

# Иммуногистохимическая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы

М. А. Шишкин

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

## Ключевые слова:

колоректальный рак, патологический ангиогенез, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34.

Патология. – 2019. – Т. 16, № 2(46). – С. 148–154

DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177075

E-mail: Shishkin.stomat@gmail.com

**Цель работы** – изучить особенности иммуногистохимической экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 на I, II, III, IV стадиях (pTNM) развития колоректальной аденокарциномы.

**Материалы и методы.** Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала колоректальной аденокарциномы (КРА) 40 пациентов – I, II, III и IV стадии, по 10 случаев в каждой группе.

**Результаты.** Установлена тенденция к возрастанию экспрессии VEGF-A и VEGFR-2 при прогрессировании КРА от I к IV стадии (VEGF-A – 37,80 (30,22; 56,89) УЕОП на I стадии, 88,50 (63,00; 115,00) УЕОП на II стадии, 79,34 (63,14; 84,99) УЕОП на III стадии, 84,69 (80,66; 110,28) УЕОП на IV стадии; VEGFR-2 – 52,75 (39,14; 70,22) УЕОП на I стадии, 82,71 (63,14; 111,19) УЕОП на II стадии, 104,17 (96,04; 111,02) УЕОП на III стадии, 99,91 (86,15; 120,29) УЕОП на IV стадии). Показатели экспрессии этих маркеров коррелируют в I, II и III стадиях развития КРА ( $r = 0,95$ ,  $r = 0,69$ ,  $r = 0,85$ ). Установлено, что экспрессия VEGFR-1 отсутствует в неизменной слизистой оболочке толстой кишки, а также в ткани КРА I стадии развития. На последующих II, III и IV стадиях прогрессирования КРА в клетках стромы опухоли определена экспрессия VEGFR-1 при отсутствии статистически значимой разницы между ее показателями. Корреляции между показателями экспрессии VEGFR-1 и других изученных маркеров отсутствуют. Плотность распределения микрососудов, оцененная по экспрессии CD34, достоверно не отличается на каждой из стадий прогрессирования КРА. Установлены прямые корреляции между плотностью распределения микрососудов и экспрессией VEGF-A ( $r = 0,70$ ) и VEGFR-2 ( $r = 0,69$ ) в КРА III стадии, плотностью распределения микрососудов и экспрессией VEGF-A в КРА IV стадии ( $r = 0,69$ ).

**Выводы.** Экспрессия VEGF-A и VEGFR-2 возрастает при прогрессировании колоректальной аденокарциномы от I к IV стадии, при этом максимальный «скачок» уровней их экспрессии установлен при переходе от I ко II стадии развития колоректальной аденокарциномы, что может быть связано с аномально возрастающей активностью KRAS.

## Ключові слова:

колоректальний рак, патологічний ангиогенез, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34.

Патология. – 2019. – Т. 16, № 2(46). – С. 148–154

## Імуногістохімічна характеристика експресії VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 і CD34 при прогресуванні колоректальної аденокарциноми

М. А. Шишкін

**Мета роботи** – вивчити особливості імуногістохімічної експресії VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 і CD34 на I, II, III, IV стадіях (pTNM) розвитку колоректальної аденокарциноми.

**Матеріали та методи.** Виконали патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження операційного матеріалу колоректальної аденокарциноми (КРА) 40 пацієнтів – I, II, III та IV стадій, по 10 випадків у кожній групі.

**Результати.** Наявна тенденція до зростання експресії VEGF-A і VEGFR-2 при прогресуванні КРА від I до IV стадії (VEGF-A – 37,80 (30,22; 56,89) УООЩ на I стадії, 88,50 (63,00; 115,00) УООЩ на II стадії, 79,34 (63,14; 84,99) УООЩ на III стадії, 84,69 (80,66; 110,28) УООЩ на IV стадії; VEGFR-2 – 52,75 (39,14; 70,22) УООЩ на I стадії, 82,71 (63,14; 111,19) УООЩ на II стадії, 104,17 (96,04; 111,02) УООЩ на III стадії, 99,91 (86,15; 120,29) УООЩ на IV стадії). Показники експресії цих маркерів корелюють у I, II і III стадіях розвитку КРА ( $r = 0,95$ ,  $r = 0,69$ ,  $r = 0,85$ ). Встановили, що експресія VEGFR-1 відсутня в незмінній слизовій оболонці товстої кишки, а також у тканині КРА I стадії розвитку. На наступних II, III і IV стадіях прогресування КРА у клітинах стромі пухлини визначили експресію VEGFR-1 за відсутності статистично значущої різниці між її показниками. Кореляції між показниками експресії VEGFR-1 та інших досліджуваних маркерів відсутні. Щільність розподілу микросудин, підрахована за експресією CD34, вірогідно не відрізнялась на кожній зі стадій прогресування КРА. Наявні прямі кореляції між щільністю розподілу микросудин та експресією VEGF-A ( $r = 0,70$ ) і VEGFR-2 ( $r = 0,69$ ) в КРА III стадії, щільністю розподілу микросудин та експресією VEGF-A в КРА IV стадії ( $r = 0,69$ ).

**Висновки.** Експресія VEGF-A і VEGFR-2 зростає при прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії, максимальний «стрибок» рівнів їхньої експресії спостерігали при переході від I до II стадії розвитку колоректальної аденокарциноми, що може пов'язуватися з аномальним зростанням активності KRAS.

## Immunohistochemical study of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and CD34 expression in colorectal adenocarcinoma progression

M. A. Shyshkin

**Aim** – to study VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and CD34 immunohistochemical expression on the I, II, III, IV stages (pTNM) of colorectal adenocarcinoma development.

**Materials and methods.** Pathomorphological and immunohistochemical studies of surgical material of colorectal adenocarcinoma (CRA) from 40 patients (I, II, III and IV stages, 10 cases in each group) were conducted.

**Results.** There is a tendency to increasing expression of VEGF-A and VEGFR-2 during the CRA progression from I to IV stage (VEGF-A 37.80 (30.22; 56.89) CUOD on I stage, 88.50 (63.00; 115.00) CUOD on II stage, 79.34 (63.14; 84.99) CUOD on III stage, 84.69 (80.66; 110.28) CUOD on IV stage; VEGFR-2 – 52.75 (39.14; 70.22) CUOD on I stage, 82.71 (63.14; 111.19) CUOD on II stage, 104.17 (96.04; 111.02) CUOD on III stage, 99.91 (86.15; 120.29) CUOD on IV stage). The expression indices of these markers correlate in CRA stages I, II and III ( $r = 0.95$ ,  $r = 0.69$ ,  $r = 0.85$ ). It is established that VEGFR-1 is not expressed in unchanged mucous membrane of the large intestine, as well as in samples of CRA stage I. On subsequent II, III and IV stages of CRA progression the marker is expressed by stromal cells, but there is an absence of statistically significant difference between the expression indices. There are no correlations between expression indices of VEGFR-1 and other studied markers. The microvascular density assessed by CD34 expression is not significantly different on each of CRA progression stages. There are direct correlations between microvascular density and VEGF-A expression ( $r = 0.70$ ), and VEGFR-2 expression ( $r = 0.69$ ) in CRA III stage, microvascular density and VEGF-A expression in CRA IV stage ( $r = 0.69$ ).

**Conclusions.** Expression of VEGF-A and VEGFR-2 increases with the progression of colorectal adenocarcinoma from stage I to stage IV, with a maximum “jump” of the expression levels from stage I to stage II of colorectal adenocarcinoma, which may be due to abnormally increasing *KRAS* activity.

**Key words:**

colorectal cancer, neovascularization, pathologic, Vascular Endothelial Growth Factor A, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2, CD34 Antigen.

**Pathologia**

2019; 16 (2), 148–154

Развитие колоректальной аденокарциномы (КА) связывают с накоплением генетических альтераций в эпителиальном пласте толстой кишки. Поломки на генетическом уровне обеспечивают возрастание пролиферации с угнетением апоптоза клеток, что служит ключевым механизмом развития нематастатической опухоли. Однако на момент установления диагноза КА у 20 % пациентов обнаруживают метастазы в печени, а у 20–30 % больных метастазы в печени обнаруживают спустя 6–12 месяцев после резекции первичной опухоли. Пятилетняя выживаемость пациентов с диагнозом КА I стадии составляет 80–90 %, а при наличии отдаленных метастазов – лишь 10–20 % [1,2]. Эти данные обуславливают актуальность изучения вопросов, связанных с молекулярно-генетическими основами метастатической стадии развития КА, ответы на многие из которых еще не найдены.

По данным научной литературы, патогенетические пути развития метастатического КА включают сигнальные каскады, которые опосредованно активируются рецепторами к эпидермальному и васкуло-эндотелиальному факторам роста (EGFR и VEGFR) [3]. Внутриклеточные сигнальные пути EGFR вовлечены в регуляцию жизненного цикла клеток, сохранение или же модификацию их фенотипических свойств, а также в ряд других процессов. Сигнальные каскады VEGFR отвечают в первую очередь за неопластический ангиогенез – процесс образования новых сосудов. Новообразованные сосуды не только обеспечивают трофику опухолевой ткани, транспорт продуктов метаболизма, но и служат путями распространения опухолевых клеток, их миграции в системный кровоток [3,4].

Семейство молекул VEGF включает 5 гликопротеинов (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PlGF) и 3 рецептора (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3). VEGF-A – ключевой проангиогенный фактор в онкогенезе, основным рецептором для которого служит VEGFR-2. Экспрессия VEGFR-2 клетками КА описана в ряде исследований [4–6], однако данные об уровне его экспрессии варьируют от высокого [4,5] до низкого [6], а частота обнаружения экспрессии VEGFR-2 раковыми клетками варьирует от 100 % [5] до 50–80 % опухолей [4]. Значимость VEGFR-2 в механизмах прогрессии КА не вызывает сомнений, поскольку показана зависимость между экспрессией VEGFR-2

и выживаемостью раковых клеток, чувствительностью их к химиотерапии [7], а также экспрессией VEGFR-2 и дифференцировкой раковых клеток в направлении эндотелиоцитов [4]. Роль VEGFR-1 дискутируется. Считается, что в условиях нормы VEGFR-1 служит «приманкой», связывая и секвестрируя молекулы VEGF-A, препятствуя тем самым их связыванию с VEGFR-2 [8]. Однако, в научной литературе имеются данные о повышенной экспрессии VEGFR-1 при опухолевом росте, которая ассоциируется с активацией неопластического ангиогенеза [9]. VEGFR-3 участвует в регуляции лимфангиогенеза в норме и при ряде заболеваний, вовлекается в регуляцию ангиогенеза исключительно в условиях опухолевого роста [8].

Для изучения ангиогенеза в опухолях также применяют избирательные иммуногистохимические маркеры эндотелиоцитов: CD31, CD34, CD105 и др. С их использованием оценивают плотность микрососудов. CD34 – молекула межклеточной адгезии, экспрессию которой отмечают на поверхности ряда клеток, включая не только зрелые эндотелиоциты, но и их клетки-предшественники [10]. Таким образом, использование CD34 позволяет установить как новообразованные сосуды, так и зрелые микрососуды опухоли. Обнаружены корреляции между показателями экспрессии CD34 и выживаемостью больных КА, а также клинико-морфологическими характеристиками КА [10,11].

В ряде работ изучен вопрос о взаимосвязанной роли рецепторов VEGFR и EGFR в клетках КА [12–14]. Показано, что эффекты VEGFR не ограничиваются лишь регуляцией неопластического ангиогенеза. Рецепторы VEGFR обладают также способностью к регуляции активности (запуску аутофосфорилирования) других тирозинкиназных рецепторов, включая EGFR, RTKs, cMET, следовательно, и к активации подчиненных сигнальных путей (АКТ-каскад). Таким образом, VEGFR вовлекаются в регуляцию пролиферации и дифференцировки, выживаемости клеток, а также реализации фенотипа, инвазивных свойств и миграции раковых клеток [12–14]. Исследований, посвященных изучению взаимодействия VEGF и CD34 в КА, в доступной научной литературе не найдено. Экспрессия CD34 и VEGFR в КА изучена в отдельных работах [15], однако аспекты взаимодействия данных молекул не рассматривали.

## Цель работы

Изучить особенности иммуногистохимической экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 на I, II, III, IV стадиях (pTNM) развития колоректальной аденокарциномы.

## Материалы и методы исследования

Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование операционного материала КРА 40 пациентов. На основании результатов патоморфологического исследования, учитывая действующую классификацию pTNM [16], сформированы 4 группы наблюдений, каждая из которых включает 10 случаев: I стадия ( $T_{1-2} N_0 M_0$ ), II стадия ( $T_{3-4} N_0 M_0$ ), III стадия ( $T_{1-4} N_{1-3} M_0$ ), IV стадия ( $T_{1-4} N_{1-3} M_1$ ). В качестве группы контроля использован секционный материал – 10 фрагментов стенки дистальной толстой кишки обычной гистологической структуры.

Кусочки операционного и секционного материала фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Особенности гистологического строения исследуемых образцов изучали в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. ИГХ-исследование проводили по стандартной методике, предусмотренной производителем антител. Использовали моноклональные антитела VEGF Ab-3 (Clone JH121; Thermo Scientific, USA), поликлональные антитела VEGFR-1 Ab-1 (Thermo Scientific, USA) и VEGFR2 Ab-1 (Thermo Scientific, USA), моноклональные антитела CD34 (Clone QBEnd/10; Thermo Scientific, USA), а также системы визуализации EnVision FLEX с диаминобензидином (DAKO, USA). Результаты ИГХ-исследования оценивали в микроскопе Axioplan-2 (Carl Zeiss, Germany) при увеличении  $\times 200$ . В каждом случае оценивали 5 полей зрения. Уровень экспрессии VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 оценивали методом фотоцифровой морфометрии в условных единицах оптической плотности (УЕОП) и градуировали следующим образом: 0–20 УЕОП – негативная реакция, 21–50 УЕОП – низкий уровень экспрессии, 51–100 УЕОП – умеренный уровень экспрессии, более 100 УЕОП – высокий уровень экспрессии. В срезах ткани КРА и неизменной слизистой оболочки толстой кишки, окрашенных с использованием антител к CD34, проводили подсчет плотности микрососудов по методу S. Bosari et al. [17].

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., лицензия № JPZ8041382130ARCN10-J). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ); сравнение между двумя группами наблюдений проводили при помощи критерия Манна–Уитни, между тремя и более группами наблюдений – при помощи критерия Краскела–Уоллиса; корреляционный анализ проведен с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

В результате ИГХ-исследования установлено, что мембранно-цитоплазматическая экспрессия VEGF-A обнаруживается в раковых клетках, клетках стромы и

в эндотелиоцитах сосудов КРА у 100 % исследованных больных, а в неизменной слизистой оболочке толстой кишки мембранно-цитоплазматическая экспрессия VEGF-A установлена в эндотелии микрососудов. КРА I стадии характеризуется низким уровнем экспрессии VEGF-A (37,80 (30,22; 56,89) УЕОП), а последующие стадии КРА – средним уровнем экспрессии маркера, медиана которого составляет 88,50 (63,00; 115,00) УЕОП для II стадии, 79,34 (63,14; 84,99) УЕОП для III стадии (рис. 1), 84,69 (80,66; 110,28) для IV стадии.

По результатам сравнительного анализа установлена достоверная разница между уровнями экспрессии VEGF-A на I и II стадиях КРА (37,80 (30,22; 56,89) vs 88,50 (63,00; 115,00) УЕОП,  $p < 0,05$ ). При сравнении данных, полученных для других групп наблюдения, а также группы контроля и I стадии КРА, достоверная разница не установлена ( $p > 0,05$ ) (рис. 2).

Мембранно-цитоплазматическая экспрессия VEGFR-1 установлена только в единичных клетках стромы КРА II, III и IV стадий. В неизменной слизистой оболочке толстой кишки и в КРА I стадии VEGFR-1-позитивные клетки не отмечены. У 40 % больных КРА II стадии установлен крайне низкий уровень экспрессии VEGFR-1 в опухоли, составляющий 19,58 (15,76; 23,02) УЕОП, расцененный как негативная ИГХ реакция. У 60 % больных КРА III и IV стадии экспрессия VEGFR-1 в опухоли составляет 23,15 (22,29; 30,02) УЕОП – для III стадии; 28,74 (15,64; 33,17) УЕОП – для IV стадии (рис. 3).

Достоверная разница между медианами экспрессии VEGFR-1 в этих стадиях КРА отсутствует ( $p > 0,05$ ) (рис. 4).

У 100 % больных КРА мембранно-цитоплазматическая экспрессия VEGFR-2 установлена в раковых клетках, а также в эндотелиоцитах сосудов опухоли. В неизменной слизистой оболочке толстой кишки мембранно-цитоплазматическая экспрессия VEGFR-2 отмечена преимущественно в эндотелиоцитах микрососудов. В I и II стадиях развития КРА характеризуется средними уровнями экспрессии VEGFR-2, составляющими в I стадии 52,75 (39,14; 70,22) УЕОП, во II стадии – 82,71 (63,14; 111,19) УЕОП. Установлена статистически значимая разница между экспрессией VEGFR-2 в I и II стадиях развития КРА (52,75 (39,14; 70,22) УЕОП vs 82,71 (63,14; 111,19) УЕОП,  $p < 0,05$ ), а также статистически значимая разница между экспрессией VEGFR-2 в КРА I стадии и в неизменной слизистой оболочке толстой кишки (52,75 (39,14; 70,22) УЕОП vs. 31,41 (25,21; 36,09) УЕОП,  $p < 0,05$ ) (рис. 6). В III стадии развития КРА характеризуется высоким уровнем экспрессии VEGFR-2 в опухоли, составляющим 104,17 (96,04; 111,02) УЕОП (рис. 5); в IV стадии развития КРА в опухоли отмечается статистически недостоверное ( $p > 0,05$ ) снижение экспрессии VEGFR-2 до среднего уровня – 99,91 (86,15; 120,29) УЕОП.

Мембранная экспрессия CD34 отмечена в эндотелиоцитах микрососудов неизменной слизистой оболочки толстой кишки и в ткани КРА 100 % больных, что позволяет производить подсчет плотности микрососудов. Результаты сравнительного анализа указывают, что в КРА I стадии показатели плотности микрососудов в опухоли, составляющие (91,50 (51,00; 111,00)), достоверно больше таковых в неизменной слизистой

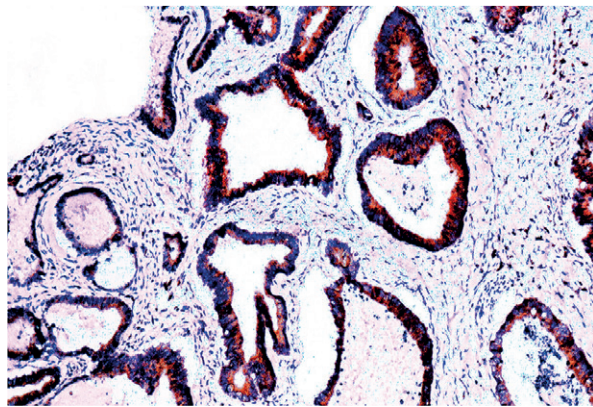


Рис. 1. Экспрессия VEGF-A в колоректальной аденокарциноме III стадии. VEGF Ab-3 (Clone JH121; Thermo Scientific, USA).  $\times 200$ .

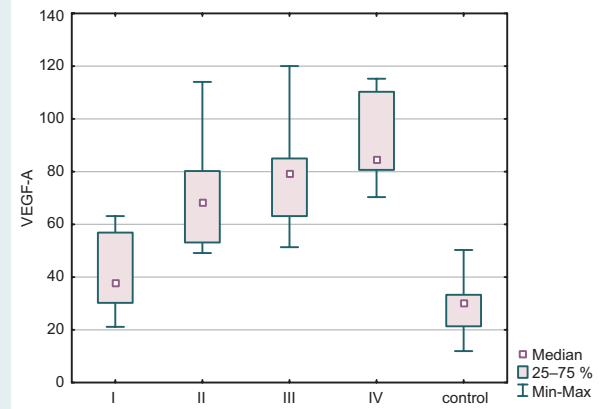


Рис. 2. Показатели уровня экспрессии VEGF-A в колоректальной аденокарциноме I, II, III, IV стадий (pTNM), а также в группе контроля.

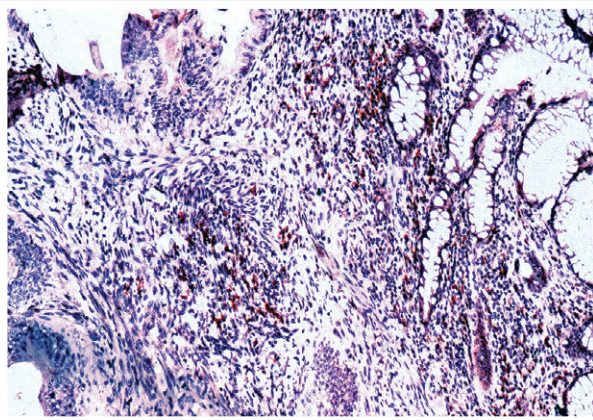


Рис. 3. Экспрессия VEGFR-1 в колоректальной аденокарциноме IV стадии. VEGFR-1 Ab-1 (Thermo Scientific, USA).  $\times 200$ .

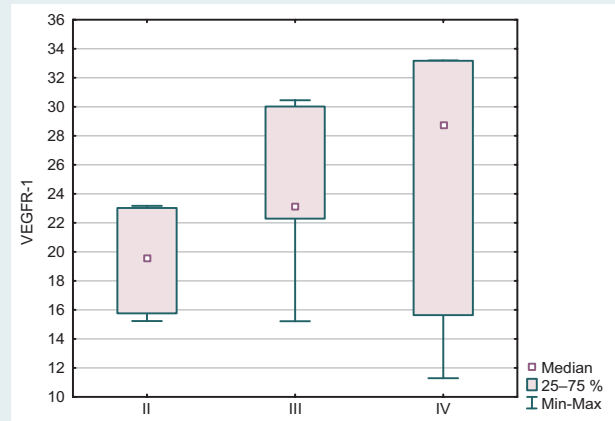


Рис. 4. Показатели уровня экспрессии VEGFR-1 в колоректальной аденокарциноме II, III и IV стадий (pTNM).

оболочке толстой кишки (32,00 (24,00; 38,00), ( $p < 0,05$ ) (рис. 8). Показатели плотности микрососудов в ткани КРА II стадии составляют 88,50 (63,00; 115,00) (рис. 7), в ткани КРА III стадии – 96,50 (72,00; 128,00), в ткани КРА IV стадии – 95,00 (80,00; 115,00). Разница между плотностью микрососудов в КРА на I, II, III и IV стадиях статистически не достоверна ( $p > 0,05$ ).

Проведен корреляционный анализ связей между показателями экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 в КРА I, II, III и IV стадий, результаты представлены в таблицах 1–5.

Установлено, что между показателями уровня экспрессии VEGF-A и VEGFR-2 в неизменной слизистой оболочке толстой кишки имеется прямая сильная корреляционная связь ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,05$ ). Взаимосвязи между другими исследованными маркерами в неизменной слизистой оболочке толстой кишки отсутствуют. Между показателями уровня экспрессии VEGF-A и VEGFR-2 в ткани КРА I, II и III стадий также характерно наличие прямых сильных и средней силы корреляций:  $r = 0,95$  для I стадии,  $r = 0,69$  для II стадии,  $r = 0,85$  для III стадии,  $p < 0,05$ . В ткани КРА III и IV стадий развития характерно наличие прямой сильной и средней силы корреляции между уровнем экспрессии VEGF-A и плотностью микрососудов, оцененной по экспрессии CD34:  $r = 0,70$  для III стадии,  $r = 0,69$  для IV стадии,  $p < 0,05$ .

Таблица 1. Корреляционные связи между показателями экспрессии VEGF-A, VEGFR-2 и CD34 в колоректальной аденокарциноме I стадии (pTNM)

|         | VEGF-A | VEGFR-2 | CD34 |
|---------|--------|---------|------|
| VEGF-A  | 1,00   | 0,95*   | 0,34 |
| VEGFR-2 | 0,95*  | 1,00    | 0,26 |
| CD34    | 0,34   | 0,26    | 1,00 |

\*: статистически значимая корреляционная связь ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Корреляционные связи между показателями экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 в колоректальной аденокарциноме II стадии (pTNM)

|         | VEGF-A | VEGFR-1 | VEGFR-2 | CD34  |
|---------|--------|---------|---------|-------|
| VEGF-A  | 1,00   | -0,40   | 0,69*   | -0,10 |
| VEGFR-1 | -0,40  | 1,00    | -1,00   | 0,31  |
| VEGFR-2 | 0,69*  | -1,00   | 1,00    | 0,27  |
| CD34    | -0,10  | 0,31    | -0,27   | 1,00  |

\*: статистически значимая корреляционная связь ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3. Корреляционные связи между показателями экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 в колоректальной аденокарциноме III стадии (pTNM)

|         | VEGF-A | VEGFR-1 | VEGFR-2 | CD34  |
|---------|--------|---------|---------|-------|
| VEGF-A  | 1,00   | 0,37    | 0,85*   | 0,70* |
| VEGFR-1 | 0,37   | 1,00    | 0,31    | 0,14  |
| VEGFR-2 | 0,85*  | 0,31    | 1,00    | 0,69* |
| CD34    | 0,70*  | 0,14    | 0,69*   | 1,00  |

\*: статистически значимая корреляционная связь ( $p < 0,05$ ).

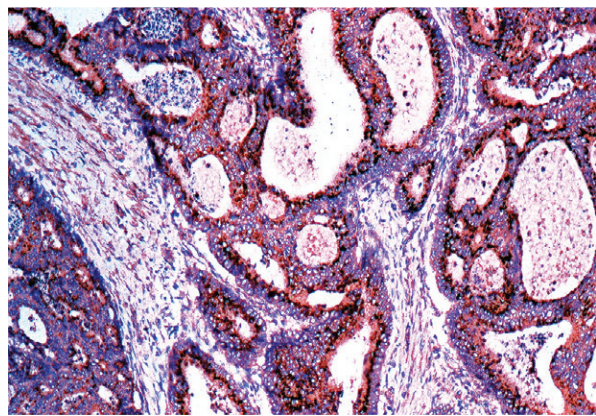


Рис. 5. Экспрессия VEGFR-2 в колоректальной аденокарциноме IV стадии. VEGFR2 Ab-1 (Thermo Scientific, USA).  $\times 200$ .

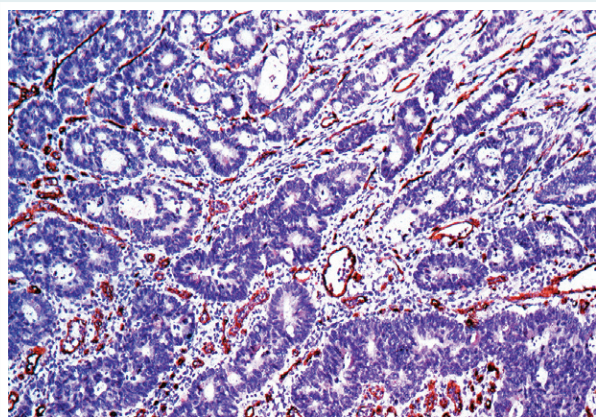


Рис. 7. Экспрессия CD34 в колоректальной аденокарциноме II стадии. CD34 (Clone QBEnd/10; Thermo Scientific, USA).  $\times 200$ .

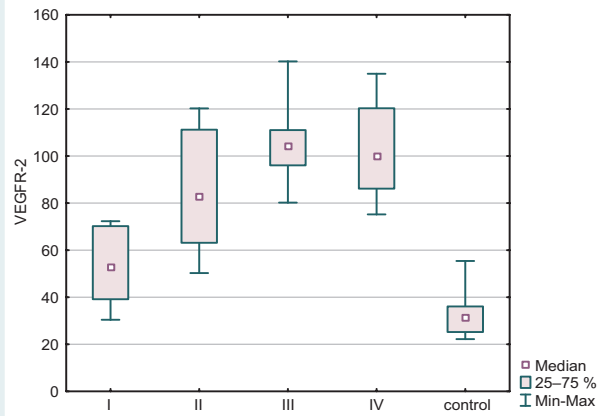


Рис. 6. Показатели уровня экспрессии VEGFR-2 в колоректальной аденокарциноме I, II, III, IV стадий (pTNM), а также в группе контроля.

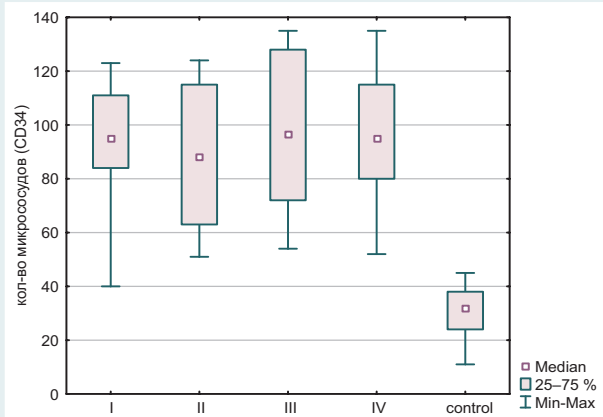


Рис. 8. Показатели плотности микрососудов, оцененной по экспрессии CD34, в колоректальной аденокарциноме I, II, III, IV стадий (pTNM), а также в группе контроля.

Таблица 4. Корреляционные связи между показателями экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 в колоректальной аденокарциноме IV стадии (pTNM)

|         | VEGF-A | VEGFR-1 | VEGFR-2 | CD34   |
|---------|--------|---------|---------|--------|
| VEGF-A  | 1,00   | 0,37    | 0,13    | -0,69* |
| VEGFR-1 | 0,37   | 1,00    | 0,77    | -0,08  |
| VEGFR-2 | 0,13   | 0,77    | 1,00    | 0,10   |
| CD34    | 0,69*  | -0,08   | 0,10    | 1,00   |

\*: статистически значимая корреляционная связь ( $p < 0,05$ ).

Таблица 5. Корреляционные связи между показателями экспрессии VEGF-A, VEGFR-2 и CD34 в неизменной слизистой оболочке толстой кишки

|         | VEGF-A | VEGFR-2 | CD34 |
|---------|--------|---------|------|
| VEGF-A  | 1,00   | 0,98*   | 0,30 |
| VEGFR-2 | 0,98*  | 1,00    | 0,38 |
| CD34    | 0,30   | 0,38    | 1,00 |

\*: статистически значимая корреляционная связь ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Согласно полученным данным, при прогрессии КРА от I к IV стадии есть тенденция к возрастанию в опухоли экспрессии основного проангиогенного фактора VEGF-A и его рецептора VEGFR-2 (рис. 2, 6). Установлено, что показатели экспрессии этих маркеров коррелируют в КРА I, II и III стадий (табл. 1–3). Основываясь

на результатах ИГХ-исследования нормальной слизистой оболочки толстой кишки в группе контроля и данных научной литературы, корреляция экспрессии VEGF-A и VEGFR-2 обусловлена механизмом, согласно которому именно рецепторы VEGFR-2 связывают молекулы VEGF-A, что обеспечивает формирование новых сосудов микроциркуляторного русла в физиологических условиях [8]. В специализированной литературе описана тенденция к возрастанию экспрессии этих маркеров при прогрессии КРА [5,8,9]. В работе Ch. Ding et al. (2016) показано, что метастатическая КРА характеризуется достоверно большей экспрессией VEGF-A в сравнении с неметастатической карциномой [12]. Однако по результатам проведенного нами исследования, максимальный «скачок» уровней экспрессии VEGF-A и VEGFR-2 отмечен при прогрессии КРА от I ко II стадии, что может быть обусловлено вовлечением молекулярных путей, которые обеспечивают реализацию инвазивного потенциала опухоли. Ранее проведено исследование транскрипционной активности гена K-RAS: обнаружен «скачок» относительной нормализованной экспрессии мРНК гена K-RAS при прогрессировании КРА от I ко II стадии: низкий уровень [0,42 (0,36; 0,43)] экспрессии мРНК гена K-RAS в I стадии и повышенный уровень [1,31 (1,09; 2,91)] экспрессии мРНК гена K-RAS во II

стадии, ( $p < 0,05$ ) [18]. Можно предположить, что активация неонгиогенеза при прогрессировании КРА от I ко II стадии опосредуется вовлечением сигнальных каскадов, связанных с RAS-протеином.

Опубликованы данные, что рецепторы VEGFR обладают способностью к регуляции активности других тирозинкиназных рецепторов, включая RTKs, EGFR, cMET [12–14]. Последние, в свою очередь, вовлекаются в MAPK/ERK-сигнальные пути, отвечающие за регуляцию выживаемости, пролиферации клеток, увеличение их подвижности, а также в PI3K/AKT/mTOR-сигнальный каскад, регулирующий преимущественно метаболизм и реализацию фенотипа клеток. RAS-протеин служит белком-трансдуктором, передающим сигналы с указанных рецепторов на внутриклеточные молекулы – звенья сигнальных каскадов [19]. Установлена ассоциация между транскрипционной активностью генов *VEGFA* и *CTNNB1* в эндометриодной аденокарциноме, отражающая взаимосвязь между активностью *VEGFA* и Wnt/ $\beta$ -катениновым каскадом [20]. На основе этих данных можно сделать вывод: при прогрессировании КРА от I ко II стадии в опухоли также активируется неонгиогенез. В настоящее время таргетная антиангиогенная терапия КРА показана лишь больным метастатической КРА [21]. Полученные данные указывают на необходимость рассмотрения вопроса об эффективности назначения таргетной антиангиогенной терапии на более ранних стадиях КРА.

Установлено, что экспрессия VEGFR-1 не выявляется в неизменной слизистой оболочке толстой кишки, а также в КРА I стадии развития. На последующих стадиях прогрессирования КРА экспрессию VEGFR-1 обнаруживают в клетках стромы опухоли со статистически недостоверной тенденцией к ее нарастанию на II, III и IV стадиях прогрессирования аденокарциномы. Не установлена также корреляция между показателями экспрессии в ткани КРА VEGFR-1 и таких маркеров, как VEGF-A, VEGFR-2 и CD34. Данные научной литературы о значимости экспрессии VEGFR-1 в КРА противоречивы. Несмотря на то, что в физиологических условиях VEGFR-1 выполняет антиангиогенную функцию, повышение его экспрессии в раке ассоциируют с активацией неонгиогенеза [9]. В работе M. H. Wu et al. (2014) показано, что экспрессия VEGFR-1 ассоциируется с дефектами слоя перicyтов и клеток адвентициального слоя, сопровождающимися повышенной проницаемостью сосудов незрелого новообразованного микроциркуляторного русла. Это создает условия для промоции метастазирования, что подтверждает ассоциация более высоких уровней экспрессии VEGFR-1 с метастатической стадией опухоли [22]. В работах M. Capavese et al. (2016), N. D'Haene et al. (2018) показаны преимущественно низкие уровни экспрессии VEGFR-1. Сделан вывод, что VEGFR-1 служит маркером неблагоприятного прогноза для пациентов с диагнозом КРА [8,9]. По данным M. Eppenberger et al. (2010), VEGFR-1 характеризуется низким уровнем экспрессии в КРА, но является маркером благоприятного прогноза [23].

Показано, что плотность микрососудов, оцененная по экспрессии CD34, достоверно более высокая в КРА, чем в неизменной слизистой оболочке толстой кишки. На каждой из дальнейших стадий прогрессирования аденокарциномы плотность микрососудов в опухоли

статистически достоверно не увеличивается. Также показано наличие прямых корреляций между плотностью микрососудов и экспрессией VEGF-A и VEGFR-2 в КРА III стадии, плотностью микрососудов и экспрессией VEGF-A в КРА IV стадии. По данным S. C. Toma et al. (2018) плотность микрососудов, оцененная по экспрессии CD34, значимо выше в группе метастатических карцином в сравнении с неметастатическими. Установлена зависимость между уровнем ИГХ-экспрессии CD34 и уровнем экспрессии гена *CD34*, указывающая на наличие «поломки» на уровне кодирующего гена [11]. Y. Kimura et al. (2016) установили, что плотность микрососудов, оцененная по экспрессии CD34, значимо выше в метастатической стадии КРА (стадии D по классификации Duke's) и в КРА с высоким уровнем экспрессии VEGF-A, а сочетание высоких показателей экспрессии CD34 и VEGF-A ассоциируется со снижением показателей выживаемости больных КРА [15].

## Выводы

1. При прогрессировании колоректальной аденокарциномы от I к IV стадии в опухоли отмечается тенденция к возрастанию экспрессии VEGF-A и VEGFR-2, при этом максимальный «скачок» уровней их экспрессии отмечен при прогрессировании аденокарциномы от I ко II стадии, что может быть связано с аномально возрастающей активностью *KRAS*.

2. Экспрессия VEGFR-1 избирательно характеризует II, III и IV стадии колоректальной аденокарциномы и не ассоциируется с экспрессией в опухоли VEGF-A, VEGFR-2 и CD34.

3. Плотность микрососудов, оцененная по экспрессии CD34, достоверно не отличается на каждой из стадий прогрессирования колоректальной аденокарциномы, однако прямо коррелирует с показателями экспрессии VEGF-A и VEGFR-2.

**Перспективы дальнейших исследований.** Изучение других механизмов, задействованных в прогрессии колоректальной аденокарциномы при переходе ее с неметастатической на метастатическую стадию развития.

## Финансирование

Исследование проведено в рамках НИР Запорожского государственного медицинского университета «Раннее молекулярно-генетическое и иммуногистохимическое прогнозирование склонности к прогрессии рака легких и органов пищеварения» № госрегистрации 0117U002580 (2017–2019).

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of interest:** author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 10.04.2019

Після доопрацювання / Revised: 23.04.2019

Прийнято до друку / Accepted: 13.05.2019

## Сведения об авторе:

Шишкин М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

## Відомості про автора:

Шишкін М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Information about author:

Shyshkin M. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Список литературы

- [1] Molecular mechanisms of liver metastasis / K. Kawada et al. *International Journal of Clinical Oncology*. 2011. Vol. 16. Issue 5. P. 464–472. doi: 10.1007/s10147-011-0307-2
- [2] Outcome and prognostic factors in 593 non-metastatic rectal cancer patients: a mono-institutional survey / J. Langrand-Escure, et al. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. Issue 1. P. 10708. doi: 10.1038/s41598-018-29040-2
- [3] Sun W. Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2012. Vol. 5. P. 63. doi: 10.1186/1756-8722-5-63
- [4] VEGFR2 regulates endothelial differentiation of colon cancer cells / Z. Liu et al. *BMC Cancer*. 2017. Vol. 17. Issue 1. P. 593. doi: 10.1186/s12885-017-3578-9
- [5] Differences in Expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Microvessel Density in Colorectal Cancer with Liver Metastasis / E. H. Jeong et al. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2010. Vol. 44. Issue 6. P. 571–580. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2010.44.6.571
- [6] Simultaneous Inhibition of EGFR/VEGFR and Cyclooxygenase-2 Targets Stemness-Related Pathways in Colorectal Cancer Cells / A. Valverde et al. *PLoS One*. 2015. Vol. 10. Issue 6. e0131363. doi: 10.1371/journal.pone.0131363
- [7] Bevacizumab with or without erlotinib as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer (gercor dream; optiox3): A randomised, open-label, phase 3 trial / C. Tournigand et al. *Lancet Oncology*. 2015. Vol. 6. Issue 15. P. 1493–1505. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00216-8
- [8] Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer / M. Canavese et al. *International Journal of Cancer*. 2017. Vol. 140. Issue 10. P. 2183–2191. doi: 10.1002/ijc.30567
- [9] The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer / N. D'Haene et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19. Issue 11. P. 3536. doi: 10.3390/ijms19113536
- [10] Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma / I. C. Deliu et al. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2016. Vol. 57. Issue 3. P. 1025–1030.
- [11] Correlations between CD34 Immunolabelled Blood Vessels and CD34 mRNA Expression in Colorectal Cancer / S. C. Toma et al. *Current Health Sciences Journal*. 2018. Vol. 44. Issue 1. P. 60–63. doi: 10.12865/CHSJ.44.01.10
- [12] Combined application of anti-VEGF and anti-EGFR attenuates the growth and angiogenesis of colorectal cancer mainly through suppressing AKT and ERK signaling in mice model / C. Ding et al. *BMC Cancer*. 2016. Vol. 16. Issue 1. P. 791. doi: 10.1186/s12885-016-2834-8
- [13] Intracrine VEGF signaling mediates the activity of pro-survival pathways in human colorectal cancer cells / R. Bhattacharya et al. *Cancer Research*. 2016. Vol. 76. Issue 10. P. 3014–3024. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1605
- [14] Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells / S. Samuel et al. *Oncogene*. 2011. Vol. 30. Issue 10. P. 1205–1212. doi: 10.1038/ncr.2010.496
- [15] Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer / Y. Kimura et al. *Molecular Medicine Reports*. 2016. Vol. 13. Issue 2. P. 1551–1557. doi: 10.3892/mmr.2015.4687
- [16] Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours*. New York: Wiley-Blackwell, 2009. 50 p.
- [17] Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma / S. Bosari et al. *Human Pathology*. 1992. Vol. 23. P. 755–761. doi: 10.1016/0046-8177(92)90344-3
- [18] Шишкін М. А. Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2018. Т. 15. №1. С. 49–56. doi: 10.14739/2310-1237.2018.1.129447
- [19] K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas / N. Margetis et al. *In vivo*. 2017. Vol. 31. Issue 4. P. 527–542. doi: 10.21873/in vivo.11091
- [20] Tumanskiy V.A., Chepets A.V., Kamyshnyi A.M. Comparative characteristics of the transcriptional activity of CDH1, CTNNB1, VEGFA genes and expression of proteins E-cadherin,  $\beta$ -catenin and VEGFA, coded by these genes in metastatic and non-metastatic endometrioid endometrial carcinoma. *Патологія*. 2016. №2(37). P. 13–18. doi: 10.14739/2310-1237.2016.2.81328
- [21] Mody K., Baldeo C., Bekaii-Saab T. Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Journal*. 2018. Vol. 24. Issue 4. P. 165–170. doi: 10.1097/PPO.0000000000000328
- [22] Galectin-1 induces vascular permeability through the neuropilin-1/vascular endothelial growth factor receptor-1 complex / M. H. Wu et al. *Angiogenesis*. 2014. Vol. 17. P. 839–849. doi: 10.1007/s10456-014-9431-8
- [23] Role of the VEGF ligand to receptor ratio in the progression of mismatch repair-proficient colorectal cancer / M. Eppenberger et al. *BMC Cancer*. 2010. Vol. 10. P. 93. doi: 10.1186/1471-2407-10-93

## References

- [1] Kawada, K., Hasegawa, S., Murakami, T., Itatani, Y., Hosogi, H., Sonoshita, M., et al. (2011) Molecular mechanisms of liver metastasis. *International Journal of Clinical Oncology*, 16(5), 464–472. doi: 10.1007/s10147-011-0307-2
- [2] Langrand-Escure, J., Diao, P., Garcia, M.-A., Wang, G., Guy, J.-B., Espinel, S., et al. (2018) Outcome and prognostic factors in 593 non-metastatic rectal cancer patients: a mono-institutional survey. *Scientific Reports*, 8(1), 10708. doi: 10.1038/s41598-018-29040-2
- [3] Sun, W. (2012) Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 5, 63. doi: 10.1186/1756-8722-5-63
- [4] Liu, Z., Qi, L., Li, Y., Zhao, X., & Sun, B. (2017) VEGFR2 regulates endothelial differentiation of colon cancer cells. *BMC Cancer*, 17(1), 593. doi: 10.1186/s12885-017-3578-9
- [5] Jeong, E. H., Kim, Y., Min, B. W., Lee, K. H., Kim, H. S., & Lee, J. H. (2010) Differences in Expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Microvessel Density in Colorectal Cancer with Liver Metastasis. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 44(6), 571–580. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2010.44.6.571
- [6] Valverde, A., Penarando, J., Canas, A., Lopez-Sanchez, L. M., Conde, F., Hernandez, V., et al. (2015) Simultaneous Inhibition of EGFR/VEGFR and Cyclooxygenase-2 Targets Stemness-Related Pathways in Colorectal Cancer Cells. *PLoS One*, 10(6), e0131363. doi: 10.1371/journal.pone.0131363
- [7] Tournigand, C., Chibaudel, B., Samson, B., Scheithauer, W., Vernerey, D., Mesange P., et al. (2015) Bevacizumab with or without erlotinib as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer (gercor dream; optiox3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 16(15), 1493–505. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00216-8
- [8] Canavese, M., Ngo, D. T., Maddern, G. J., Hardingham, J. E., Price, T. J., & Hauben, E. (2017) Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 140(10), 2183–2191. doi: 10.1002/ijc.30567
- [9] D'Haene, N., Koopmansch, C., Van Eycke, Y.-R., Hulet, F., Allard, J., Bouiri, S., et al. (2018) The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3536. doi: 10.3390/ijms19113536
- [10] Deliu, I. C., Neagoe, C. D., Bezna, M., Genunche-Dumitrescu, A. V., Toma, S. C., Ungureanu, B. S., et al. (2016) Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 57(3), 1025–1030.
- [11] Toma, S. C., Usatu, C. D., Ungureanu, B. S., Mirea, C. S., Dumitrescu, T., Georgescu, E. F., et al. (2018) Correlations between CD34 Immunolabelled Blood Vessels and CD34 mRNA Expression in Colorectal Cancer. *Current Health Sciences Journal*, 44(1), 60–63. doi: 10.12865/CHSJ.44.01.10
- [12] Ding, C., Li, L., Yang, T., Fan, X., & Wu, G. (2016) Combined application of anti-VEGF and anti-EGFR attenuates the growth and angiogenesis of colorectal cancer mainly through suppressing AKT and ERK signaling in mice model. *BMC Cancer*, 16(1), 791. doi: 10.1186/s12885-016-2834-8
- [13] Bhattacharya, R., Ye, X. C., Wang, R., Ling, X., McManus, M., Fan, F., Boubles, D., & Ellis, L. M. (2016) Intracrine VEGF signaling mediates the activity of pro-survival pathways in human colorectal cancer cells. *Cancer Research*, 76(10), 3014–3024. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1605
- [14] Samuel, S., Fan, F., Dang, L. H., Xia, L., Gaur, P., & Ellis, L. M. (2011) Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 30(10), 1205–1212. doi: 10.1038/onc.2010.496
- [15] Kimura, Y., Morohashi, S., Yoshizawa, T., Suzuki, T., Morohashi, H., Sakamoto, Y., et al. (2016) Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 13(2), 1551–1557. doi: 10.3892/mmr.2015.4687
- [16] Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009) *International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours*. New York: Wiley-Blackwell.
- [17] Bosari, S., Lee, A. K., DeLellis, R. A., Wiley, B. D., Heatley, G. J., & Silverman, M. L. (1992) Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*, 23(7), 755–61. doi: 10.1016/0046-8177(92)90344-3
- [18] Shyshkin, M. A. (2018) Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы [Molecular-immunohistochemical characteristics of proliferation and apoptosis of tumor cells in colorectal adenocarcinoma]. *Pathologia*, 15(1), 49–56. doi: 10.14739/2310-1237.2018.1.129447
- [19] Margetis, N., Kouloukoussa, M., Pavlou, K., Vrakas, S., & Mariolis-Sapsakos, T. (2017) K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. *In vivo*, 31(4), 527–542. doi: 10.21873/in vivo.11091
- [20] Tumanskiy, V. A., Chepets, A. V., & Kamyshnyi, A. M. (2016) Comparative characteristics of the transcriptional activity of CDH1, CTNNB1, VEGFA genes and expression of proteins E-cadherin,  $\beta$ -catenin and VEGFA, coded by these genes in metastatic and non-metastatic endometrioid endometrial carcinoma. *Pathologia*, 2(37), 13–18. doi: 10.14739/2310-1237.2016.2.81328
- [21] Mody, K., Baldeo, C., & Bekaii-Saab, T. (2018) Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Journal*, 24(4), 165–170. doi: 10.1097/PPO.0000000000000328
- [22] Wu, M. H., Ying, N. W., Hong, T. M., Chiang, W. F., Lin, Y. T., & Chen, Y. L. (2014) Galectin-1 induces vascular permeability through the neuropilin-1/vascular endothelial growth factor receptor-1 complex. *Angiogenesis*, 17(4), 839–849. doi: 10.1007/s10456-014-9431-8
- [23] Eppenberger, M., Zlobec, I., Baumhoer, D., Terracciano, L., & Lugli, A. (2010) Role of the VEGF ligand to receptor ratio in the progression of mismatch repair-proficient colorectal cancer. *BMC Cancer*, 10, 93. doi: 10.1186/1471-2407-10-93