

А.С. Крижанівська¹
А.В. Андріїв¹
Н.Ю. Лук'янова²

¹Івано-Франківський
національний медичний
університет,
Івано-Франківськ

²Інститут експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького, Київ, Україна

Ключові слова: рак шийки
матки, променева терапія,
хіміотерапія, молекулярні
маркери COX-2 та VEGF.

ЗНАЧЕННЯ ПРОГНОСТИЧНИХ МАРКЕРІВ COX-2 ТА VEGF У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА РАК ШИЙКИ МАТКИ ІІВ СТАДІЇ

Мета роботи — проаналізувати безпосередні та віддалені результати лікування хворих на рак шийки матки (РШМ) ІІВ стадії залежно від експресії в пухлинній тканині COX-2 та VEGF. **Об'єкт і методи:** у дослідження включено 48 пацієнтів з РШМ ІІВ стадії, які одержали радикальне лікування. У біопсійному та операційному матеріалі імуногістохімічним методом з використанням відповідних моноклональних антитіл визначали експресію COX-2 та VEGF. Відповідь на неоад'ювантне лікування оцінювали за критеріями RECIST та ступенем патоморфозу, виживаність аналізували за методом Каплана — Мейера. **Результати:** доведено зв'язок рівня експресії COX-2 та VEGF з клініко-морфологічними показниками ефективності лікування ($p < 0,05$) і виникненням рецидиву захворювання. Ураження регіонарних лімфатичних вузлів виявлено в 20,8% хворих, із них у 70% був високий рівень експресії COX-2 та VEGF. 5-річна безрецидивна виживаність (БРВ) для всієї дослідженої групи становила 62,8%, загальна виживаність (ЗВ) — 65,1%. У 93,3% хворих, які померли протягом часу спостереження, виявлено високий рівень експресії COX-2 та VEGF. При високому рівні маркерів 5-річна БРВ становила 0,0%, ЗВ — 9%; при середньому і низькому їх рівні БРВ і ЗВ — > 90%. **Висновок:** продемонстровано достовірний зв'язок експресії COX-2 та VEGF з клініко-морфологічними показниками ефективності лікування та його віддаленими результатами у хворих на РШМ ІІ стадії.

Одним із найбільш важливих завдань сучасної онкогінекології є пошук ознак і властивостей пухлин, на основі яких можна було б прогнозувати перебіг захворювання і призначати адекватну терапію [1]. Слід зазначити, що перебіг захворювання, відповідь на хіміотерапію (ХТ) та променеву терапію (ПТ), прогресування процесу, віддалені результати лікування хворих на рак шийки матки (РШМ) з однаковою стадією і гістологічним типом пухлин досить варіабельні [12]. Це можна пояснити різноманітністю біологічних особливостей пухлин, яка пов'язана з їх генетичною нестабільністю і цілою низкою порушень функціонування геномів. Останні детермінують злоякісний фенотип пухлинних клітин, особливості проліферації та неоангіогенезу, метастазування [1, 3, 4]. Тому увага дослідників спрямована на виявлення додаткових молекулярних прогностичних ознак, які дозволяють з'ясувати причини різної поведінки пухлин при однаковій клінічній стадії та ступені диференціювання [4]. Відомо, що основними прогностичними факторами, які визначають перебіг і прогноз РШМ, є стадія захворювання, глибина інвазії, гістологічний тип пухлини, форма росту. На сьогодні ще не існує єдиної точки зору стосовно прогностичного значення віку хворих на РШМ, наявності пухлинних емболів у просвіті лімфатичних щілин, показників крові [1, 4, 6].

При багатофакторному аналізі виділено 43 чинники, які мають помітний вплив на прогноз перебігу РШМ, 23 з них асоціюються з несприятливим результатом лікування [3, 4]. Але біологічна поведінка

пухлин залишається досить непередбачуваною, навіть для пацієнтів з однаковою стадією захворювання. Останнім часом для оцінки агресивності пухлини велике значення надають молекулярним маркерам, зокрема таким, які дозволяють оцінити рівень проліферативної активності, чутливості до апоптогенних впливів, адгезивні властивості пухлинних клітин, інтенсивність пухлинного неоангіогенезу (Ki-67, Her-2/neu, C-мус, p53, Bcl-2, COX-2, SCC), тканинний поліпептидний антиген, VEGF (vascular endothelial growth factor) та ін.). Існує досить багато робіт, в яких доведено, що рівні експресії багатьох із цих маркерів є незалежними прогностичними ознаками [4, 7].

Одним із найбільш вивчених чинників агресивності пухлинного росту є клітинна проліферація, яку можна оцінити за наявністю та рівнем експресії антигену Ki-67. Серед біологічних маркерів, визначених при РШМ, які беруть участь у процесах інвазії та неоангіогенезу, що лежать в основі росту та розповсюдженості пухлин, — циклооксигеназа-2 (COX-2) і фактор росту ендотелію судин (VEGF) [8, 9, 11]. Зокрема, експресія COX-2 підвищується у клітинах низки злоякісних пухлин, що призводить до пригнічення апоптозу, активації неоангіогенезу, зміни адгезивних характеристик пухлинних клітин і їх стимуляції до інвазії [10]. Підвищений рівень COX-2, який визначають імуногістохімічним (ІГХ) методом, виявлено у 45% пацієнтів з плоскоклітинним раком, більш високий рівень — у хворих з аденокарциною шийки матки [9].

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5-річна виживаність при ПВ стадії РШМ коливається від 47 до 67% [5]. Незадоволеність результатами ПТ місцево-поширеного РШМ диктує необхідність відбору хворих з поганим прогнозом для проведення адекватного, більш жорсткого лікування, застосування відповідної ХТ.

Мета роботи — проаналізувати безпосередні та віддалені результати лікування хворих на РШМ ПВ стадії залежно від експресії в пухлинній тканині COX-2 і VEGF.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано результати лікування 48 хворих на плоскоклітинний РШМ ПВ стадії, які отримали радикальне лікування в Івано-Франківському обласному онкологічному диспансері з 2004 по 2009 р. Середній вік пацієнток — $48,1 \pm 8,1$ року (від 31 до 65 років). Діагноз РШМ встановлювали, враховуючи клінічну картину, дані гінекологічного огляду (розміри первинної пухлини, стан склепіння та параметрію), цитологічного та гістологічного досліджень біопсійного та операційного матеріалу, а також результати додаткових методів обстеження (цистоскопія, ректороманоскопія, рентгенографія органів грудної клітки, ультразвукове дослідження та магнітно-резонансна томографія органів черевної порожнини і малого таза). Діагноз верифіковано у всіх хворих при морфологічному дослідженні пухлини шийки матки. Усі пацієнтки дали інформовану згоду на використання хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях.

На першому етапі лікування всі хворі отримували передопераційну ПТ (дистанційна гамма-терапія разовою вогнищевою дозою 2 Гр до сумарної вогнищевої дози 30 Гр з потенціюванням цисплатином 40 мг/м^2 щотижня) або передопераційну ХТ (неoad'ювантна системна ХТ за схемами CF або ВЕР кожні 3 тиж, 2–3 курси). На другому етапі лікування у всіх хворих проведено оперативне втручання в обсязі пангістеректомії III типу, за необхідності — післяопераційний курс ПТ. Післяопераційну дистанційну ПТ (до сумарної вогнищевої дози 40 Гр) призначали після отримання результатів гістологічного дослідження при наявності метастазів у лімфатичних вузлах, глибокій інвазії пухлини та виявленні інвазії лімфатичних судин.

Результати неoad'ювантного лікування аналізували за допомогою сучасних засобів візуалізації пухлини, ультразвукового дослідження та магнітно-резонансної томографії до і після кожного курсу ПТ та ХТ (зменшення розмірів новоутворення, зникнення симптомів перифокального запалення, некроз пухлинної тканини) [2]. Ефективність терапії оцінювали згідно з критеріями RECIST (response evaluation criteria in solid tumors): повна регресія — PR, часткова регресія — CR, стабілізація процесу — SP, прогресування пухлинного процесу — PПП. Для більш коректної оцінки протипухлинної відповіді оцінювали найбільший поперечний розмір (діаметр) пухлинного осередку в одному вимірі та зістав-

ляли його з таким до лікування. У гістологічних препаратах вивчали лікувальний патоморфоз.

ІГХ дослідження експресії COX-2 і VEGF проводили на біопсійному та операційному матеріалі з використанням первинних моноклональних антитіл (МкАТ) (клон 4H12, «Diagnostic BioSystems», США; клон VG1, «DakoCytomation», Данія). Для візуалізації реакції використовували набір реактивів Envision+ та 3,3-діамінобензидин («DakoCytomation», Данія), після чого зрізи забарвлювали гематоксиліном. Застосовували наступні критерії оцінки експресії маркерів: за кількістю забарвлених клітин та інтенсивністю експресії маркерів. При позитивній реакції розрізняли низький рівень експресії маркерів — у 0–20% клітин, середній рівень — 20–50%, високий — 50–100%. Відзначали такі ступені інтенсивності експресії: 0 — відсутність експресії; 1+ — слабка експресія; 2+ — помірної експресія; 3+ — сильна експресія білка у пухлинних клітинах. Пухлини вважали негативними за відсутності реакції з відповідними МкАТ. Оцінку результатів ІГХ реакції проведено на діагностичному комплексі за допомогою світлового мікроскопа Carl Zeiss (фотокамера Canon G5), збільшення $\times 200$, $\times 400$.

Проводили статистичну обробку даних із використанням методів варіаційної статистики. Для оцінки зв'язку між рівнем експресії COX-2 і VEGF та клінічно-морфологічними параметрами (відповідь пухлини за критеріями RECIST, ступінь лікувального патоморфозу) використовували критерій χ^2 . Виживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра, вірогідність розбіжностей між кривими виживаності визначали за допомогою log-rank-тесту. Статистичну значущість прийнято при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристику хворих, включених у дослідження, представлено в табл. 1. 25 (52%) пацієнток на першому етапі лікування отримали ПТ, 23 (48%) — неoad'ювантні курси ХТ. Доцільно підкреслити, що ураження регіонарних лімфатичних вузлів виявлено в післяопераційному матеріалі у 10 (20,8%) пацієнток, із них у 70% відзначено високий рівень експресії COX-2 та VEGF.

Таблиця 1

Характеристика хворих на РШМ ПВ стадії

Параметри	Показники, n (%)
Ураження регіонарних лімфатичних вузлів	10 (20,8)
Проведення передопераційного лікування, у тому числі:	48 (100,0)
ПТ до сумарної дози 30 Гр з потенціюванням цисплатином	25 (52,0)
Неoad'ювантна ХТ*	23 (48,0)

*Схеми ХТ: CF (цисплатин 75 мг/м^2 , флуороурацил 1000 мг/м^2 з 1-го по 4-й день), ВЕР (блеоміцин 15 мг/м^2 , етопозид 100 мг/м^2 з 1-го по 5-й день; цисплатин 120 мг/м^2 в 1-й день).

При аналізі даних ІГХ дослідження виявлено позитивну реакцію зі специфічними МкАТ до COX-2 у 47 (92,1%), до VEGF — у 47 (88,2%) пухлинах. Відзначено збіг градації експресії досліджених маркерів у кожному зі зразків. Високий рівень експресії COX-2

та VEGF встановлено у 14 (29,2%), середній — у 22 (45,8%), низький — у 12 (25,0%) випадках. Оцінюючи відповідь пухлини на лікування, ПР виявлено у 12 (25,0%) пацієнток, ЧР — у 31 (64,6%), СП — у 5 (10,4%); лікувальний патоморфоз IV ступеня — у 12 (25,0%), III ступеня — у 12 (25,0%), II ступеня — у 24 (50,0%) гістологічних препаратах. Слід підкреслити, що ПР пухлини й патоморфоз IV ступеня спостерігали лише при низькому рівні експресії досліджених маркерів (у всіх 12 випадках, 100%). ЧР пухлини та патоморфоз II–III ступеня виявлено в пухлинах із середнім та високим рівнем експресії COX-2 та VEGF; СП і патоморфоз II ступеня відзначено у 5 хворих з високим рівнем експресії цих білків. Розподіл пацієнток за ступенем патоморфозу та відповіддю пухлини на неoad'ювантне лікування залежно від рівня COX-2 і VEGF наведено на рис. 1, 2. При обох варіантах зіставлення різниця між підгрупами з високим і низьким рівнем обох маркерів була статистично достовірною. Середній рівень експресії досліджених молекулярних маркерів помірної та слабкої інтенсивності визначено в пухлинах з ЧР із II та III ступенем патоморфозу після проведеного лікування у хворих, які прожили без рецидиву РШМ менше 5 років. На протипагу цьому нами встановлено, що в пухлинах хворих, які прожили без рецидиву РШМ більше 5 років, мали місце ПР, IV ступінь патоморфозу, низький рівень та слабка експресія COX-2 та VEGF. Таким чином, продемонстровано чіткий зв'язок між експресією досліджених молекулярних маркерів, ефективністю лікування ($p < 0,05$), ступенем патоморфозу ($p < 0,05$) у пухлинній тканині та розвитком рецидиву РШМ.

Віддалені результати лікування залучених в дослідження пацієнток наведено в табл. 2. Найчастіше розвивалися латеральні рецидиви в малому тазу (див. табл. 2) та центральні рецидиви, однаковою була частота випадків ураження заочеревинних лімфатичних вузлів та віддалених метастазів. У 91,6% прогресування захворювання було асоційоване з високим рівнем експресії COX-2 та VEGF. Летальність до 1 року становила 4,2%, обидві пацієнтки померли від супутніх захворювань. Найбільше хворих (40%) загинули на 2-му році після завершення лікування, найчастішою причиною смерті було виникнення рецидивів у малому тазу. 93,3% хворих, які померли, мали високий рівень експресії COX-2 та VEGF.

При визначенні безрецидивної та загальної виживаності (БРВ і ЗВ) всієї групи залучених у дослідження хворих 3-річна БРВ становила 77,1%, ЗВ — 79,2%; 5-річна БРВ — 62,8%, ЗВ — 65,1%. Медіани виживаності не досягнуто. При аналізі виживаності за методом Каплана — Мейера залежно від рівня експресії COX-2 і VEGF (рис. 3), відзначають достовірно нижчі показники виживаності (5-річна ЗВ — 9,0%, БРВ — 0,0%) у хворих з високим рівнем експресії COX-2, VEGF порівняно з пацієнтками, які мали середні та низькі рівні цих маркерів (5-річна ЗВ і БРВ в обох підгрупах $> 90\%$).

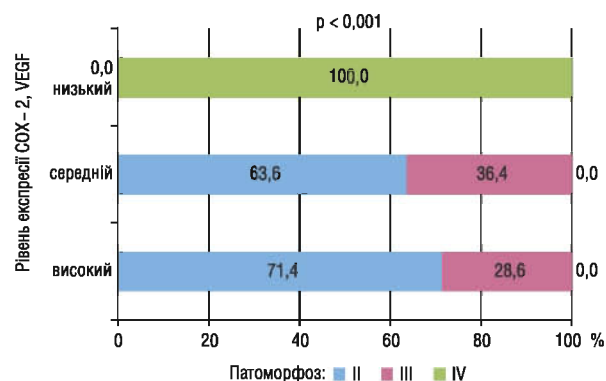


Рис. 1. Залежність лікувального патоморфозу від рівня експресії COX-2, VEGF (достовірність за критерієм χ^2 ($p < 0,05$))

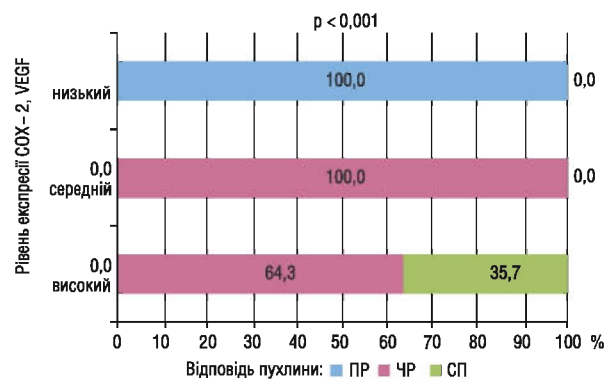


Рис. 2. Залежності відповіді пухлини від рівня експресії COX-2, VEGF (достовірність за критерієм χ^2 ($p < 0,05$))

Таблиця 2
Віддалені результати лікування хворих (n=48) на РШМ ІІВ стадії

Прогресування захворювання	Кількість, n (%)
Рецидив або метастазування, всього	12 (25,0)*
Центральні рецидиви в малому тазу	4 (33,3)
Латеральні рецидиви в малому тазу	6 (50,0)
Ураження заочеревинних лімфатичних вузлів	1 (8,3)
Віддалені метастази	1 (8,3)
Померли, всього	15 (31,0)*
до 1 року (0–1)	2 (13,3)
до 2 років (1–2)	6 (40,0)
до 3 років (2–3)	2 (13,3)
до 4 років (3–4)	3 (20,0)
до 5 років (4–5)	2 (13,3)

*У показниках «всього» наведено частки (%) від загальної кількості хворих; у решті показників — частки (%) від кількості рецидивів або померлих хворих.

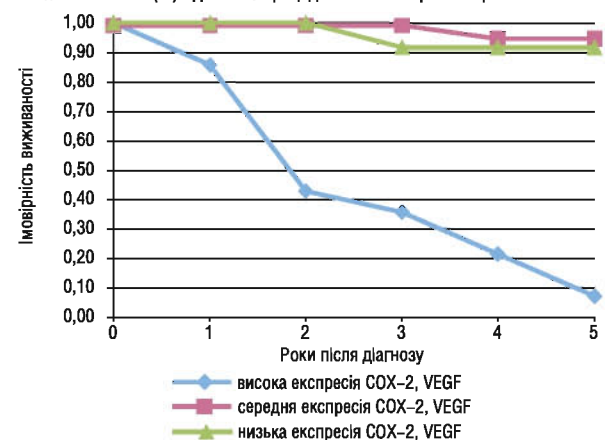


Рис. 3. ЗВ хворих на РШМ ІІВ стадії залежно від рівня експресії COX-2, VEGF (за методом Каплана — Мейера, log-rank $p < 0,05$)

ВИСНОВОК

Продемонстровано достовірний зв'язок експресії COX-2 і VEGF з клініко-морфологічними показниками ефективності лікування та його віддаленими результатами у хворих на РШМ ІІВ стадії. Отримані дані свідчать про важливість визначення цих маркерів у пухлинних клітинах для прогнозу перебігу РШМ, оптимізації режимів лікування та підвищення його ефективності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробйова ЛІ, Гончарук ІВ, Лук'янова НЮ та ін. Клініко-морфологічні та молекулярно-біологічні фактори прогнозу у хворих на рак шийки матки. Онкологія 2008; 10 (4): 382–8.
2. Галил-Оглы ГА, Чазова НЛ, Алипченко ЛА и др. Терапевтический патоморфоз при различных видах предоперационной терапии рака шейки матки. Вестник РНЦПР Минздрава России, 2003; (3): 62–3.
3. Гончарук ІВ, Воробйова ЛІ, Лук'янова НЮ та ін. Значення експресії COX-2 та VEGF для прогнозування перебігу раку шийки матки. Здоров'я жінки 2009; 43 (7, частина 2): 23–6.
4. Пожарисский КМ, Винокуров ВЛ, Жаринов ГМ и др. Иммуногистохимические маркеры в качестве прогностических критериев в онкогинекологии. Вopr онкол 2008; 54 (4): 463–70.
5. Рак в Україні, 2010–2011. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцерреєстру України, 2012; (13). 124 с.
6. Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni M, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. J Clin Oncol 2002; 8: 973–81.
7. Gadducci A, Teti G, Barsotti C, et al. Clinicopathological variables predictive of clinical outcome in patients with FIGO stage Ib2–IIb cervical cancer treated with cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy followed by radical hysterectomy. Anticancer Res 2010; 30: 201–8.
8. Kim JS, Li S, Kim JM, et al. Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of para-aortic lymph node recurrence in uterine cervical cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 70 (5): 1507–15.
9. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukran K, et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis. Gynecol Oncol 2009; 112 (1): 241–7.
10. Noriyuki M, Sumi T, Zhi X, et al. Vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and cyclooxygenase-2 influence prognosis of uterine cervical cancer in young women. Int J Oncol 2007; 31 (3): 531–6.
11. Pyo H, Kim YB, Cho NM, et al. Coexpression of cyclooxygenase-2 and thymidine phosphorilase as a prognostic indicator in patients with FIGO stage IIB squamous cell carcinoma of uterine cervix treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005; 62 (3): 725–32.

12. Rose PG. Concurrent chemoradiation for locally advanced carcinoma of the cervix: where are we in 2006? Ann Oncol 2006; 17 (Suppl 10): 224–9.

THE ROLE OF PROGNOSTIC MARKERS COX-2 AND VEGF IN THE TREATMENT OF STAGE IIB CERVICAL CANCER PATIENTS

A. Y. Kryzhanivska, A. V. Andriyiv, N. Y. Lukyanova

Summary. Objective: to analyze the immediate and long-term outcomes of patients with cervical cancer stage IIB based on expression in tumor tissue of COX-2 and VEGF. **Object and methods:** the study included 48 patients with cervical cancer (CC) stage IIB, which received radical treatment. In biopsy and surgical specimens using immunohistochemical method with appropriate mAbs was determined the expression of COX-2 and VEGF. The response to neoadjuvant treatment was assessed by RECIST criteria and pathomorphosis degree, survival was analyzed using Kaplan — Meier estimator. **Results:** the relationship of expression level of COX-2 and VEGF with clinical and morphological indicators of treatment efficacy ($p < 0,05$) and the occurrence of relapse was proved. The lesion of regional lymph nodes were found in 20.8% of patients, of whom 70% had a high level of expression of COX-2 and VEGF. 5-year disease-free survival for all the studied group was 62,8%, overall survival (OS) — 65,1%. In 93,3% of patients who died during the time of observation was revealed a high level of expression of COX-2 and VEGF. At high levels of markers of 5-year DFS — 0.0% OS — 9% studied, with average and low levels of DFS and OA — > 90%. **Conclusion:** it was demonstrated reliable relationship of expression of COX-2 and VEGF with clinical and morphological indicators of the efficacy of treatment and its long-term results in patients with cervical cancer stage II.

Key words: cervical cancer, radiotherapy, chemotherapy, COX-2 and VEGF molecular markers.

Адреса для листування:

Крижанівська А.Є.
76000, Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2
ДУ «Івано-Франківський національний
медичний університет» МОЗ України
E-mail: anna.nivska@gmail.com

Одержано: 16.04.2013