаку ($p < 0,05$).

Риск биохимического рецидивирования зависел от показателя ПМС и площади сосудов (см. табл. 1). Так наибольшая ПМС была в РПЖ высокого риска – $99,8 \pm 34$, различая с группами слабого и промежуточного риска достоверны ($p < 0,01$) и ($p < 0,05$) соответственно). Наименьшая площадь сосудов была в группе высокого риска – 454 ± 131 , что меньше по сравнению с группой слабого риска – 637 ± 50 ($p < 0,001$) (табл. 1).

Неоангиогенез в РПЖ зависит от пролиферации эндотелиоцитов, их миграции и ремодулирования капилляров с образованием сосудистых просветов, эти процессы регулируются VEGF [5]. Индекс метки маркера пролиферативной активности Ki-67 эндотелиоцитами в РПЖ составил $0,14 \pm 0,03$. Выявлена тенденция роста показателя ПМС по мере возрастания уровнем экспрессии Ki-67, однако отсутствовала статистически значимая зависимость между ними ($r = 0,29$, $p > 0,05$), что подтверждает роль в неоваскуляризации других процессов помимо пролиферации эндотелиальных клеток. Не выявлено также статистически значимого различия между уровнем экспрессии Ki-67 и СГ и группами риска РПЖ, что, по-видимому, объясняется различными механизмами регулирования пролиферации эндотелиальных клеток и опухолевой прогрессии.

Основным фактором неоангиогенеза является VEGF, который также способен оказывать непосредственное стимулирующее влияние на рост опухолевых клеток [7, 8]. Экспрессия VEGF наблюдалась в раковых клетках и опухолевой строме. В эпителии экспрессия была гетерогенной, участки опухоли с различной интенсивностью окраски чередовались с участками без экспрессии, положительная реакция наблюдалась в (73% случаев) и не зависела от дифференцировки рака ($\chi^2 = 4$, $p = 0,3$). В клетках стромы (миофибробластах) и эндотелиоцитах экспрессия VEGF была менее интенсивной, чем в эпителии, наблюдалась в 40% (16/40) случаев. В РПЖ по сравнению с доброкачественной патологии прослежена тенденция роста экспрессии VEGF как в эпителии (62,5% при НППЖ и ПИН и 73% при РПЖ), так и в строме (25% при НППЖ и ПИН и 40% при РПЖ). Также при ПИН экспрессия маркера была несколько выше, чем при НППЖ и ниже, чем при РПЖ ($p > 0,05$). Бурое окрашивание наблюдалась в базальном слое ацинусов, миофибробластах и эндотелиоцитах.

Стромальная экспрессии VEGF в РПЖ возрастала по мере увеличения СГ ($\chi^2 = 15$, $p < 0,005$) и риска рецидивирования ($\chi^2 = 13$, $p < 0,01$). В РПЖ с СГ < 6 экспрессия была негативной, наиболее выраженная в РПЖ с СГ 8 – позитивной в 75% (6/8) случаев; в РПЖ слабого риска экспрессия была негативной (0/4), в группе высокого риска – позитивная в 59% (16/27). При этом следует отметить, что прослежена лишь тенденция роста экспрессии VEGF эпителием по мере возрастания СГ и риска рецидивирования.

Прослежена зависимость между индексом метки VEGF стромы и показателями

неоангиогенеза – ПМС ($r=0,9$, $p<0,001$), площади сосудов ($r=-0,4$, $p<0,03$), Ki-67 эндотелиоцитами ($r=0,37$, $p>0,05$). Полученные результаты подтверждают ключевую роль VEGF в неоангиогенезе. Обнаруженная зависимость между экспрессией VEGF и ПМС и отсутствие зависимости между VEGF и Ki-67, а также между Ki-67 и ПМС указывает на свойство VEGF регулировать неоангиогенез другими механизмами помимо пролиферации эндотелиоцитов (среди которых миграция эндотелиальных клеток и образование сосудистых просветов) и важность этих процессов в ангиогенезе РПЖ.

Полученные данные показали значение стромального опухолевого компонента и неоангиогенеза в развитии и прогрессии РПЖ. Дальнейшее исследование значения опухолевой стромы, а именно соединительнотканного компонента, десмоплазии, иммунных клеточных реакций даст возможность более точному прогнозу РПЖ и выбору адекватной лечебной тактики.

Выводы:

1. В РПЖ показателями ангиогенеза и васкуляризации является плотность микрососудов и их площадь, которые составили $80,1\pm 41$ и 493 ± 139 соответственно. Прослежена обратная зависимость между этими показателями ($p<0,05$) и их взаимосвязь с уровнем экспрессии VEGF клетками стромы ($p<0,05$).

2. Пролиферативная активность (экспрессия Ki-67) эндотелия сосудов не зависела от показателей васкуляризации, что указывает на участие в неоангиогенезе других механизмов, среди которых известны миграция эндотелиоцитов и ремоделирование капилляров.

3. В процессах туморогенеза принимает участие неоваскуляризация, что доказывается статистически значимым различием по показателям ПМС, площади сосудов и стромальной экспрессии VEGF между доброкачественной патологией, ПИН и раками и в зависимости от суммы Глисон.

4. Показатели ангиогенеза являются прогностическими критериями РПЖ, что доказывается снижением показателя площади микрососудов и повышением показателя ПМС по мере роста риска рецидивирования и возрастания суммы Глисона. Площадь микрососудов в раках высокого риска меньше, чем в раках низкого риска ($p<0,0001$), ПМС в раках высокого риска больше, чем низкого ($p<0,001$) и промежуточного риска ($p<0,05$).

Литература

1. Fedorenko Z.P. Rak v Ukrayini, 2005–2015 / Z.P. Fedorenko, L.O. Hulak, YE.L. Horokh [ta in.] // Byul. Natsional'noho kantser-reyestru Ukrayiny. – 2006–2016. – vydannya 9–18. <http://users.i.kiev.ua/~ucr/>

2. Erbersdobler A. Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue microarray study / A. Erbersdobler, H. Isbarn, K. Dix [et al.] // World Journal of Urology. – 2010. – Vol. 28, Issue 6. – P. 687–692.
3. Humphrey P.A. The 2016 WHO classification of tumors of urinary system and male genital organs - part B: prostate and bladder tumors / P.A. Humphrey, H. Moch, A.L. Cubilla [et al.] // European Urology – 2016. – Vol. 70. – P. 106–119.
4. Mucci L.A. Prospective Study of Prostate Tumor Angiogenesis and Cancer-Specific Mortality in the Health Professionals Follow-Up Study / L.A. Mucci, A. Powolny, E. Giovannucci [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2009. – N 3, Vol. 20. – P. 5627–33.
5. Norton K.A. Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis / K.A. Norton, A.S. Popel // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – 10 p.
6. Pan L. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in locally advanced prostate cancer: secondary analysis of radiation therapy oncology group (RTOG) 8610 / L. Pan, S. Baek, P.R. Edmonds [et al.] // Radiation Oncology. – 2013. – Vol. 8 (100). – 11 p.
7. Peyromaure M. The expression of vascular endothelial growth factor is associated with the risk of cancer progression after radical prostatectomy / M. Peyromaure, P. Camparo, C. Badoual [et al.] // Journal Compilation. – 2007. – Vol. 99. – P. 1150–1153.
8. Taverna G. Is angiogenesis a hallmark of prostate cancer? / G. Taverna, F. Grizzi, P. Colombo, P. Graziotti // Front Oncol. – 2013. – Vol. 3: 15. – 3 p.
9. Tony Tong-Lin Wu. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Taiwanese Benign and Malignant Prostate Tissues / Tony Tong-Lin Wu, Jyh-Seng Wang, Bang-Ping Jiann [et al.] // J. Chin. Med. Assoc. – 2007. – Vol. 70. – N 9. – P. 380–384.
10. Tretiakova M. Microvessel density is not increased in prostate cancer: digital imaging of routine sections and tissue microarrays / M. Tretiakova, T. Antic, D. Binder [et al.] // Hum Pathol. – 2013. – Vol. 44 (4). – P. 495–502.
11. Wang Z. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy / Z. Wang, C. Dabrosin, X. Yin [et al.] // Seminars in Cancer Biology. – 2015. – Vol. 35. – P. 224–243.
12. Yasser M.E. (CD105) and Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Markers in Prostatic Adenocarcinoma / M.E. Yasser, J.F. Silverman, P.R. Olson [et al.] // Am J Clin Pathol. – 2007. – Vol. 127 (4). – P. 572–579.