

Изучение прогностической значимости маркера апоптоза гена *p53* и васкулоэндотелиального фактора роста при оценке клинического течения ангиофибромы носоглотки

О.Б. Абдурахманов

Ташкентский институт усовершенствования врачей; Республика Узбекистан, 100007, Ташкент, ул. Паркентская, 51

Контакты: Отабек Бахтиярович Абдурахманов otabek5555@mail.ru

Цель исследования – изучить прогностическую значимость маркера апоптоза (*p53*) и васкулоэндотелиального фактора роста (*VEGF*) при оценке клинического течения ювенильной ангиофибромы носоглотки (ЮАН).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 43 больных с первичной ЮАН (основная группа) и 20 – с рецидивами (контрольная группа). Наличие экспрессии *VEGF* и маркера мутантного гена *p53* (*mtp53*) определяли иммуногистохимическим (ИГХ) методом с помощью наборов фирмы DAKO (Дания). Результаты реакций с антителами к *VEGF-A* и *mtp53*, локализованным в ядрах и мембранах, выражали в процентах с учетом количества окрашенных клеток на 100 исследованных в различных полях зрения.

Результаты. Ассоциативный анализ показал, что больные как основной, так и контрольной группы с высокой экспрессией *mtp53* в опухолевых клетках имели IIIA–B и IV клинические стадии, а у пациентов со слабой экспрессией этого маркера или его отсутствием выявлены I и II клинические стадии.

Наличие высокой (3+) и умеренной (2+) экспрессии маркера *mtp53* свидетельствует о более тяжелой форме заболевания. Это имеет прогностическую значимость и является неблагоприятным прогностическим признаком. Отсутствие мутаций или снижение экспрессии данного маркера ассоциировано с благоприятным исходом заболевания.

Наши исследования показали, что высокая экспрессия маркера *VEGF* не была выявлена ни в одном опухолевом образце. Умеренная (2+) экспрессия данного маркера в основной группе была обнаружена в опухолевых клетках у 18 (41,9 %) из 43 больных, слабая – у 6 (13,9 %) из 43, а отсутствие – у 19 (44,2 %) из 43. В контрольной группе больных отсутствие экспрессии маркера *VEGF* в опухолевых образцах было ниже в 9 раз по сравнению с основной группой.

Сравнение с клинической характеристикой больных показало, что как в основной, так и в контрольной группе умеренная экспрессия *VEGF* наблюдалась у больных с IIIA–B и IV клиническими стадиями, слабая – в образцах больных со II стадией, отсутствие экспрессии этого маркера было у больных с I стадией.

Выводы. Ассоциативный анализ показал, что больные как основной, так и контрольной группы с высокой экспрессией *mtp53* в опухолевых клетках имели IIIA–B и IV клинические стадии.

Ключевые слова: ангиофиброма носоглотки, белок *p53*, васкулоэндотелиальный фактор роста, иммуногистохимия, клиническое течение

DOI: 10.17650/2222-1468-2015-5-2-25-29

Investigation of the prognostic value of the apoptotic marker *p53* gene and vascular endothelial growth factor in evaluating the clinical course of nasopharyngeal angiofibroma

O.B. Abdurakhmanov

Tashkent Institute for Postgraduate Training of Physicians; 51 Parkent St., Tashkent, 100007, Republic of Uzbekistan

Objective. To investigate the prognostic value of the apoptotic markers (*p53*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*) in evaluating the clinical course of juvenile nasopharyngeal angiofibroma (JNA).

Subjects and methods. The investigation enrolled 43 patients with primary JNA (a study group) and 20 with its relapses (a control group). The expression of *VEGF* and mutant *p53* (*mtp53*) gene was immunohistochemically determined using DAKO kits (Denmark). The results of reactions with antibodies to *VEGF-A* and *mtp53* located in the nuclei and membranes were expressed as percentages in terms of stained cell counts per 100 cells examined in different visual fields.

Results. An associative analysis showed that both study and control group patients with high *mtp53* gene expression in the tumor cells had clinical stages IIIA–B and IV and those in whom the expression of this gene in the tumor cells was weak or absent were found to have clinical stages I and II.

The high (3+) and moderate (2+) *mtp53* gene expressions suggest that the disease is severe. Consequently, this is of prognostic value and a poor predictor and the absence of mutations or the decreased expression of this gene is associated with a favorable disease outcome.

Our investigations indicated that the high expression of the *VEGF* gene was detected in none of the tumor specimens. In the study group, the tumor cell expression of this gene was found to be moderate (2+) in 18 (41.9 %) patients, weak in 6 (13.9 %) and absent in 19 (44.2 %) of the 43 patients. In the control group, the absence of *VEGF* gene expression in the tumor specimens was 9 times lower than that in the study group.

A comparison with the clinical characteristics of the patients demonstrated that in both the study and control groups, the VEGF expression was observed to be moderate, or weak and absent in those with clinical stages IIIA–B and IV or in those with stage II and I, respectively.
Conclusion. *The associative analysis showed that both study and control group patients with high tumor cell mtp53 expression had clinical stages IIIA–B and IV.*

Key words: *nasopharyngeal angiofibroma, protein p53, vascular endothelial growth factor, immunohistochemistry, clinical course*

Введение

Несмотря на то, что ангиофиброма носоглотки по своему гистологическому строению относится к доброкачественным опухолям, по клиническому течению она проявляет себя как злокачественное образование. Опухоль не только оттесняет, но и разрушает близлежащие структуры, вызывая деструкцию кости, прорастает в орбиту, полость черепа, в результате чего развиваются тяжелые внутричерепные осложнения, нарушаются функции жизненно важных органов. Еще одним последствием данного заболевания является спонтанное носовое кровотечение, которое приводит иногда к летальному исходу [1–5].

Успех лечения ювенильной ангиофибромы носоглотки (ЮАН) во многом зависит от различных факторов, в числе которых молекулярно-генетический профиль особенностей роста опухоли. Многообразие видов опухолей и неясность механизма возникновения быстро прогрессирующего ангиоматозного роста свидетельствуют о необходимости привлечения дополнительных методов диагностики для разработки научно обоснованных показаний к тому или иному хирургическому вмешательству. Немаловажным остается вопрос рецидивирования, а точнее, продолженного роста опухоли после ее хирургического удаления [1, 6–8]. Поэтому только клинические методы исследования при ЮАН не всегда являются специфическими. В связи с этим появилась необходимость в поиске новых биомаркеров роста клеток, используемых для оценки риска развития опухолей, их ранней диагностики, выбора индивидуализированной терапии, мониторинга прогрессирования и рецидивов данного заболевания [2, 3, 9, 10].

Один из универсальных методов обнаружения белковых биомаркеров – иммуногистохимическое (ИГХ) исследование, основанное на использовании моноклональных антител к антигенам, которое позволяет выявить ИГХ-профиль больных, заключающийся в совокупной оценке различия экспрессии маркеров и их интенсивности [11–15].

Изучение молекулярно-биологических характеристик ЮАН выходит на первый план в клинической практике для выявления прогностических биомаркеров и групп риска среди обследованных пациентов с первичным диагнозом. Однако в оценке прогноза заболевания и выбора эффективного хирургического вмешательства молекулярно-генетические маркеры все еще не являются общепринятыми в клинической практике [16–18].

Важным остается вопрос о возможности использования генетического тестирования для мониторинга эффективности проводимой терапии больных ЮАН. Комплексное изучение молекулярно-генетических, патоморфологических и клинических характеристик данного заболевания свидетельствует об актуальности исследований, которые ставят целью повышение эффективности ранней диагностики, лечения и профилактики.

На сегодняшний день доказано, что существуют неблагоприятные молекулярно-биологические факторы прогноза при ЮАН [5, 19, 20]. Индивидуальные особенности опухоли, специфику ее «биологического поведения» характеризуют тканевые, клеточные или молекулярные маркеры. Эти маркеры составляют фундаментальные свойства опухолевых клеток, такие как инвазия, неограниченная пролиферация, активность процессов неоангиогенеза, способность противостоять апоптозу, а также чувствительность этих клеток к экзогенным и эндогенным регуляторам. Для понимания основ определенных этапов развития новообразований в условиях свершившейся опухолевой трансформации клеток ИГХ-метод считается удобным при исследовании экспрессии белков в тканях различных опухолей [17, 20].

Цель исследования – изучить прогностическую значимость маркера апоптоза (p53) и васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) при оценке клинического течения ЮАН.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие 43 больных с первичной опухолью ЮАН (основная группа) и 20 – с рецидивами (контрольная группа). Наличие экспрессии VEGF и мутантного гена p53 (mtp53) определяли ИГХ-методом с помощью наборов фирмы ДАКО (Дания). Результаты реакций с антителами к VEGF-A и mtp53, локализованными в ядрах и мембранах, выражали в процентах с учетом количества окрашенных клеток на 100 исследованных в различных полях зрения.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

В последние годы стало очевидным, что более чем 50 % опухолей человека – результат мутации гена p53 [5, 18]. Изменения в гене p53 связаны со спонтанными

мутациями, которые накапливаются с возрастом. Большинство исследователей считают, что мутации в гене *p53* происходят на поздних стадиях развития опухолей и могут служить важным прогностическим признаком [15, 21].

Процесс неоангиогенеза является необходимым для длительной адаптации тканей в условиях повреждения. При этом происходит частичное поступление фактора роста в кровь, что имеет диагностическое значение. VEGF представляется нам самым мощным и доминирующим фактором неоангиогенеза [3, 7, 16].

Анализ результатов, полученных при изучении экспрессии гена *mtp53* (маркера апоптоза), показал, что у 48,8 % больных ЮАН основной группы в опухолевых клетках наблюдается высокая (рис. 1) и умеренная (рис. 2) экспрессия *mtp53*. В 25,6 % опухолевых образцов больных данной группы экспрессия маркера мутантного гена была слабой и у 25,6 % — отсутствовала (табл. 1, рис. 3).

Таблица 1. Экспрессия маркера *p53* в опухолевых клетках больных ЮАН, *n* = 63

Группа	Выраженность экспрессии	Частота встречаемости, <i>n</i> (%)	Стадия
Основная, <i>n</i> = 43	--	11 (25,6)	I
	+	11 (25,6)	II
	++	14 (32,6)	IIIА
	+++	7 (16,1)	IIIВ–IV
Контрольная, <i>n</i> = 20	--	1 (5,0)	I
	+	5 (25,0)	II
	++	6 (30,0)	IIIА
	+++	8 (40,0)	IIIВ–IV

Примечание. «--» — отсутствие иммунопероксидазного окрашивания; «+» — окрашивание 10 % опухолевых клеток; «++» — окрашивание 50 % опухолевых клеток; «+++» — окрашивание более 50 % опухолевых клеток.

В контрольной группе 70 % больных ЮАН в опухолевых клетках имели умеренную и сильную экспрессию *mtp53*. Слабая экспрессия *mtp53* и ее отсутствие было выявлено у 30 % больных этой группы (см. табл. 1).

Таким образом, у больных контрольной группы высокая экспрессия *mtp53* встречалась в 2,5 раза чаще, чем у пациентов основной группы. Это свидетельствует о подавлении апоптоза у большего числа больных, а также о более выраженном несоответствии норме прохождения клеточного цикла после повреждения ДНК и выживания клеток с нарушениями генома, что приводит к возникновению генетической нестабильности и способствует злокачественной трансформации [2, 11, 12].

Ассоциативный анализ показал, что больные обеих групп с высокой экспрессией *mtp53* в опухолевых клетках имели IIIА–В и IV клинические стадии, а у больных со слабой экспрессией или ее отсутствием были диагностированы I и II клинические стадии.

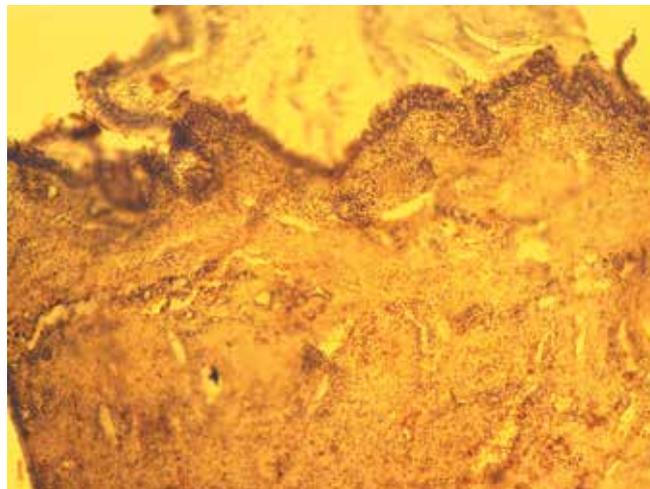


Рис. 1. Опухолевая ткань больного X. Высокая экспрессия *p53* (+++). ИГХ-окраска. Ув. ок. × 10, об. × 20

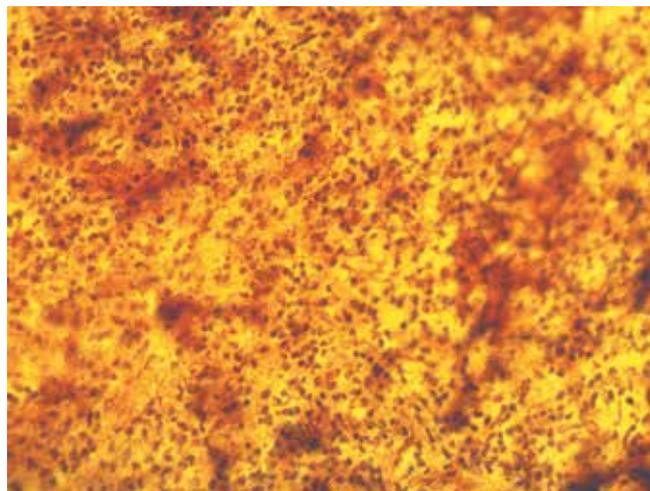


Рис. 2. Опухолевая ткань больного U. Умеренная экспрессия гена *p53* (++) . ИГХ-окраска. Ув. ок. × 10, об. × 40

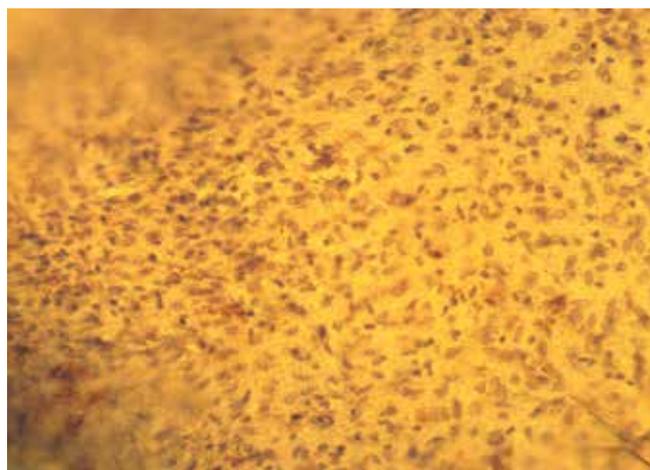


Рис. 3. Опухолевая ткань больного H. Отсутствие экспрессии гена *p53*. ИГХ-окраска. Ув. ок. × 10, об. × 40

Наличие высокой (3+) и умеренной (2+) экспрессии гена *mtp53* является неблагоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о более тяжелой форме заболевания. Отсутствие мутаций или снижение экспрессии данного гена ассоциировано с благоприятным исходом заболевания.

Исследования показали, что высокая экспрессия маркера VEGF не была выявлена ни в одном опухолевом образце (табл. 2). Умеренная (2+) экспрессия этого маркера (рис. 4) в основной группе была обнаружена в опухолевых клетках 18 (41,9 %) из 43 больных, слабая – 6 (13,9 %, рис. 5) из 43, а отсутствие – 19 (44,2 %, рис. 6) из 43. В контрольной группе больных отсутствие экспрессии маркера VEGF в опухолевых образцах было ниже в 9 раз по сравнению с основной группой. Умеренная и слабая реакция клеток на наличие белка VEGF была выявлена в 95 % опухолевых образцов больных, оперированных ранее. Сравнение с клинической характеристикой больных показало, что как в основной, так и в контрольной группе умеренная экспрессия VEGF наблюдалась у больных с IIIA–B и IV клиническими стадиями, слабая – в образцах больных со II стадией, отсутствие экспрессии – у больных с I стадией (см. табл. 2).

Таблица 2. Экспрессия VEGF в опухолевых клетках больных ЮАН, n = 63

Группа	Выраженность экспрессии	Частота встречаемости, n (%)	Стадия
Основная, n = 43	--	19 (44,2)	I
	+	6 (13,9)	II
	++	18 (41,9)	III–IV
Контрольная, n = 20	--	1 (5,0)	I
	+	7 (35,0)	II
	++	12 (60,0)	III–IV

Примечание. «--» – отсутствие иммунопероксидазного окрашивания; «+» – окрашивание 10–50 % опухолевых клеток; «++» – окрашивание более 50 % опухолевых клеток.

Отсутствие экспрессии VEGF или ингибирование его активности подавляет ангиогенез и рост опухоли. Кроме того, последние исследования свидетельствуют о проапоптотической активности блокирования VEGF, который ингибирует внутриклеточные сигнальные пути, запускающие апоптоз [8, 19, 21].

Выводы

Ассоциативный анализ показал, что больные как основной, так и контрольной группы с высокой экспрессией *mtp53* в опухолевых клетках имели IIIA–B и IV клинические стадии, а у больных со слабой экспрессией этого гена или его отсутствием выявлены I и II стадии.

Сравнение с клинической характеристикой больных показало, что как в основной, так и в контрольной группе умеренная экспрессия VEGF наблюдалась у больных с IIIA–B и IV клиническими стадиями, слабая – в образцах больных со II стадией, отсутствие экспрессии – у больных с I стадией.

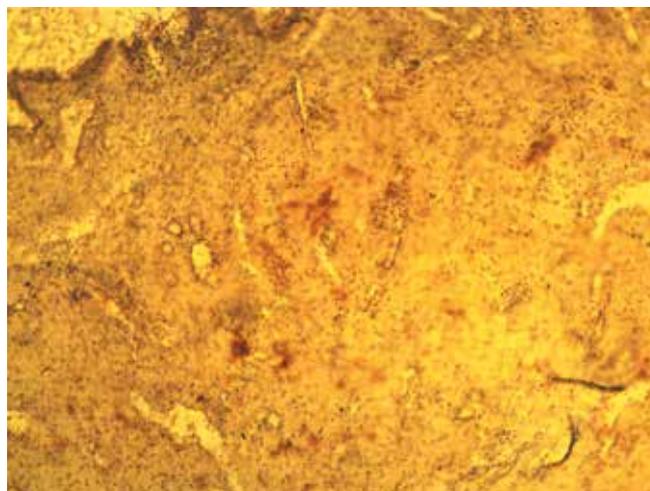


Рис. 4. Опухолевая ткань больного X. Умеренная экспрессия VEGF (++) . ИГХ-окраска. Ув. ок. × 10, об. × 20

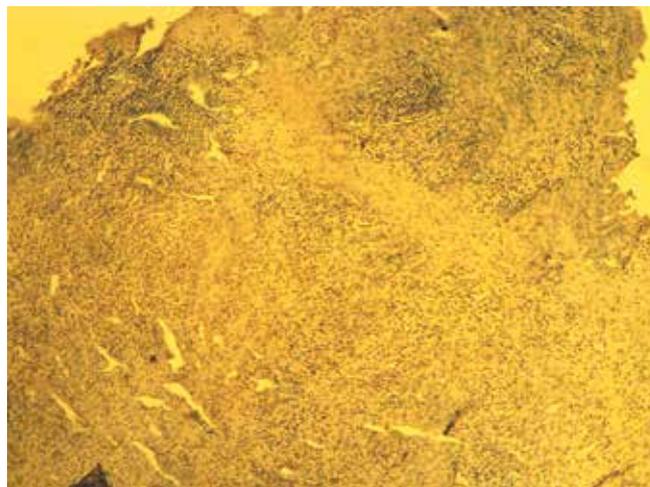


Рис. 5. Опухолевая ткань больного H. Слабая экспрессия VEGF (+). ИГХ-окраска. Ув. ок. × 10, об. × 20



Рис. 6. Опухолевая ткань больного U. Отсутствие экспрессии гена VEGF. ИГХ-окраска. Ув. ок. × 10, об. × 20

ЛИТЕРАТУРА

1. Арифов С.С., Лутфуллаев У.Л., Лутфуллаев Г.У. Оценка эффективности лечения больных с юношеской ангиофибромой носовой части глотки при кровотечении. Журнал ушных, носовых и горловых хвороб 2009;6:85–7. [Arifov S.S., Lutfullayev U.L., Lutfullayev G.U. Assessment of treatment of patients with the juvenile angiofibroma of the nasal part of the pharynx with bleeding. Journal of Otorhinolaryngologic Diseases 2009;6:85–7. (In Russ.)].
2. Герштейн Е.С., Щербakov А.М., Обушева М.Н., Кушлинский Н.Е. Иммуноферментное исследование содержания фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы. Кремлевская медицина 2005;3:45–52. [Herstein E.S., Shcherbakov A.M., Obusheva M.N., Kushlinskiy N.E. Enzyme immunoassay of the content of vascular endothelial growth factor (VEGF) in Tumors and blood serum of breast cancer patients. Kremlyevskaya meditsyna = Kremlin Medicine 2005;3:45–52. (In Russ.)].
3. Киселев С.М., Луценко С.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Ингибиторы опухолевого ангиогенеза. Биохимия 2003;68(5):611–31. [Kiselyov S.M., Lutsenko S.V., Severin S.E., Severin E.S. Tumor angiogenesis inhibitors. Biokhimiya = Biochemistry 2003;68(5):611–31. (In Russ.)].
4. Schick B., Rippel C., Brunner C. et al. Numerical sex chromosome aberrations in juvenile angiofibromas: genetic evidence for an androgen-dependent tumor? Oncol Rep 2003;10(5):1251–5.
5. Som M.L., Neffson A.H. Fibromas of the nasopharynx: juvenile and cellular types. Ann Otol Rhinol Laryngol 1940;49(1):211–9.
6. Герштейн Е.С., Щербakov А.М., Алиева С.К. и др. Фактор роста эндотелия сосудов в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы. Бюллетень экспериментальной биологии 2003;135(1):99–102. [Herstein E.S., Shcherbakov A.M., Aliyeva S.K. et al. Vascular Endothelial Growth Factor in Tumors and Blood Serum of Breast Cancer Patients. Bulletin' eksperimentalnoy biologii = Biological Expert Bulletin 2003;135(1):99–102. (In Russ.)].
7. Давиденко И.С., Пепти Е.Б., Фокин А.Н. Значение ангиогенеза в терапии метастатического рака молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2007;4:8–12. [Davydenko I.S., Pefi E.B., Fokin A.N. Importance of angiogenesis in therapy of metastatic breast cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2007;4:8–12. (In Russ.)].
8. Карамышева А.Ф. Ангиогенез опухоли: механизмы, новые подходы к терапии. В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Научный мир, 2000. С. 298–309. [Karamysheva A.F. Tumor angiogenesis: mechanisms, new approaches to therapy: In book: Carcinogenesis. Under the editorship of D.G. Zaridze. Moscow: Nauchnyi mir = Scientific World, 2000. Pp. 298–309. (In Russ.)].
9. Имянитов Е.Н., Моисеенко В.М. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой терапии. Вопросы онкологии 2008;54(2):121–32. [Imyanitov E.N., Moiseyenko V.M. Application of the molecular genetic analysis for selection of the anti-tumor therapy. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2008;54 (2):121–32. (In Russ.)].
10. Луценко С.В., Киселев С.М., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процессах. В кн.: Введение в молекулярную медицину. Под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2004. С. 446–95. [Lutsenko S.V., Kiselyov S.M., Feldman N.B., Severin S.E. Molecular mechanisms of angiogenesis in physiological and pathological processes: In book: Introduction into molecular medicine. Under the editorship of M.A. Paltsev. Moscow: Medicina, 2004. Pp. 446–95. (In Russ.)].
11. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: СПбМАПО, 2007. 211 с. [Imyanitov E.N., Hanson K.P. Molecular oncology: clinical aspects. St. Petersburg: SPbMAPO, 2007. 211 p. (In Russ.)].
12. Лукьянова Н.Ю., Кулик Г.И., Чехун В.Ф. Роль генов *p53* и *bcl-2* в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей. Вопросы онкологии 2000;46(2):121–8. [Lukiyanova N.Yu., Kulik G.I., Chekhun V.F. The role of the *p53* and *bcl-2* genes in the apoptosis and drug resistance of tumors. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2000;46(2):121–8. (In Russ.)].
13. Полушкина И.Н., Степанова Е.Б., Дбар Ж.Н. Молекулярно-биологические маркеры, характеризующие апоптоз, пролиферацию и ангиогенез при раке яичников. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2004;4:60–4. [Polushkina I.N., Stepanova E.B., Dbar Zh.N. Molecular and biological markers that characterize apoptosis, proliferation, and angiogenesis in ovarian cancer. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center with the RAMS Herald 2004;4:60–4. (In Russ.)].
14. Brentani M.M., Butugan O., Oshima C.T. et al. Multiple steroid receptors in nasopharyngeal angiofibromas. Laryngoscope 1989;99(4):398–401.
15. Langerød A., Zhao H., Borgun Ø. et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. Breast Cancer Res 2007;9(3):R30.
16. Пальцева Е.М., Секачева М.И., Федоров Д.Н., Скипенко О.Г. Влияние предоперационной химиотерапии на экспрессию факторов апоптоза в метастазах колоректального рака в печени. Архив патологии 2014;76(4):18–23. [Paltseva E.M., Sekachyova M.I., Fyodorov D.N., Skipenko O.G. Effect of pre-surgery chemotherapy on expression of apoptotic factors in metastases of colorectal cancer in the liver. Arkhiv patologii = Pathology Archive 2014;76(4):18–23. (In Russ.)].
17. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: Титул, 2004. 451 с. [Petrov S.V., Reichlin N.T. Manual for immune histochemical diagnosis of human tumors. Kazan: Titul, 2004. 451 p. (In Russ.)].
18. Bouchet V.P., Caron de Fromentel C., Puisieux A., Galmarini C.M. *p53* as a target for anti-cancer drug development. Crit Rev Oncol Hematol 2006;58(3):190–207.
19. Farag M.M., Ghanimah S.E., Ragaie A., Saleem T.H. Hormonal receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. Laryngoscope 1987;97(2):208–11.
20. Karthikeya P., Mahima V.G., Bagewadi S.B. Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. Indian J Cancer. Dent Res 2005;16(1):22–6.
21. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. М.: Медицина, 2004. 496 с. [Paltsev M.A. Introduction into molecular medicine. Moscow: Medicina, 2004. 496 p. (In Russ.)].