

Р.И. Глушаков¹, А.К. Иванова²,
Г.А. Раскин², Н.И. Тапильская³

Экспрессия хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани рака яичника у пациенток с гипертиреозом

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Городской клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Резюме. Представлены данные экспрессии хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани рака яичника у пациенток с гипертиреозом. Выявлено, что у больных раком яичника с гипертиреозом в момент выявления злокачественного новообразования экспрессия маркера пролиферации Ki-67 достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у пациенток с эу- и гипотиреозом и составила $24,7 \pm 3,8\%$ и $64,8 \pm 9,0\%$ Hscore соответственно. Экспрессия CXCR4 в опухолевой ткани у пациенток раком яичника и гипертиреозом была также достоверно ($p < 0,05$) выше пациенток контрольной группы и составила $15,9 \pm 3,6\%$ и $7,1 \pm 4,0\%$ соответственно. Оценена продолжительность безрецидивного периода заболевания в обследуемых группах. Установлено, что безрецидивный период заболевания достоверно ($p < 0,05$) меньше в группе пациенток с гипертиреозом (медианы 8,5 и 12,3 месяца).

Ключевые слова: рак яичника, рецепторы хемокинов, Ki-67, гипертиреоз, опухолевая ткань, рецидив.

Введение. Заболевания щитовидной железы (ЩЖ) занимают первое место среди всех болезней эндокринной системы, причем женщины болеют в 3–10 раз чаще мужчин. В структуре эндокринных заболеваний диффузный токсический зоб занимает третье место после сахарного диабета и аутоиммунного тиреоидита, встречаемость заболевания у женщин также отмечается в 8–10 раз чаще, чем у мужчин. Эпидемиологические исследования, выполненные в последние десятилетия, продемонстрировали, что эпизод гипертиреоза в анамнезе увеличивает относительный риск развития рака яичника (РЯ) на 80% [9], рака молочной железы (РМЖ) на 45–60% [13]. В свою очередь, по данным М. Cristofanilli с соавторами [2], гипотиреоз является фактором, уменьшающим риск развития и снижающим агрессивность РМЖ. Также йодотиронины способны повышать биологическую агрессивность папиллярного и фолликулярного рака щитовидной железы [7], опухолей головы и шеи и рака легких [12].

Существует большое количество исследований, доказывающих, что хемокины, которые производятся как самими опухолевыми клетками, так и ассоциированными с опухолью макрофагами, играют важную роль в канцерогенезе за счет прямой стимуляции пролиферации опухолевых клеток, активации ангиогенеза и блокирования противоопухолевого иммунитета. Особый интерес представляют активация и выключение экспрессии различных хемокинов в опухолевых клетках, что обеспечивает эффективный уход опухоли из-под иммунологического контроля. Опухолевые клетки зачастую производят цитокины и хемокины, характерные для регенерирующей ткани, что обеспе-

чивает эффективное привлечение моноцитов и их дифференцировку в макрофаги. Известно, что экспрессия некоторых цитокинов достоверно коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения злокачественного новообразования. Эта корреляция особенно сильна в случае рака молочной железы, простаты, яичника и шейки матки; в случае рака желудка и легких данные до сих пор противоречивы [1]. При длительно протекающем тиреотоксикозе имеет место активация провоспалительных генов в клетках-мишенях, что приводит к тканевому иммунопатологическому процессу, морфологически выражающемуся в выраженной лимфоидной инфильтрации тканей и разрастании интерстициальной соединительной ткани. Однако данных об экспрессии хемокинов в опухолевых тканях и их роль в определении биологической агрессивности опухоли при измененном тиреоидном статусе недостаточно.

Цель исследования. Оценить экспрессию рецепторов хемокинов CXCR4 и CCR7 в злокачественно измененной ткани в группе пациенток, страдающих раком яичника и тиреотоксикозом в момент выявления и лечения злокачественного новообразования. Сравнить продолжительность безрецидивного периода (определенного как время от даты окончания комплексного лечения до даты регистрации местного рецидива, отдаленных метастазов или смерти) в группе пациенток с РЯ и гипертиреозом в момент выявления злокачественного новообразования.

Материалы и методы. Обследованы 36 пациенток с третьей стадией (FIGO) заболевания РЯ, находившихся на лечении в Городском клиническом он-

кологическом диспансере Санкт-Петербурга (ГКОД) с 2008 по 2010 гг. включительно. Распространенность опухолевого процесса оценивали в соответствии с шестым изданием атласа TNM. Всем пациенткам проведено хирургическое лечение в объеме оптимальной циторедуктивной операции с последующим лекарственным лечением в количестве 6 циклов химиотерапии по схеме «паклитаксел+карбоплатин». После окончания лечения всем пациенткам была выставлена ремиссия заболевания. Средний возраст пациенток составил $57,6 \pm 3,4$ лет (интервал от 46 до 67 лет). Все обследуемые были разделены на две группы: основную ($n=20$) и контрольную ($n=16$). В основную группу вошли пациентки с гипертиреоидным статусом (тиреотоксикозом или субклиническим гипертиреозом) и эутиреоидным статусом на фоне приема тиреостатиков, обусловленным диффузным токсическим зобом (ДТЗ) или узловым токсическим зобом (УТЗ) в момент выявления или лечения злокачественного новообразования. Пациентки, принимавшие тиреостатики по поводу заболевания ЩЖ более 3 месяцев, в исследование не включались. В контрольную группу вошли пациентки с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) или без заболеваний ЩЖ в анамнезе с эу- или гипотиреоидным статусом. АИТ был подтвержден лабораторно (определением антител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе в сыворотке крови). Все пациентки с АИТ имели соответствующую эхографическую картину ЩЖ. Степень гипотиреоза не учитывалась. Тиреоидный статус был подтвержден лабораторно определением уровня тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина и свободного трийодтиронина в сыворотке крови трехкратно: при постановке на учет в поликлинике ГКОД, после хирургического лечения (перед проведением 1-го цикла противоопухолевой лекарственной терапии) и по окончании специального лечения.

Имуногистохимическому исследованию была подвергнута опухолевая ткань яичника. Полученный морфологический операционный материал фиксировался в нейтральном формалине и после стандартной гистологической проводки заливался в парафин. С парафиновых блоков изготавливались срезы толщиной 4–6 мкм. Оценка морфологических особенностей ткани опухоли и зоны фона проводилась на срезах окрашенных гематоксилином и эозином. При такой окраске оценивалось качество исследуемого морфологического материала и, если отмечались какие-либо дефекты проводки материала, то в дальнейшем такие случаи в работе не использовались.

Имуногистохимически с использованием соответствующих моноклональных антител оценивалась экспрессия маркера пролиферации Ki67 (Novokasstra), экспрессия рецепторов к хемокинам CXCR4 (Santa cruz biotechnology, inc) и CCR7 (Santa cruz biotechnology, inc).

Частоту клеток, позитивных в иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами на экспрессию хемокиновых рецепторов, выражали в

процентах. Оценивалось не менее 10 полей зрения (ув. $\times 250$).

При экспрессии маркера пролиферации Ki67, кроме количественного выражения в процентах, результаты иммуногистохимической реакции оценивались по 4-балльной шкале (Histo score) по формуле:

$$\text{Histochemical score} = \frac{\sum P(i) \cdot I}{\text{гистосчет}},$$

где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах; $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью; (–) – отрицательная реакция; (+) – слабо положительная; (++) – умеренно положительная и (+++) – сильно положительная.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы SPSS. Достоверность результатов оценивали по t -критерию Стьюдента.

После окончания комплексного лечения состояние заболевания оценивалось по уровню онкомаркера СА-125, данным ультразвукового и рентгенологического исследования. Ультразвуковое исследование органов брюшной полости, малого таза и забрюшинного пространства и определение уровня серологического опухолевого маркера СА-125 в сыворотке крови проводилось 1 раз в 4 недели. Рентгенография органов грудной клетки в двух проекциях проводилась один раз в 3 месяца или при появлении соответствующих жалоб. Увеличение ранее зарегистрированного уровня СА-125 более, чем на 75% от уровня, полученного при выставлении ремиссии заболевания (критерий Rustina), и/или появление очагов в брюшной полости и малом тазу, и/или специфической картины в легких считалось признаком прогрессии заболевания. Пациенткам с признаком местного рецидива заболевания выполнялась пункция брюшной полости через задний свод влагалища, при признаках метастатического плеврита выполнялась пункция плевральной полости. Полученный материал оценивался морфологически врачом-цитологом.

При признаках рецидива заболевания в брюшной полости, но отрицательных результатах цитологического исследования для подтверждения или исключения рецидива пациенткам выполнялась диагностическая лапароскопия с биопсией подозрительных на опухоль тканей и последующей морфологической оценкой биоптата. При морфологическом подтверждении рецидивной болезни всем пациенткам назначали химиотерапию второй линии, дальнейшее динамическое наблюдение за пациентками прекращалось. Продолжительность безрецидивного периода заболевания (БРПЗ) определяли как время от даты окончания лечения до даты регистрации местного рецидива, отдаленных метастазов или смерти в каждой группе больных. Величина безрецидивного периода анализировалась при помощи метода Каплана – Майера и составления соответствующей кривой с определением ее медианы. Исследование проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации.

Результаты и их обсуждение. В большом когортном исследовании, касающемся оценки факторов прогноза у пациенток с 3-й стадией РЯ, получавших одинаковую химиотерапию, сравнивались уровни экспрессии Ki-67 в зависимости от клинкоморфологических особенностей опухоли. A. García-Velasco et al. [3] установлено, что гиперэкспрессия маркера пролиферации Ki-67 является независимым предиктором неблагоприятного прогноза заболевания.

Нами показано, что уровень экспрессии маркера пролиферации в опухолевой ткани РЯ пациенток гипертиреодной группы в момент выявления злокачественного новообразования был достоверно выше уровня экспрессии у пациенток контрольной группы (рис. 1) и составил $24,7 \pm 3,8$ и $14,4 \pm 5,6\%$ в количественном выражении и $64,8 \pm 9,0$ и $36,1 \pm 11,8$ Hscore в качественно-количественном выражении соответственно ($p < 0,05$).

При исследовании профиля экспрессии генов в раковых стволовых клетках опухоли молочной железы установлено, что практически во всех этих клетках активен ген рецептора CXCR1 (рецептор к интерлейкину 8), а ингибирование CXCR1 рецепторов с помощью моноклональных антител останавливает пролиферацию и запускает апоптоз раковой стволовой клетки [5]. В-клеточные и Т-клеточные опухоли имеют гетерогенную картину вовлечения лимфоидных и нелимфоидных органов, что коррелирует с различной экспрессии хемокинов и хемокиновых рецепторов [15]. Уровни экспрессии рецепторов к хемокинам коррелируют с выживаемостью больных колоректальным раком, раком молочной железы, раком предстательной железы [14].

В опухолевой ткани пациенток с гипертиреозом в момент выявления злокачественного новообразова-

ния яичников по сравнению с контрольной группой получены достоверные ($p < 0,05$) различия в уровнях экспрессии CXCR4 ($15,9 \pm 3,6$ и $7,1 \pm 4,0\%$ соответственно) и недостоверные различия в уровнях экспрессии CCR7.

Установлено, что безрецидивный период заболевания за время наблюдения (17 месяцев) был достоверно меньше в группе пациенток с гипертиреозом (медианы 8,5 и 12,3 месяца; $p = 0,485$), рисунок 2.

Существующая концепция об инициации и промоции канцерогенеза постулирует, что существенными факторами риска возникновения злокачественных опухолей, является нарушение метаболизма и гормонального статуса. Одной из важных задач современной онкологии является поиск признаков и свойств опухолей, на основе которых можно было бы прогнозировать течение заболевания и определять адекватную терапию, а также выявление сопутствующих заболеваний, лечение которых способствует более благоприятному течению опухолевого процесса.

Тиреоидные гормоны (ТГ) имеют широкий спектр воздействия и активируют транскрипцию более 100 генов. Тироксин и, в меньшей степени трийодтиронин, связываясь с интегрином $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61), активируют ангиогенез, клеточную пролиферацию и миграцию клеток [8], что является основными звеньями опухолевой прогрессии. Немаловажно, что высокие концентрации йодотиронинов, действуя через геномные и негеномные механизмы, обладают системным провоспалительным и селективным иммуномодулирующим действием. M.T. Rae с соавт. [11] показали, что йодотиронины стимулируют *in vitro* в дозозависимой манере экспрессию провоспалительных генов циклооксигеназы 2 типа (COX2), матричной металлопротеиназы 9 типа (MMP9), 11β -гидроксистероиддегидрогеназы (11β -HSD1) в клетках эпителиального слоя яичника. Все вышеуказанные гены

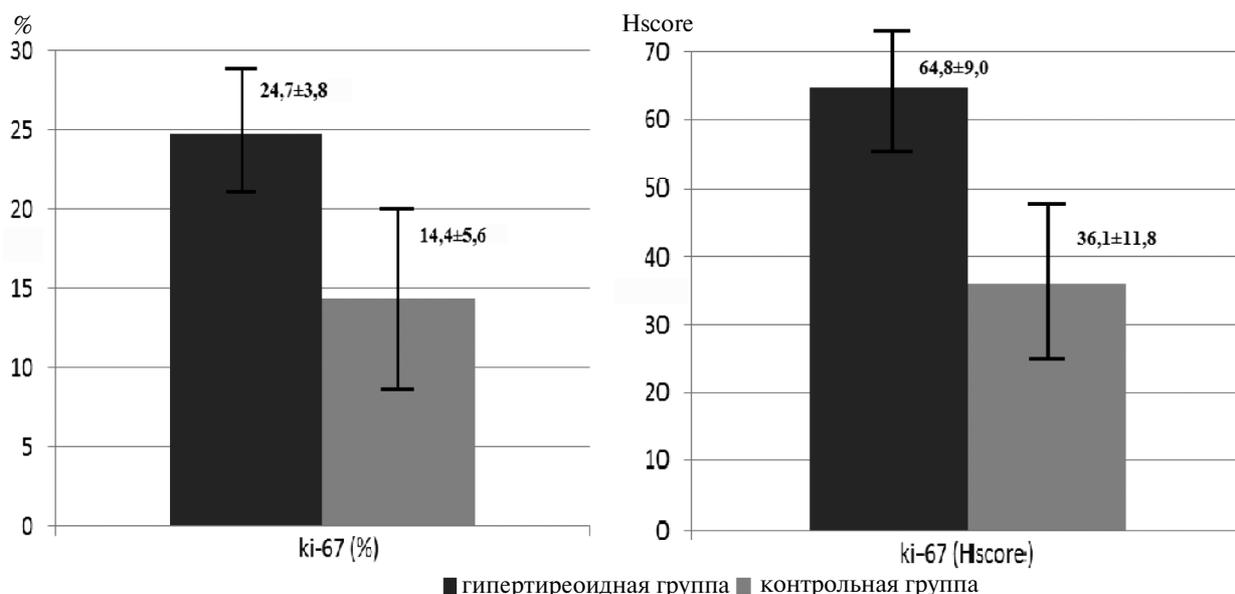


Рис. 1. Уровни экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в опухолевой ткани РЯ пациенток с гипертиреозом в момент выявления и лечения злокачественного новообразования

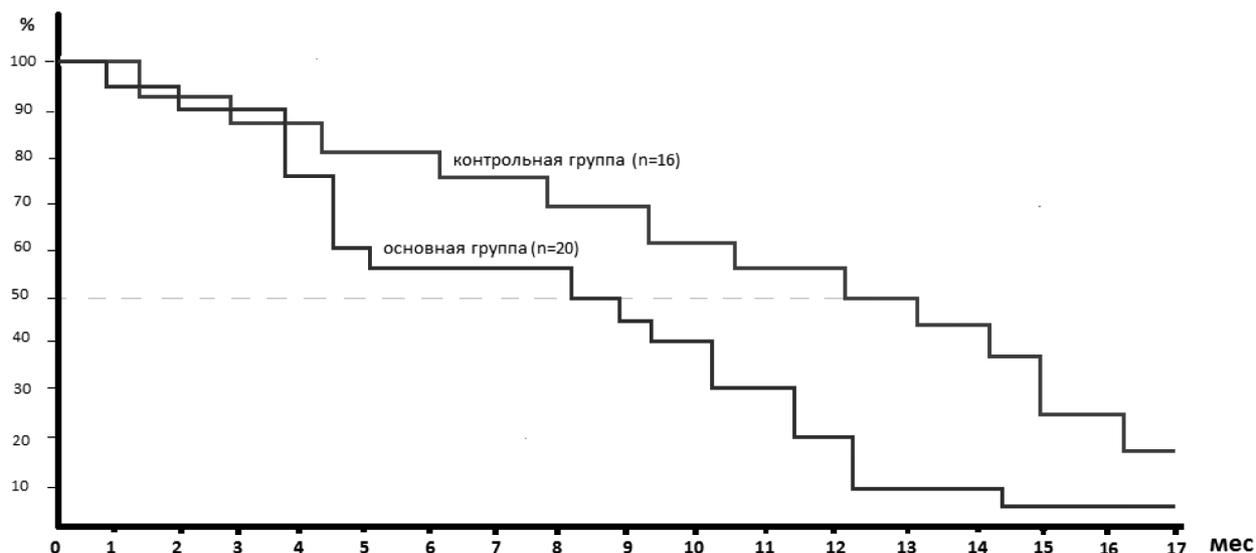


Рис. 2. Безрецидивный период заболевания у больных РЯ в зависимости от тиреоидного статуса

помимо воспаления принимают участие в процессах опухолевой инвазии и ангиогенеза, а их активность коррелирует с биологической агрессивностью опухоли [10]. Эти данные соответствуют результатам, полученным другими учеными при исследовании экспрессии провоспалительных генов при воздействии на них ТГ: в культуре клеток гепатомы значительно повышается экспрессия генов, отвечающих за синтез фибриногена и тканевого активатора плазминогена; в фибробластах кожи – гаптоглобина, орозомукоида и интерлейкина; в адипоцитах – липополисахарид-связывающего протеина и рецептора липополисахарида [11]. Все эти данные свидетельствуют о системном провоспалительном ответе на действие повышенных концентраций гормонов ЩЖ, а роль хронического воспаления в патогенезе злокачественных новообразований признается большинством авторов. Полученное нами повышение экспрессии хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани при гипертиреоидном статусе, по-видимому, является следствием системного провоспалительного действия избыточных концентраций ТГ и может быть одним из ключевых звеньев в патогенезе опухолевой диссеминации.

А.А. Hercbergs et al. [6] показали, что индуцированный гипотиреоз легкой степени приводил к трехкратному увеличению выживаемости пациентов с мультиформной глиобластомой. Обобщенные данные второй и третьей фазы клинических испытаний ингибитора тирозин-киназы сунитиниба, одним из побочных эффектов которого является острый тиреозидит с исходом в гипотиреоз, также продемонстрировали трехкратное увеличение безрецидивной и общей выживаемости пациентов с индуцированным гипотиреозом по сравнению с эутиреоидной группой при лечении метастатического колоректального рака, немелкоклеточного рака лёгкого, метастатического РМЖ, почечноклеточного рака и гастроинтестинальных стромальных опухолей [4].

Заключение. Установлено, что у пациенток РЯ и гипертиреозом отмечается повышенная экспрессия маркеров биологической агрессивности опухоли, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания. Следовательно, гипертиреоз является фактором, отягощающим течение РЯ и, обобщая свои и данные других авторов, можно полагать, что своевременная нормализация тиреоидного статуса будет способствовать увеличению жизни онкологических больных.

Литература

1. Bingle, L. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies / L. Bingle, N.J. Brown, C.E. Lewis // J. pathol. – 2002. – Vol. 196. – P. 254–265.
2. Cristofanilli, M. Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma / M. Cristofanilli [et al.] // Cancer. – 2005. – Vol. 103. – P. 1122–1128.
3. García-Velasco, A. Prognostic value of hormonal receptors, p53, Ki-67 and HER2/neu expression in epithelial ovarian carcinoma / A. García-Velasco [et al.] // Clin. transl. oncol. – 2008. – Vol. 10. – № 6. – P. 367–71.
4. Garfield, D.H. Documentation of Thyroid Function in Clinical Studies With Sunitinib: Why Does It Matter? / D.H. Garfield [et al.] // J. clin. oncol. – 2008. – Vol. 26, № 31. – P. 5131–5133.
5. Ginestier, C. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts / C. Ginestier [et al.] // J. clin. invest. – 2010. – Vol. 120, № 2. – P. 485–497.
6. Hercbergs, A.A. Propylthiouracil-induced chemical hypothyroidism with high-dose tamoxifen prolongs survival in recurrent high grade glioma: a phase I/II study / A.A. Hercbergs [et al.] // Anticancer res. – 2003– Vol. 23. – P. 617–26.
7. Lin, H.-Y. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic / H.-Y. Lin [et al.] // Steroids. – 2007. – Vol. 72, № 2. – P. 180–187.
8. Mousa, S.A. Proangiogenesis action of the thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) is initiated at the cell surface and is integrin mediated / S.A. Mousa [et al.] // Endocrinology. – 2006. – Vol. 147, № 4. – P. 1602–1607.

9. Ness, R.B. Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer / R.B. Ness [et al.] // Epidemiology. – 2000. – Vol. 11. – P. 111–17.
10. Nicosia, S.V. Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer / S.V. Nicosia [et al.] // Hematol. oncol. clin. North Am. – 2003. – Vol. 17, № 4. – P. 927–943.
11. Rae, M.T. Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells / M.T. Rae [et al.] // J. clin. endocrinol. metab. – 2007. – Vol. 92, № 1. – P. 322–327.
12. Rho, C. Enhanced proliferation of human lung adenocarcinoma and small cell lung carcinoma cells directed from the cell surface by thyroid hormone, in: Proceedings of the 89th Annual Meeting of The Endocrine Society / C. Rho [et al.]. – Toronto, Ont., Canada. – 2007. – P. 602.
13. Shering, S.G. Thyroid disorders and breast cancer / S.G. Shering [et al.] // Eur. j. cancer. prev. – 1996. – Vol. 5, № 6. – P. 504–6.
14. Uygur, B. SLUG promotes prostate cancer cell migration and invasion via CXCR4/CXCL12 axis / B. Uygur, W.S. Wu // Mol. cancer. – 2011 – Vol. 10 – P. 139.
15. Wang, S.C. Nuclear expression of CXCR4 is associated with advanced colorectal cancer / S.C. Wang [et al.] // Int. j. colorectal dis. – 2010. – Vol. 25, № 10. – P. 1185–1191.

R.I. Glushakov, A.K. Ivanova, G.A. Raskin, N.I. Tapilskaya

Chemokines expression of cancer cells in patients with epithelial ovarian cancer and hyperthyroidism

***Abstract.** We explored expressions of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4), CC chemokine receptor 7 (CCR7) and tumor-proliferating antigen Ki-67 in patients with advanced ovarian cancer and hyperthyroidism. Immunohistochemistry was used to detect expressions of CXCR4, CCR7 and Ki-67 in the tissue samples from 36 patients treated from January 2008 to December 2010. Correlations with thyroid status were analyzed by Kaplan-Meier method and Cox regression. The expression level of the Ki-67 and CXCR4 in patients with advanced ovarian cancer and hyperthyroidism was amounted to $24,7 \pm 3,8$ and $15,9 \pm 3,6\%$ respectively ($p < 0.05$). We have shown difference in disease-free survival depending on the thyroid status of patients. Median disease-free survival time for the patients with advanced ovarian cancer and hyperthyroidism ($n=20$) is 8,5 months; it is 12,3 months in the group of comparable ($n=16$) ($p=0,485$) patients.*

Key words: advanced ovarian cancer, chemokine receptors, Ki-67, hyperthyroidism, tumor tissue, relapse.

Контактный телефон: +7-911-248-70-62; e-mail: glushakovruslan@gmail.com