

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) jest uważany za główny czynnik procesu angiogenezy. Aktywność biologiczna tej cytokiny w angiogenezie zależy od obecności na powierzchni śródbłonka specyficznych białek receptorowych: VEGFR-1, VEGFR-2 oraz VEGFR-3. Przypuszcza się, że związanie tych receptorów z VEGF ma wpływ na proliferację i migrację komórek śródbłonka do macierzy zewnątrzkomórkowej. Warunkuje to powstawanie unaczynienia guzów litych i odległych przerzutów.

Celem pracy była ocena stężenia sVEGFR-1 dla VEGF w surowicy kobiet chorych na pierwotnego raka piersi. W ocenie tej uwzględniono czynniki prognostyczne: zaawansowanie procesu chorobowego, stopień złośliwości histologicznej guza, stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych oraz wielkość guza pierwotnego.

Oznaczenie stężenia sVEGFR-1 wykonano w surowicy 103 kobiet chorych na pierwotnego raka gruczołu piersiowego przed zabiegiem chirurgicznym, w wieku 29–89 lat (średnia wieku 56 lat), leczonych na Oddziale Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiły surowice 40 zdrowych kobiet w wieku 24–75 lat (średnia wieku 47 lat).

Stężenie rozpuszczalnej formy receptora (VEGFR-1) w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) w wersji *sandwich*, z użyciem testów Quantikine firmy R&D Systems Abingdon, UK.

W badaniach wykazano istotnie większe stężenie sVEGFR-1 w surowicy kobiet chorych na raka piersi w porównaniu z wartościami tego receptora w grupie kontrolnej. Im wyższy był stopień zaawansowania klinicznego choroby, tym uzyskano większe stężenie rozpuszczalnej formy tego receptora. Podobną kierunkowość zmian stwierdzono przy ocenie stopnia złośliwości histologicznej guza. Znamienne wyższe wartości sVEGFR-1 uzyskano także w grupie kobiet chorych na raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych aniżeli u pacjentów bez przerzutów. W badaniach nie uzyskano jednoznacznej korelacji pomiędzy stężeniem sVEGFR-1 a wielkością guza pierwotnego. Stężenie rozpuszczalnej formy receptora (sVEGFR-1) dla VEGF w surowicy kobiet chorych na pierwotnego raka gruczołu piersiowego wykazuje dodatnią zależność ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej. Wskazywać to może na przydatność oznaczania tego receptora w ocenie klinicznej chorych na raka piersi.

Słowa kluczowe: angiogeneza, sVEGFR-1, rak piersi.

Ocena stężenia rozpuszczalnego receptora sVEGFR-1 u chorych na raka gruczołu piersiowego

Assessment of sVEGFR-1 concentration in patients with breast cancer

Anna Thielemann¹, Zygmunt Kopczyński¹, Aleksandra Baszczuk¹, Karolina Ćwiklińska¹, Sylwia Grodecka-Gazdecka²

¹Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Oddział Chirurgii Onkologicznej Katedry i Kliniki Onkologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp

Dotychczasowe badania naukowe wykazały, że wzrost guzów nowotworowych, zwłaszcza litych, ma ścisły związek ze zwiększeniem liczby naczyń krwionośnych w ich obrębie, czyli z procesem angiogenezy [1]. Badania prowadzone na mysich modelach doświadczalnych dowiodły, że przepływ krwi przez guz nowotworowy zależy od jego budowy histologicznej, organizacji przestrzennej sieci naczyniowej oraz indeksu mitotycznego komórek [2, 3].

Powstawanie unaczynienia guzów nowotworowych litych związane jest z obecnością czynników stymulujących wzrost guza, a zwłaszcza z naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) [4]. Czynnikiem ten pobudza migrację i proliferację komórek śródbłonka, a także zwiększa przepuszczalność naczyń, w wyniku czego następuje przenikanie białek osocza krwi, m.in. fibrynogenu do przestrzeni okotona-czyniowej [4, 5].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu poprzez wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych śródbłonka ułatwia także komórkom rakowym przechodzenie do przestrzeni pozanaczyniowej i zapoczątkowanie tworzenia przerzutów nawet w bardzo odległych narządach [5, 6]. Badania nad mechanizmem działania VEGF wykazały, że cytokina ta wywiera swoje działanie na komórki śródbłonka naczyniowego poprzez wiązanie ze swoistymi receptorami błonowymi występującymi na powierzchni endotelium [7].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu jest ligandem dla dwóch receptorów błonowych: VEGFR-1 (Flt-1 – *fms-like tyrosine kinase-1*) i VEGFR-2 (KDR/Flk-1 – *fetal liver kinase-1/kinase domain receptor*). Trzeci z receptorów: VEGFR-3 (flt-4), pośredniczy w przekazywaniu sygnałów limfangiogennych prowadzących do podziału komórek śródbłonka naczyń limfatycznych, a ligandami dla tego receptora są czynniki VEGF-C oraz VEGF-D. Receptory VEGFR-1 (Flt-1) występują głównie na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego oraz na powierzchni monocytów i makrofagów [7]. Uczestniczą we wczesnych stadiach angiogenezy, w procesie neowaskularyzacji oraz gojeniu się ran [20]. Za pośrednictwem sVEGFR-1 dochodzi do mobilizacji prekursorów dla komórek śródbłonka ze szpiku kostnego, stymulacji migracji monocytów i makrofagów oraz nasilenia zdolności adhezyjnych komórek NK [8]. Receptory VEGFR-1 odgrywają także istotną rolę w procesach wzrostu i różnicowania się komórek śródbłonka oraz w mechanizmach naprawczych naczyń [8]. Receptory VEGFR-2 (Flk-1/KDR) są obecne przede wszystkim na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego, płytek krwi, komórek hematopoetycznych, osteoblastów oraz komórek macierzystych siatkówki [9].

Angiogenesis, the process in which new blood vessels arise from pre existing vessels, is necessary for the development and growth of solid cancer tumours and metastatic lesions. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and the endothelial receptors VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3 play an important role in this process. The aim of the study was to ascertain the value of assessment of sVEGFR-1 level in serum in women with primary breast cancer and its correlations with clinical status of the disease, histological malignancy, status of axillary lymph nodes and the size of the primary tumour.

A group of 103 patients with primary breast cancer who had not undergone surgery was selected. Patients' age ranged from 29 to 89 years old (mean 56 years). All patients were treated in the Oncological Surgery Department of Poznan University of Medical Sciences. Forty healthy women aged from 24 to 75 (mean 47 years) formed a control group. The assessment of concentration of the soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor sVEGFR-2 was performed in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine test of R&D Systems, Abingdon, UK).

The results of the study suggested that the level of VEGFR-1 in serum of women with breast cancer was significantly higher than in serum of healthy women. A relation was found between the level of sVEGFR-1 and the stage of clinical disease advancement. The statistical analysis showed a significant difference between sVEGFR-1 level in the control group compared to women with breast cancer in stages I, II and III of clinical disease advancement. There was a positive correlation between sVEGFR-1 level and aggressiveness of the disease. A similar correlation was not found between sVEGFR-1 level and the size of the primary tumour. Significant differences were also found between the group of women with metastases to the axillary lymph nodes and those with no metastases.

The results of the study suggested that the concentration of the soluble form of the vascular endothelial growth factor sVEGFR-1 may represent a useful indicator for assessment of clinical disease advancement.

Key words: receptor sVEGFR-1, angiogenesis, breast cancer, VEGF.

Receptory VEGFR-2 są czynnikiem niezbędnym do fizjologicznego rozwoju naczyń i stanowią zarówno główny regulator waskulogenezy podczas rozwoju embrionalnego, jak i podczas procesu angiogenezy u osobników dojrziałych. Badania przeprowadzone na mysich embrionach wykazały, że zarodki te pozbawione receptora VEGFR-2 są nieunaczynione i giną już we wczesnym stadium embriogenezy [9–11].

Badania naukowe ostatnich lat wykazały, że receptory dla VEGF oprócz postaci związanych z błoną komórkową mogą występować także w formie rozpuszczalnej [12, 13]. Pierwsze rozpuszczalne formy receptora sVEGFR-1 wykryte zostały w latach 90. XX w. w medium hodowlanym komórek HUVEC oraz w płynie owodniowym [14]. Za powstawanie rozpuszczalnych form receptorów odpowiedzialne są dwa różne mechanizmy. Pierwszy z nich dotyczy powstawania sVEGFR-1 w wyniku proteolizy zewnętrznego regionu receptora błonowego, drugi mechanizm natomiast dotyczy powstawania tych form w wyniku zmian potranskrypcyjnych mRNA w rejonie flt-1 [14]. Dokładna budowa biochemiczna sVEGFR-1 nie została jeszcze dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że rozpuszczalna forma receptora VEGFR-1 pozbawiona jest 7. domeny immunoglobulinopodobnej oraz domeny śródbłonkowej i wewnątrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej, charakterystycznych dla receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2. Przypuszcza się, że właśnie ta specyficzna budowa powoduje, że receptory sVEGFR-1, łącząc się z każdą izoformą VEGF, działają jak negatywny regulator procesu angiogenezy poprzez zmniejszanie dostępności tej cytokiny do śródbłonka naczyniowego [15]. W ten sposób hamowany jest efekt mitogenny VEGF na komórki endotelium, co może prowadzić do zahamowania powstawania nowych naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych litych i powstawania przerzutów [15].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia rozpuszczalnej formy receptora dla VEGF (sVEGFR-1) w surowicy kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego w zależności od wybranych czynników rokowniczych, takich jak: stopień zaawansowania klinicznego choroby, stopień złośliwości histologicznej nowotworu, stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych i wielkość guza pierwotnego.

Materiał i metody

Charakterystyka kliniczna grupy badanej

Oznaczenie stężenia rozpuszczalnej formy receptora dla VEGF (sVEGFR-1) wykonano w surowicy 103 kobiet chorych na pierwotnego raka gruczołu piersiowego w wieku 29–89 lat (średnia wieku 56 lat, mediana 55, wartości przedziału ufności 48,0–68,0) przed zabiegiem chirurgicznym. Pacjentki były poddane leczeniu na Oddziale Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Grupę kontrolną stanowiły surowice 40 zdrowych kobiet w wieku 24–75 lat (średnia wieku 47 lat, mediana 44, wartości przedziału ufności 30,0–56,0). Charakterystykę kliniczną badanych kobiet przedstawiono w tabeli 1.

Pobieranie materiału do badań

Krew do badań o objętości 5 ml pobierano od pacjentek na skrzep, po czym wirowano z szybkością 1000 × g w ciągu 10 min. Po odwirowaniu osocze zbierano do próbek w ilości 0,5 ml i zamrażano w temperaturze –20°C. Tak przygotowane próbki przechowywano w tej temperaturze do czasu wykonania badania, jednak nie dłużej niż 6 miesięcy.

Stężenie rozpuszczalnej formy receptora dla VEGF (sVEGFR-1) w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną (EIA) za pomocą płytkowych testów immunoenzymatycznych fazy stałej (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA).

Analizę statystyczną przeprowadzono, stosując nieparametryczne testy U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallisa. Wyniki badań przedstawiono w posta-

ci mediany stężenia sVEGFR-1. Za istotne statystycznie uznano różnice, dla których wartość $p < 0,05$. Obliczenia wykonano, korzystając z programu Statistica for Windows (StatSoft, Inc.2001).

Wyniki

W grupie referencyjnej średnie stężenie sVEGFR-1 w surowicy wynosiło 41,0 pg/ml, a w grupie 103 chorych na raka gruczołu piersiowego poziom sVEGFR-1 osiągnęło wartość 102,8 pg/ml (tab. 2.). Mediana stężeń badanego receptora w grupie chorych na nowotwór złośliwy piersi była prawie dwukrotnie wyższa aniżeli w surowicy kontrolnej i różnice te cechowały się znamiennością statystyczną (tab. 2.). Analiza wyników wykazała, że zwiększone stężenie sVEGFR-1 występowało u 67 chorych (60,5 %), przy czym u 29 pacjentek (28,2%) mieściło się w zakresie 100–200 pg/ml, a u 7 pacjentek było wysokie i przekroczyło wartość 200 pg/ml (tab. 3.). Dalsze wyniki badań wykazały, że wraz ze wzrostem złośliwości histologicznej raka wzrastała znamienne mediany stężeń sVEGFR-1. U pacjentek w stopniu złośliwości G3 była ona prawie dwukrotnie wyższa aniżeli u chorych w stopniu G1 i różnica ta była istotnie statystyczna (tab. 2.). Istotnej różnicy nie obserwowano nato-

Tabela 1. Charakterystyka chorych na raka gruczołu piersiowego
Table 1. Characteristics of breast cancer patients

Charakterystyka kliniczna chorych	Liczba pacjentek	Odsetek badanych kobiet [%]
stopień zaawansowania klinicznego choroby wg TNM		
I	47	45,6
II	38	36,9
III	18	17,5
stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych		
pN0	51	49,5
pN1	52	50,5
wielkość guza pierwotnego		
pT		
< 20 mm	54	52,4
≥ 20 < 50 mm	40	38,9
≥ 50 mm	9	8,7
stopień złośliwości histologicznej		
G1	11	10,7
G2	50	48,5
G3	42	40,8

Tabela 2. Wartości receptora sVEGFR-1 w zależności od zaawansowania klinicznego wg TNM, stanu okolicznych węzłów chłonnych pachowych, wielkości guza stopnia i stopnia złośliwości histologicznej guza u kobiet chorych na raka piersi

Table 2. Values of sVEGFR-1 in relation to clinical advancement of disease according to the TNM system, the status of axillary lymph nodes, tumor size and the grade of histological malignancy in women with breast cancer

Charakterystyka chorych	Rozpuszczalny receptor (sVEGFR-1)		
	średnie stężenie sVEGFR-1	mediana stężenia sVEGFR-1 [pg/ml]	zakres wartości stężeń sVEGFR-1
kontrola (n = 40)	41,0 ± 8,7 n = 40	43,5	20,1–49,7
chore na raka (n = 103)	102,8 ^a ± 54,9	79,3 ^a	43,2–259,8
stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM			
I (n = 47)	74,1 ± 25,6	67,7	43,2–159,6
II (n = 38)	115,0 ± 63,5 ^b	87,6 ^b	48,8–256,9
III (n = 18)	132,6 ± 60,1 ^b	136,0 ^b	48,5–259,8
stan okolicznych węzłów chłonnych			
pN0 (n = 51)	76,9 ± 35,3	67,4	43,2–226,8
pN1 (n = 52)	128,2 ± 59,0 ^c	114,6 ^c	49,8–259,8
wielkość guza			
pT < 20 mm (n = 54)	88,7 ± 49,8	70,8	43,5–257,4
pT ≥ 20 < 50 mm (n = 40)	121,5 ± 56,9 ^d	97,4 ^d	50,8–259,8
pT ≥ 50 mm (n = 9)	99,2 ± 54,4	72,8	48,8–195,0
stopień złośliwości histologicznej			
G1 (n = 11)	59,7 ± 8,5	61,8	46,8–77,6
G2 (n = 50)	98,9 ± 44,5	83,0	43,2–226,8
G3 (n = 42)	118,8 ± 65,9 ^e	85,0 ^e	48,5–259,8

^a różnica istotna statystycznie dla sVEGFR-1 w porównaniu z grupą kontrolną, przy $p < 0,05$

^b różnica istotna statystycznie dla sVEGFR-1 w porównaniu z grupą kobiet w I stopniu zaawansowania choroby, przy $p < 0,05$

^c różnica istotna statystycznie dla sVEGFR-1 w porównaniu z grupą kobiet bez przerzutów do węzłów chłonnych pachowych, przy $p < 0,05$

^d różnica istotna statystycznie dla VEGF w porównaniu z grupą kobiet z wielkością guza < 20 mm, przy $p < 0,05$

^e różnica istotna statystycznie dla sVEGFR-1 w porównaniu z grupą kobiet w stopniu G1, przy $p < 0,05$

Tabela 3. Procent podwyższonych wartości rozpuszczalnego receptora dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1) w surowicy chorych na raka gruczołu piersiowego

Table 3. Percentage increase values for vascular endothelial growth factor (VEGF) in the plasma of breast cancer patients

	Odsetek podwyższonych wartości sVEGFR-1 (%) w zakresie stężeń [pg/ml]		
	41,0–100,0	100,1–200,0	200,1–300,0
rak gruczołu piersiowego (n = 103)	65,0 (n ₁ = 67)	28,2 (n ₁ = 29)	6,8 (n ₁ = 7)
stopień zaawansowania klinicznego choroby			
I (n = 47)	87,2 (n ₁ = 41)	12,8 (n ₁ = 6)	0 (n ₁ = 0)
II (n = 38)	42,1 (n ₁ = 16)	44,7 (n ₁ = 17)	13,2 (n ₁ = 5)
III (n = 18)	55,6 (n ₁ = 10)	33,3 (n ₁ = 6)	11,1 (n ₁ = 2)
przerzuty do węzłów chłonnych			
pN0 (n = 51)	86,3 (n ₁ = 44)	11,8 (n ₁ = 6)	1,9 (n ₁ = 1)
pN1 (n = 52)	46,3 (n ₁ = 24)	42,3 (n ₁ = 22)	11,5 (n ₁ = 6)
wielkość guza			
pT < 20 mm (n = 54)	75,9 (n ₁ = 41)	18,5 (n ₁ = 10)	1,8 (n ₁ = 1)
pT ≥ 20 < 50 mm (n = 40)	52,5 (n ₁ = 21)	40,0 (n ₁ = 16)	33,3 (n ₁ = 3)
pT ≥ 50 mm (n = 9)	5,6 (n ₁ = 3)	7,5 (n ₁ = 43)	11,1 (n ₁ = 1)
stopień złośliwości histologicznej			
G1 (n = 11)	100 (n ₁ = 11)	0 (n ₁ = 0)	0 (n ₁ = 0)
G2 (n = 50)	60,0 (n ₁ = 30)	38,0 (n ₁ = 19)	2 (n ₁ = 1)
G3 (n = 42)	61,9 (n ₁ = 26)	23,8 (n ₁ = 10)	14,3 (n ₁ = 6)

(n) – liczba pacjentek (n₁) – liczba wyników podwyższonych

miast, kiedy porównywano wartości sVEGFR-1 u chorych w stopniu choroby G3 z wartościami u pacjentek w stopniu G2. Mediana stężenia sVEGFR-1 wzrastała także wraz z zaawansowaniem procesu chorobowego u kobiet chorych na raka piersi (tab. 2.). Najwyższe średnie stężenie sVEGFR-1 i najwyższą medianę stężenia sVEGFR-1 zaobserwowano w surowicy kobiet w III stopniu zaawansowania klinicznego choroby. U kobiet w III stopniu zaawansowania choroby mediana stężenia sVEGFR-1 była prawie dwukrotnie wyższa aniżeli w stopniu I i nieznacznie wyższa w porównaniu ze stężeniem tego receptora u pacjentek w II stopniu zaawansowania procesu chorobowego (tab. 2.). Różnicę statystycznie istotną wykazano pomiędzy wartościami receptora sVEGFR-1 uzyskanymi w grupie kobiet w I stopniu zaawansowania klinicznego choroby a stężeniami sVEGFR-1 uzyskanymi u pacjentek w II i III stopniu zaawansowania klinicznego choroby (tab. 2.).

Dalsza analiza wyników badań wykazała, że u kobiet z przerzutami do węzłów chłonnych pachowych mediana stężeń sVEGFR-1 była prawie dwukrotnie wyższa aniżeli u pacjentek bez przerzutów i różnice te cechowały się znamiennością statystyczną (tab. 2.). W grupie 52 kobiet z przerzutami do węzłów chłonnych pachowych uzyskano wysoki odsetek wyników podwyższonych dla stężeń sVEGFR-1. U tych chorych średnie stężenie sVEGFR-1 wynosiło 128,2 pg/ml (tab. 2.), przy czym odsetek wyników podwyższonych w zakresie stężeń 41,0–100 pg/ml stanowił 46,2%, w zakresie 100–200 pg/ml – 42,3%, a w przedziale stężeń 200–300 pg/ml – 11,5% (tab. 3.). Wśród 51 pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych średnie stężenie sVEGFR-1 wynosiło 76,9 pg/ml, a odsetek wartości podwyższonych w zakresie stężeń 100–200 pg/ml stanowił 11,8%, natomiast w przedziale 200–300 pg/ml zaledwie 1,9%

(tab. 2. i 3.). Nie wykazano jednoznacznej zależności stężenia receptora sVEGFR-1 od wielkości guza u chorych na raka piersi (tab. 2.). U kobiet z wielkością guza poniżej 20 mm średnie stężenie sVEGFR-1 wyniosło 88,7 pg/ml, u pacjentek z guzem o wielkości 20–50 mm wzrosło do wartości 121,5 pg/ml, natomiast przy wielkości guza powyżej 50 mm stężenie sVEGFR-1 zmniejszyło się do 99,2 pg/ml. Istotność statystyczną otrzymano jedynie pomiędzy średnim stężeniem sVEGFR-1 u chorych kobiet z wielkością guza poniżej 20 mm a wartością sVEGFR-1 w grupie pacjentek o wielkości guza pomiędzy 20 a 50 mm (tab. 2.).

Dyskusja

Dane epidemiologiczne ostatnich lat wskazują, że rak gruczołu piersiowego nadal pozostaje główną przyczyną zachorowań i zgonów wśród chorób nowotworowych u kobiet w Polsce [16, 17]. Za główną przyczynę wysokiego współczynnika umieralności uważa się przerzutowy charakter tej choroby. Dokładny patomechanizm powstawania odległych przerzutów nowotworowych nie został do końca wyjaśniony. Dotychczasowe badania doświadczalne i kliniczne wykazały, że w procesie nowotworzenia istotny udział ma angiogeneza. Obecnie za najważniejszy czynnik regulujący angiogenezę nowotworową uważa się VEGF [18]. Glikoproteina ta działa stymulująco nie tylko na proliferację i migrację komórek endotelium, ale poprzez zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych umożliwia przechodzenie komórek rakowych do przestrzeni pozanaczyniowej, zapoczątkowując tym samym powstawanie odległych przerzutów [18].

Zwiększone stężenie VEGF, zarówno w tkance nowotworowej, jak i płynach ustrojowych wykazano w wielu

nowotworach, m.in. u chorych na raka jelita grubego, trzustki, nerki, pęcherza moczowego, prostaty i płuc [17–22]. U tych pacjentów stwierdzono znacznie gorsze rokowanie w porównaniu z chorymi, u których występowało małe stężenie VEGF.

Wcześniejsze wyniki badań doświadczalnych przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej wykazały istotnie większe stężenia VEGF w osoczu kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego w porównaniu ze stężeniem tej cytokiny w grupie referencyjnej [23]. Naczyniowo-śródłonkowy czynnik wzrostu oddziałuje specyficznie na komórki śródłonka naczyń krwionośnych poprzez wiązanie się ze swoistymi receptorami zlokalizowanymi głównie na powierzchni komórek endotelium: VEGFR-1/ Flt-1 i VEGFR-2 / KDR/Flk-1 [24].

W ostatnich latach w supernatancie komórek śródłonka wykryto obecność rozpuszczalnych form receptora – sVEGFR-1 i sVEGFR-2 [24]. Rola receptorów sVEGFR-1 nie została jeszcze w pełni poznana. Przypuszcza się, że poprzez swoje wysokie powinowactwo do wszystkich izoform VEGF, receptor ten stabilizuje VEGF w przestrzeni międzykomórkowej, zmniejsza jego dostępność do śródłonka naczyniowego, a tym samym hamuje powstawanie nowych naczyń krwionośnych [24]. Obecnie bada się wpływ rozpuszczalnej formy receptora na proces angiogenezy i powstawanie przerzutów. W nielicznych opublikowanych do tej pory pracach doświadczalnych większe aniżeli u osób zdrowych stężenia receptora sVEGFR-1 wykryto u osób z pierwotnymi rakami kory nadnerczy, u chorych na raka jelita grubego i raka pęcherzyka żółciowego [17, 20, 25]. Podczas analizowania danych z piśmiennictwa, nasuwa się pytanie, jaka jest częstość występowania rozpuszczalnej formy receptora sVEGFR-1 u kobiet chorych na raka piersi i jaka jest przydatność jej oznaczania w prognozowaniu chorych na raka piersi? Dotychczas opublikowano niewiele doniesień piśmiennictwa na ten temat.

Celem niniejszej pracy było wykazanie obecności rozpuszczalnej formy receptora dla VEGF (sVEGFR-1) w surowicy kobiet chorych na pierwotnego raka gruczołu piersiowego oraz ocena jego stężenia uwzględniająca takie parametry prognostyczne, jak: stopień zaawansowania klinicznego choroby, stopień złośliwości histologicznej guza, stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych oraz wielkość guza pierwotnego.

Przeprowadzone badania wykazały, że u wszystkich kobiet zdrowych występują rozpuszczalne formy receptora sVEGFR-1. Wykazano także, że średnie stężenie tego receptora u kobiet chorych na raka piersi było istotnie większe w porównaniu z grupą referencyjną. Mediana stężenia receptora sVEGFR-1 w grupie chorych na raka piersi była ok. dwukrotnie wyższa aniżeli w grupie kontrolnej. Kumar i wsp. także wykazali obecność receptorów sFLT-1 w surowicy chorych na raka gruczołu piersiowego, ale nie potwierdzili występowania tych form w grupie zdrowych ochotników [26]. Z kolei Toi i Belgore zaobserwowali większe stężenia receptora sFLT-1 w surowicy pacjentek chorych na raka piersi w porównaniu z wartościami w grupie kontrolnej. Różnice te nie wykazywały jednak cech znamienności statystycznej, co prawdopodobnie spowodowane było zbyt niską

liczebnością grupy badanej [27, 28]. Prowadzone były także badania określające stężenie rozpuszczalnego receptora sVEGFR-1 w płynach ustrojowych chorych na inne nowotwory. Wierzbowska i wsp. wykazali, że stężenie receptora sVEGFR-1 było istotnie większe u chorych na ostrą białaczkę limfatyczną i szpikową aniżeli w grupie kobiet zdrowych [29]. Podobne wyniki badań doświadczalnych uzyskał Chin, stwierdzając obecność rozpuszczalnego receptora u ponad 74% chorych na raka jelita grubego [19]. Enjoji wykazała natomiast różnicę statystycznie istotną dla stężeń sVEGFR-1 pomiędzy grupą chorych na raka pęcherzyka żółciowego a grupą referencyjną [20].

Uznany czynnikiem rokowniczym pozwalającym na ocenę rozległości i szerzenie się nowotworu jest, wg klasyfikacji TNM (UICC), stopień zaawansowania klinicznego choroby. Określenia stopnia zaawansowania procesu nowotworowego dokonuje się na podstawie oceny stanu węzłów chłonnych, wielkości guza oraz obecności odległych przerzutów. W badaniach własnych wykazano, że stężenie receptorów sVEGFR-1 koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby. Badania przeprowadzone przez Wu i wsp. potwierdzają te spostrzeżenia [9]. Odmiennego zdania są Kumar i Bednarek, którzy w swoich pracach doświadczalnych nie wykazali zależności pomiędzy stężeniem sFLT-1 a stopniem zaawansowania choroby [26, 30].

W ocenie stopnia zaawansowania klinicznego chorych uwzględniono także stan węzłów chłonnych pachowych. Zajęte węzły chłonne świadczą o zdolności komórek rakowych do tworzenia przerzutów. Z kolei przerzuty są główną przyczyną zgonów kobiet chorych na raka piersi, a ich powstawanie wiąże się z przejściem nowotworu ze stanu *in situ* w nowotwór złośliwy. Procesowi temu towarzyszy zwiększone stężenie białka VEGF, zwiększającego proliferację i migrację komórek śródłonka [2]. W doświadczeniach własnych wykazano dwukrotnie wyższe mediany stężeń sVEGFR-1 w surowicy chorych na raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych w stosunku do grupy chorych bez przerzutów. Wyniki tych badań znalazły potwierdzenie w doświadczeniach Wu i Myśliwca [9, 31]. Z doniesień Wu i wsp. wynika także, że wysoki stosunek sVEGFR-1/VEGF stanowi lepszy czynnik prognostyczny u kobiet chorych na raka piersi aniżeli oznaczanie tylko samego stężenia VEGF [9]. Podobnego zdania jest Toi, który stwierdził, że u chorych, u których stężenie sVEGFR-1 w guzie przekraczało 10-krotnie stężenie VEGF, stanowił on korzystniejszy marker prognostyczny [27]. Horning i Toi nie wykazali natomiast istotnej zależności pomiędzy stężeniem sVEGFR-1 a przerzutami do węzłów chłonnych pachowych [13, 27].

Istotnym parametrem prognostycznym jest także wielkość guza nowotworowego. Wraz z wielkością guza wzrasta ryzyko progresji choroby lub zgonu. Małe rozmiary guza nie są jednak krytycznym wykładnikiem dobrego rokowania, gdyż guzy poniżej 10 mm mogą dawać przerzuty. Statystyczną zależność uzyskano w niniejszej pracy jedynie dla wartości sVEGFR-1 u kobiet z wielkością guza poniżej 20 mm i pomiędzy 20 a 50 mm. Podobnego spostrzeżenia dokonali w swoich badaniach Wu i wsp. [9].

Ważnym parametrem w ocenie prognozowania chorych na raka piersi jest stopień złośliwości histologicznej guza.

W badaniach własnych uzyskano dodatnią korelację między wynikami sVEGFR-1 u kobiet w stopniu G1 a G3 złośliwości histologicznej. Z uwagi jednak na brak doniesień naukowych dotyczących oceny poziomu sVEGFR-1 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza nie porównano wyników badań niniejszej pracy z badaniami innych autorów.

W podsumowaniu wyników badań własnych można przyjąć, że oznaczanie sVEGFR-1 w surowicy jest badaniem przydatnym w ocenie klinicznej choroby nowotworowej chorych na raka piersi. Potwierdza to statystyczna zależność pomiędzy stężeniem tego receptora w surowicy w grupie badanych kobiet a czynnikami rokowniczymi, takimi jak: zaawansowanie kliniczne choroby, obecność przerzutów do węzłów chłonnych pachowych, stopień złośliwości guza i wielkość guza pierwotnego. Na tym etapie badań zwiększenie stężenia rozpuszczalnej formy receptora sVEGFR-1 jest trudne do wyjaśnienia. Można przypuszczać, że jest ono efektem mechanizmu obronnego ustroju, który w odpowiedzi na wzrost masy guza i zwiększone stężenie VEGF u kobiet chorych na raka zwiększa produkcję sVEGFR-1. Receptory sVEGFR-1 uważa się bowiem za naturalne inhibitory procesu angiogenezy.

Wydaje się, że udokumentowanie roli tych receptorów w angiogenezie nowotworowej pozwoli na opracowanie nowych strategii terapeutycznych w onkologii w celu przeciwdziałania wzrostowi guzów litych i powstawaniu przerzutów. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem w terapii rekombinowanej rozpuszczalnej formy Flk-1 (sFlk-1), silnie wiążącej się z receptorem lub specyficznego przeciwciała (scFv anty-KDR) blokującego połączenie VEGF/KDR/Flk-1. Strategie te wymagają jednak dalszych badań w dziedzinie biologii molekularnej i inżynierii genetycznej [32].

Podsumowanie

W surowicy kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego wykazano obecność rozpuszczalnej formy receptora sVEGFR-1 (sFlt-1). Stężenie (sVEGFR-1) było istotnie statystycznie większe w surowicy kobiet chorych na raka piersi w porównaniu ze stężeniem w grupie referencyjnej. Wydaje się, że dodatnia zależność pomiędzy stężeniem rozpuszczalnej formy receptora dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1) u kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego a zaawansowaniem klinicznym procesu chorobowego może stanowić cenne uzupełnienie oceny klinicznej kobiet chorych na ten nowotwór.

Piśmiennictwo

- Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol* 2001; 28: 536-42.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-93.
- Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1782-90.
- Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Rev* 2002; 2: 795-803.
- Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 109-18.
- Ferrara N, Gerger HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
- Breier G. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 553-9.
- Charnock-Jones DS. Vascular endothelial growth factors (VEGFs), their receptors and their inhibition. *Cell Transmissions. SIGMA* 2005; 21: 2-6.
- Wu H, Li Y, Zhu G, Zhang L, Zhang X, He X. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (Flt-1) in breast carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 708-11.
- Carmeliet Peter. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-60.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
- Yokoyama Y, Sato S, Futagami M, Fukushi Y, Sakamoto T, Umemoto M, Saito Y. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 413-8.
- Horing C, Weich HA. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999; 3: 33-9.
- Barleon B, Reusch P, Totzke F, et al. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 2001; 4: 143-54.
- Bussolati B, Dunk C, Grohman M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 2001; 159, 3: 993-1008.
- Wypych Agata, Zejda Jan E. Potrzeba badań przesiewowych raka piersi w Polsce. *Medycyna Środowiskowa* 2005; 8: 47-52.
- Kozaczka A, Woszczyk D, Najda J. Mechanizmy kontroli angiogenezy oraz ich wykorzystanie kliniczne w zaawansowanych przypadkach raka jelita grubego. *Współcz Onkol* 2004; 8: 373-8.
- Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor a critical cytokine in tumor angiogenesis and potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-80.
- Chin KF, Greenman J, Reusch P, Gardiner E, Marme D, Monson JR. Vascular endothelial growth factor and soluble Tie-2 receptor in colorectal cancer: associations with disease recurrence. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 497-50.
- Enjoji M, Nakamura M, Yamaguchi K, et al. Clinical significance of serum levels of vascular endothelial growth factor and its receptor in biliary disease and carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1167-71.
- Savropoulos NE, Bouropoulos C, Ioachim I E. Prognostic significance of angiogenesis in superficial bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 2004; 36: 45-48.
- Świdzińska E, Ossolińska M, Naumnik W, Łzycki T, Kucejko W, Chyżewska E. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF i rozpuszczalny receptor – sVEGFR-1 w surowicy chorych na raka płuca. *Pneumonol Alergol Pol* 2004; 72: 389-94.
- Thielemann A, Kopczyński Z, Grodecka-Gazdecka S, Piekarska B. Ocena stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) u chorych na raka gruczołu piersiowego. *Diagn Lab* 2005; 41: 154-64.
- Dales JP, Garcia S, Bonnie P. Prognostic significance of VEGF receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2 in breast carcinoma. *ANN Pathol* 2003; 23: 297-305.
- Korzeniewska M, Kołomecki K, Stępień H, Naze M, Stępień T, Kuzdak K. Ocena stężeń wybranych czynników pro- i antyangiogennych we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy. *Endokrynol Pol* 2005; 56: 39-44.
- Kumar H, Heer K, Greenman J, Kerin MJ, Monson JR. Soluble FLT-1 is detectable in the sera of colorectal and breast cancer patients. *Anticancer Res* 2002; 22: 1877-80.
- Toi M, Bando H, Ogawa T. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 98: 14-8.
- Belgore FM, Lip GY, Bareford D. Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, Flt-1, in hematological cancers: a comparison with breast cancer. *Am J Hematol* 2001; 66: 59-61.
- Wierzbowska A, Robak T, Wrześniak-Kuś A, Krawczyńska A, Lech-Marańda E, Urbańska-Ryś H. Circulating VEGF and its soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in patients with acute leukemia. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 149-53.

30. Bednarek W, Barczyński B, Kotarski J. Wartość prognostyczna sVEGFR-1 w przewidywaniu oporności na cisplatynę i paclitaxel u chorych na raka jajnika. *Prz Menopauz* 2005; 5: 65-71.
31. Myśliwiec P, Piotrowski Z, Zalewski B. Plasma VEGF-A and its soluble receptor R1 correlate with the clinical stage of colorectal cancer. *Rocznik Akademii Medycznej w Białymstoku* 2004; 49 suppl. 1: 85-7.
32. Opolski A, Wietrzyk J. Inhibitory neoangiogenezy w terapii przeciwnowotworowej. *Post Hig Med Dośw* 2001; 55: 369-85.

Adres do korespondencji

dr **Anna Thielemann**

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Łąkowa 1/2

61-878 Poznań

tel. +48 61 854 90 34

e-mail: anna.thielemann@oncology.am.poznan.pl