

ЗНАЧЕНИЕ HIF-1A, VEGF-A И INOS В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

М. С. Иоскевич (mari.ioskevich.98@mail.ru), Т. Т. Штабинская (shtabik@list.ru),
В. А. Басинский (basinsk@gmail.com)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Метаболический стресс, сопровождающий развитие опухолевой ткани, вызывает гиперэкспрессию в раковых клетках фактора индуцируемого гипоксией (HIF 1 α), что ведет к увеличению экспрессии проангиогенных факторов: фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и синтазы оксида азота (NOS), однако данные о прогностической роли комплексной оценки экспрессии маркеров в колоректальных тубулярных аденомах отсутствуют.

Цель исследования – определить значение экспрессии HIF 1 α , VEGF и iNOS в канцерогенезе толстой кишки.

Материалы и методы. В исследование были включены 30 тубулярных аденом, 33 низко злокачественные аденокарциномы толстой кишки. Иммуногистохимическое исследование выполнено с использованием антител к HIF 1 α , VEGF и iNOS. Экспрессия маркеров оценивалась количественно при помощи компьютерной программы Aperio Image Scope_v9.1.19.1567. Статистический анализ проводили с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q) и MedCalc (Version 10).

Результаты. Ключевым фактором трансформации тубулярной аденомы с дисплазией высокой степени в низко злокачественную аденокарциному является высокий уровень HIF 1 α (>0,391) (чувствительность 100%, специфичность 100%). Малигнизацию тубулярной аденомы с дисплазией низкой степени можно ожидать при уровнях VEGF >0,884 (чувствительность 89,3%, специфичность 80%) и iNOS \leq 0,89 (чувствительность 84,8%, специфичность 80%).

Заключение. Развитие низко злокачественной аденокарциномы у пациентов с тубулярной аденомой с дисплазией разной степени можно прогнозировать по уровням VEGF, iNOS и HIF 1 α .

Ключевые слова: тубулярная аденома, низко злокачественная аденокарцинома толстой кишки, HIF 1 α , VEGF, iNOS.

Для цитирования: Иоскевич, М. С. Значение HIF-1 α , VEGF-A и INOS в канцерогенезе толстой кишки / М. С. Иоскевич, Т. Т. Штабинская, В. А. Басинский // Гепатология и Гастроэнтерология. 2019. Т. 3, № 1. С. 81-86. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-81-86>

THE SIGNIFICANCE OF HIF-1A, VEGF-A AND INOS IN COLON CARCINOGENESIS

M. S. Ioskevich, T. T. Shtabinskaya, V. A. Basinsky
Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belas

Background. Metabolic stress accompanying the development of tumor tissue causes overexpression of hypoxia induced factor (HIF 1 α) in cancer cells. This leads to an increase of proangiogenic factors: vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide synthase (NOS). However, data on the prognostic role of a comprehensive assessment of the expression of markers in colorectal tubular adenomas are absent.

Objective of the study is to determine the significance of HIF1 α , VEGF and iNOS expression in colon carcinogenesis.

Materials and methods. The study included 30 colon tubular adenomas, 33 low-grade adenocarcinomas. Immunohistochemistry was performed using antibodies to HIF 1 α , VEGF and iNOS. Marker expression was quantified using the Aperio Image Scope_v9.1.19.1567 computer program. Statistical analysis was performed using STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q) and MedCalc (Version 10).

Results. A key factor in the transformation of tubular adenoma with a high degree of dysplasia into low-grade adenocarcinoma is a high level of HIF1 α (> 0.391) (sensitivity 100%, specificity 100%). Malignancy of tubular adenoma with low-grade dysplasia can be expected at VEGF levels > 0.884 (sensitivity 89.3%, specificity 80%) and iNOS \leq 0.89 (sensitivity 84.8%, specificity 80%).

Conclusion. Low-grade adenocarcinoma development in patients with tubular adenoma with dysplasia of different degrees can be predicted by the levels of VEGF, iNOS and HIF 1 α .

Keywords: tubular adenoma, low-grade colon adenocarcinoma, HIF 1 α , VEGF, iNOS.

For citation: Ioskevich MS, Shtabinskaya TT, Basinsky VA. Significance of HIF-1 α , VEGF-A and iNOS in colon carcinogenesis. *Hepatology and Gastroenterology*. 2019;3(1):81-86. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-81-86>

Введение

Канцерогенез – сложный процесс, в который вовлечен ряд генетических, а также эпигенетических факторов. Они позволяют раковым клеткам приобретать новые функции, которые отличают их от нормальных клеток. Раковые клетки становятся устойчивыми к ингибиторам роста, пролиферируют в отсутствие экзогенных факторов роста, ингибируют процесс апоптоза, приобретают неограниченный потенциал репликации посредством активации теломеразы, имеют аномальный ангиогенез, характеризуются инвазивностью и способностью создавать метастазы.

По данным ряда авторов, от 75 до 90% опухолей толстой кишки развивается в результате соматических мутаций генов, которые приводят к пролиферации железистого эпителия и трансформации аденомы в злокачественную опухоль [1]. Чаще всего малигнизируются тубулярные (ТА) и ворсинчатые аденомы. На процесс злокачественной трансформации иногда требуется от 5 до 10 лет [1, 2].

Микросреда [3] оказывает существенное влияние на злокачественность и метастазирование опухолевых клеток, особенно в условиях гипоксии. В нормальной ткани концентрация кислорода составляет около 7% (53 мм рт. ст.), в то время как в раковой ткани она колеблется от 1% до 7% [4]. Низкое количество кислорода в опухолевой ткани способствует стабилизации белка HIF 1 α (фактор, индуцируемый гипоксией), который стимулирует эндотелиальные клетки мигрировать в развивающуюся опухоль и создавать новые кровеносные сосуды. Эти сосуды создаются хаотично, препятствуя правильному снабжению клеток кислородом и питательными веществами [5], являясь причиной усиления гипоксии.

HIF 1 α стимулирует также экспрессию синтазы оксида азота (NOS), которая, участвуя в метаболизме аргинина, освобождает оксид азота, обладающий сосудорасширяющим свойством, а также способна увеличить выработку фактора

роста эндотелия сосудов (VEGF). Это дополнительно увеличивает проницаемость сосудов, что способствует перераспределению межклеточных белков адгезии и экстравазации белков плазмы, в том числе фибриногена. Высокий уровень факторов, индуцируемых гипоксией, наблюдается примерно в 53% всех видов рака [6], в том числе и в толстой кишке [7, 8], однако в литературе нет данных о значении комплекса описанных выше маркеров в трансформации ТА в рак толстой кишки.

Цель исследования – определить значение экспрессии HIF 1 α , VEGF-A и iNOS в канцерогенезе толстой кишки.

Материалы и методы

Критерии включения в исследование: опухоли, имеющие гистологическое строение ТА и низко злокачественной аденокарциномы (НЗА) толстой кишки без гематогенных метастазов.

Критерии исключения из исследования: тубуловиллезные и виллезные аденомы, ТА более 1 см в диаметре, первично-множественные раки, высоко злокачественные аденокарциномы и новообразования, имеющие гистологическое строение слизистой, микропапиллярной аденокарциномы, крибриформной комедо-карциномы, перстневидноклеточного, плоскоклеточного и недифференцированного рака.

Клинические данные получены из историй болезни, амбулаторных карт, регистра пациентов Гродненского областного онкологического диспансера.

В исследование были включены 30 ТА (группа 1) с дисплазией низкой (ТА ДН) и высокой (ТА ДВ) степени, 33 НЗА толстой кишки (группа 2) и 14 фрагментов слизистой толстой кишки без патологических изменений (группа 0). Клинико-морфологическая характеристика материала отображена в таблице 1.

Иммуногистохимическое исследование выполнено на серийных парафиновых срезах тка-

Таблица 1. – Клинико-морфологическая характеристика случаев тубулярной аденомы и низко злокачественной аденокарциномы толстой кишки

Клинико-морфологический показатель		Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=33)
Медиана возраста		66,21 (57,056-77,58)	63,12 (56,71-67,58)
Пол	мужской	11 (36,7%)	13 (39,4%)
	женский	19 (63,3%)	20 (60,6%)
Локализация опухоли	сигмовидная кишка	16 (53,3%)	8 (24,2%)
	прямая кишка	14 (46,7%)	25 (75,8%)
Дисплазия	высокая	15 (50%)	-
	низкая	15 (50%)	-
Дифференцировка	высокая	-	17 (51,5%)
	умеренная	-	16 (48,5%)

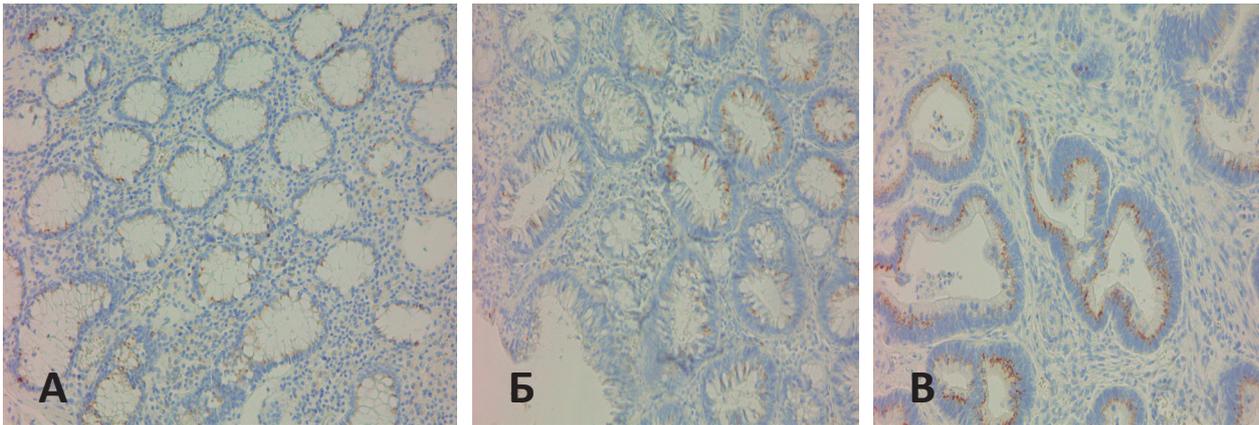


Рисунок 1. – Экспрессия HIF 1α в нормальной слизистой (А), аденоме (Б) и низко злокачественной аденокарциноме (В) толстой кишки. Окраска с использованием антител к HIF 1α. Ув. ×200

Результаты и обсуждение

ни опухолей с использованием мышиных моноклональных антител к HIF 1α (MA5382, клон H1α67), VEGF (ab1316, клон VG-1) и кроличьего поликлонального антитела к iNOS (ab15323) по стандартной методике. Метод количественной оценки результатов описан в статье, опубликованной ранее [9]. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q) и MedCalc (Version 10). В связи с тем, что распределение количественных параметров отличалось от нормального ($p < 0,05$), анализ провели с применением методов непараметрической статистики. При представлении числовых значений использована медиана, 25-75-й процентиля: Me (Q25%-Q75%).

Результаты нашего исследования показали, что HIF 1α экспрессируется преимущественно в цитоплазме эпителиальных клеток и в меньшей степени – в клетках стромы (рис. 1). В нормальной слизистой толстой кишки уровень HIF 1α ниже, чем в ТА и НЗА, что также отмечают в своих исследованиях многие другие ученые [8]. Однако значимыми оказались различия между экспрессией в ТА ДВ и НЗА (рис. 2).

Уровень общей позитивности VEGF в ТА и НЗА достоверно выше, чем в нормальной слизистой, что не противоречит результатам, полученным другими учеными [7] (рис. 3). При этом в ТА ДН преобладала стромальная экспрессия, а в ТА ДВ и НЗА – в цитоплазме клеток опухоли.

Общий уровень VEGF в ТА ДН значимо ниже, чем в ТА ДВ ($p = 0,007$) и нормальной слизистой толстой кишки ($p = 0,04$), в то же время достоверных различий между ТА ДВ и НЗА не обнаружено ($p = 0,5$) (рис. 4). В изучаемом пути канцерогенеза (нормальная слизистая – ТА ДН – ТА ДВ – НЗА) экспрессия iNOS достоверно снижается (рис. 5).

Уровень общей позитивности iNOS в ТА ДН значимо ниже, чем в нормальной слизистой толстой кишки ($p = 0,03$), и значимо выше, чем в ТА ДВ ($p = 0,02$) (рис. 6). Выявлена тенденция к достоверной связи низкой экспрессии iNOS в НЗА по сравнению с ТА ДВ ($p = 0,06$).

ROC-анализ позволил определить точки разделения для прогнозирования развития НЗА в зависимости от экспрессии VEGF и iNOS в ТА ДН (рис. 7). Площадь под ROC-кривой равняется $0,860 \pm 0,06$ (достоверность различия с площадью под диагональю равна $< 0,0001$). Наиболее оптимальное соотноше-

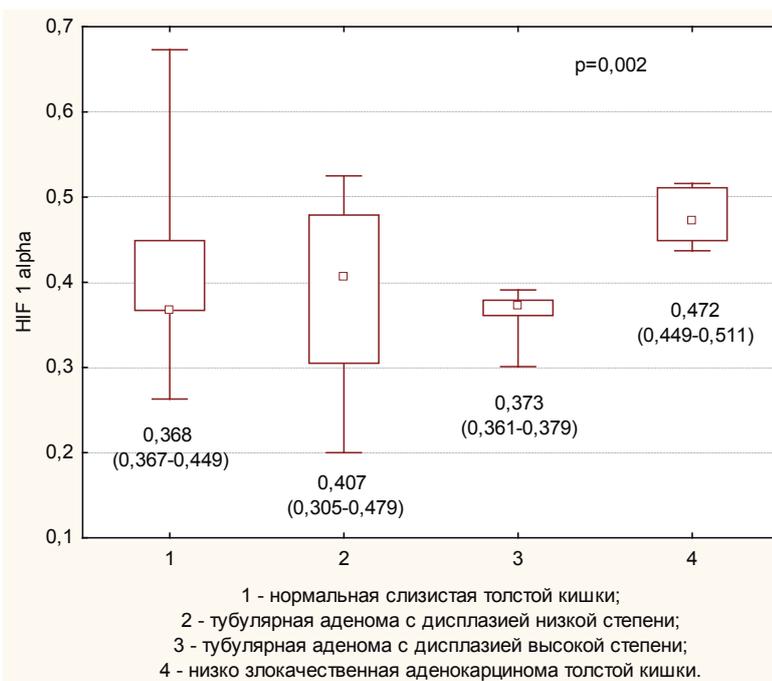


Рисунок 2. – Уровни общей позитивности HIF 1α в нормальной слизистой, аденоме с дисплазией низкой и высокой степени и низко злокачественной аденокарциноме толстой кишки

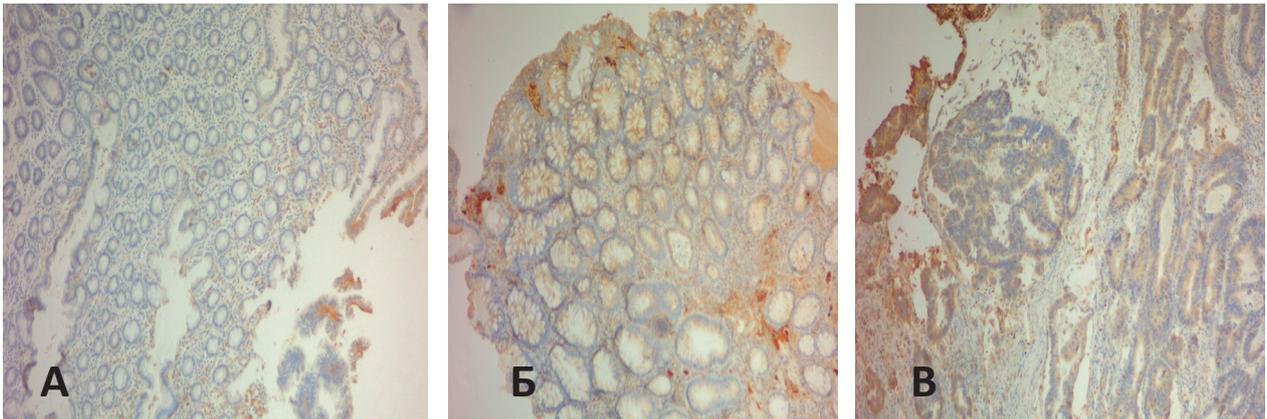


Рисунок 3. – Экспрессия VEGF в нормальной слизистой (А), аденоме (Б) и низко злокачественной аденокарциноме (В) толстой кишки. Окраска с использованием антител к VEGF. Ув. $\times 100$

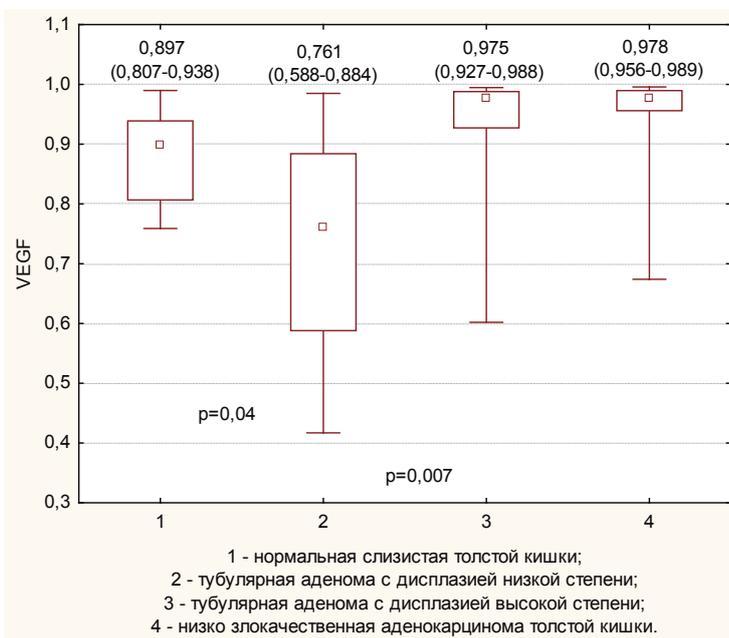


Рисунок 4. – Уровни общей позитивности VEGF в нормальной слизистой, аденоме с дисплазией разной степени и низко злокачественной аденокарциноме толстой кишки

ние чувствительности и специфичности на ROC-кривой соответствует уровню экспрессии VEGF в ТА ДН, равному 0,884 (чувствительность – 89,3%, специфичность – 80%).

Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности на ROC-кривой соответствует уровню экспрессии iNOS в ТА ДН, равному 0,89 (чувствительность – 84,8%, специфичность – 80%). Площадь под ROC-кривой равняется $0,856 \pm 0,05$ (достоверность различия с площадью под диагональю равна $< 0,0001$).

При построении математической модели прогнозирования исхода заболевания (дискриминантной функции) прямым пошаговым методом у пациентов с ТА ДН установлено, что достоверно влияют на развитие НЗА только VEGF и iNOS.

Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования

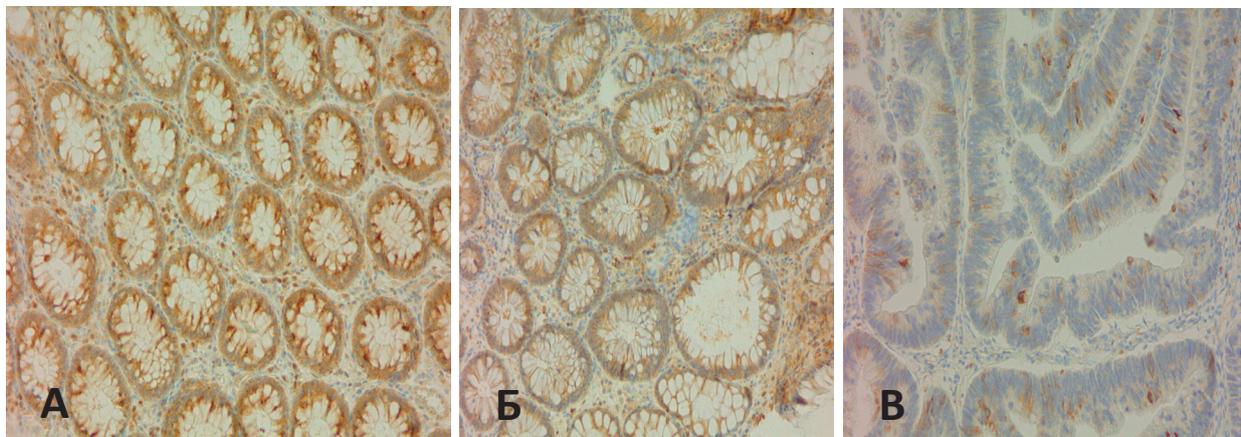


Рисунок 5. – Экспрессия iNOS в нормальной слизистой (А), аденоме (Б) и низко злокачественной аденокарциноме (В) толстой кишки. Окраска с использованием антител к iNOS. Ув. $\times 200$

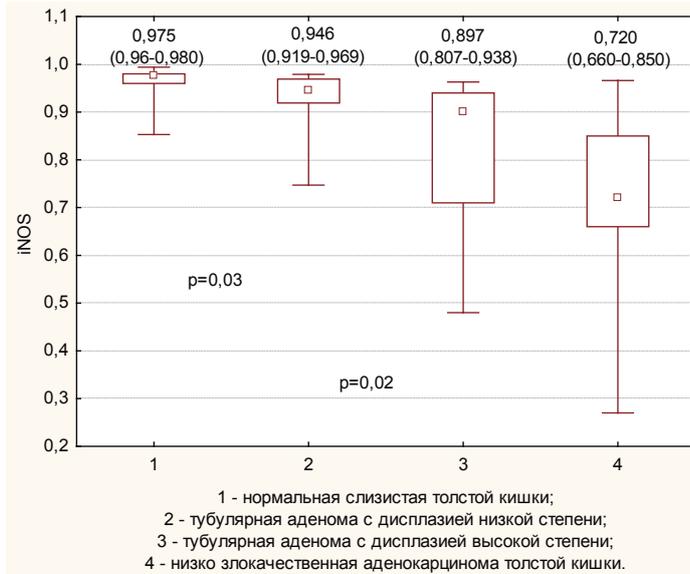


Рисунок 6. – Уровни общей позитивности iNOS в нормальной слизистой, аденоме с дисплазией разной степени и низко злокачественной аденокарциноме толстой кишки

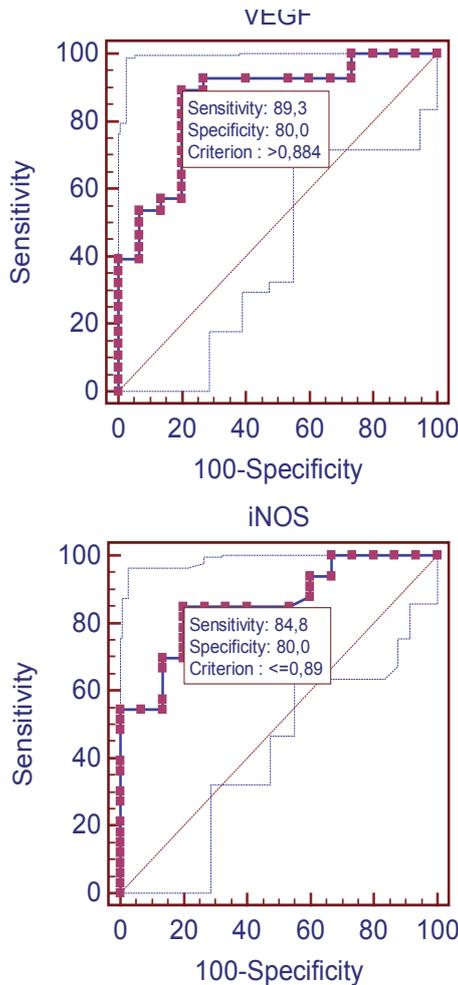


Рисунок 7. – Соотношение чувствительности и специфичности при прогнозировании развития низко злокачественной аденокарциномы в зависимости от уровней VEGF (А) и iNOS (Б) в тубулярной аденоме с дисплазией низкой степени

трехлетней СБВ, представлена в таблице 2.

Таблица 2. – Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования развития НЗА

Переменные	Лямбда Уилкса	F-исключить	p
VEGF	0,681	16,87	0,0001
iNOS	0,626	12,27	0,001

Классификационная функция, полученная с использованием указанных переменных, представлена в таблице 3, классификационная матрица – в таблице 4.

Таблица 3. – Функция классификации для прогнозирования развития НЗА

Переменные	Коэффициенты Y
VEGF	66,8841
iNOS	34,2488
Константа	-44,3676

Таблица 4. – Классификационная матрица, полученная в результате применения классификационной функции для прогноза развития НЗА

	Доля правильных прогнозов	Неблагоприятный исход (прогнозируемое состояние) (случаев)	Благоприятный исход (прогнозируемое состояние) (случаев)
Неблагоприятный исход (наблюдаемое состояние)	89,3%	25	3
Благоприятный исход (наблюдаемое состояние)	73,3%	4	11
Всего	83,7%	29	14

Анализ классификационной матрицы, значение лямбды Уилкса, равное 0,48, значение F-критерия, равного 21,74 при $p < 0,0001$, позволяет сделать вывод, что данная классификация является корректной. Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 89,3%, специфичность – 73,3%. Общая прогностическая значимость 83,7%.

$$y = -44,3676 + 66,8841m_1 + 34,2488m_2,$$

где m_1 – уровень VEGF;
 m_2 – уровень iNOS.

Если $y > 0$, прогнозируют высокий риск развития НЗА в ТА ДН.

ROC-анализ позволил определить точку разделения для прогнозирования развития НЗА в ТА ДВ в зависимости от экспрессии HIF 1 α (рис. 8). Площадь под ROC-кривой равняется $1,0 \pm 0,00$ (достоверность различия с площадью под диагональю равна $< 0,0001$). Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности на ROC-кривой соответствует уровню экспрессии HIF 1 α в ТА ДВ, равному 0,391 (чувствительность – 100%, специфичность – 100%).

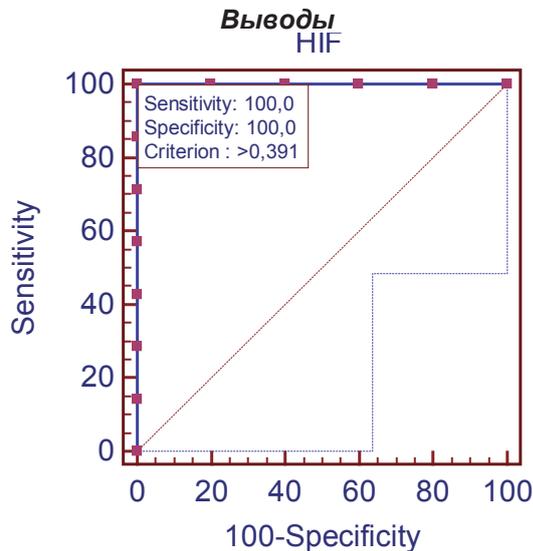


Рисунок 8. – Соотношение чувствительности и специфичности при прогнозировании развития низко злокачественной аденокарциномы в зависимости от уровня экспрессии HIF 1 α в тубулярной аденоме с дисплазией высокой степени

Развитие низко злокачественной аденокарциномы у пациентов с тубулярной аденомой с дисплазией разной степени можно прогнозировать по уровням VEGF, iNOS и HIF 1 α , согласно следующему алгоритму:

1. Ключевым фактором трансформации тубулярной аденомы с дисплазией высокой степени в низко злокачественную аденокарциному является высокий уровень HIF 1 α ($> 0,391$) (чувствительность 100%, специфичность 100%).

2. Малигнизацию тубулярной аденомы с дисплазией низкой степени можно ожидать при уровнях VEGF $> 0,884$ (чувствительность 89,3%, специфичность 80%) и iNOS $\leq 0,89$ (чувствительность 84,8%, специфичность 80%).

3. В случае, когда условия, указанные в пункте 2, не выполняются, для прогнозирования развития низко злокачественной аденокарциномы толстой кишки в тубулярной аденоме с дисплазией низкой степени следует использовать дискриминантное уравнение:

$$y = -44,3676 + 66,8841m_1 + 34,2488m_2,$$

где m_1 – уровень VEGF;

m_2 – уровень iNOS.

Если $y > 0$, прогнозируют высокий риск развития низко злокачественной аденокарциномы толстой кишки. Чувствительность дискриминантной модели составляет 89,3%, специфичность – 73,3%. Общая прогностическая значимость 83,7%.

References

- de Jong AE, Morreau H, Nagengast FM, Mathus-Vliegen EM, Kleibeuker JH, Griffioen G, Cats A, Vasen HF. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *The American Journal of Gastroenterology*. 2005;100(1):139-143. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41000.x.
- Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(3):199-209. doi:10.1038/nrc1545.
- Roskelley CD, Bissell MJ. The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2002;12(2):97-104. doi:10.1006/scbi.2001.0417.
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *British Journal of Cancer*. 2010;102(5):789-795. doi:10.1038/sj.bjc.6605551.
- Baish JW, Jain RK. Cancer, angiogenesis and fractals. *Nature Medicine*. 1998;4(9):984. doi:10.1038/1952.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Research*. 1999;59(22):5830-5835.
- George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RI. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia*. 2001;3(5):420-427.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact in clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):225-239. doi:10.1007/s10555-007-9055-1.
- Shtabinskaya TT, Bodnar M, Lyalikov SA, Basinskiy VA, Marshalek A. Prognostическое значение уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в колоректальном раке [Assessment of prognostic significance of expression level of vascular endothelial growth factor in colorectal cancer]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University]. 2015;51(3):64-69. (Russian).

Поступила: 25.04.2019

Принята к печати: 02.05.2019