

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.11-006.04-085.277.3]-037-07

Абакумова Т.В.<sup>1</sup>, Генинг С.О.<sup>1,2</sup>, Долгова Д.Р.<sup>1</sup>, Генинг Т.П.<sup>1</sup>, Антонеева И.И.<sup>1,2</sup>, Полуднякова Л.В.<sup>1</sup>,  
Кузнецова Т.И.<sup>1</sup>, Дергунова Ю.А.<sup>1,2</sup>, Панченко Е.Г.<sup>1</sup>

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЁННЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ НА ФОНЕ ХИМИОТЕРАПИИ ПО СХЕМЕ AP

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», 432017, г. Ульяновск, Россия;

<sup>2</sup>ГУЗ «Ульяновский областной клинический онкологический диспансер», 432017, г. Ульяновск, Россия

*Антиангиогенная терапия диктует необходимость поиска молекулярных маркеров ангиогенеза при раке яичников (РЯ). Диагностическая и прогностическая роль сосудистого эндотелиального фактора роста А (VEGF-A) при РЯ сегодня спорна. Цель исследования – сравнительная оценка уровня фактора роста эндотелия сосудов VEGF в сыворотке крови, цитоплазматического содержания белка и транскрипта VEGF в опухолевой ткани первичных больных с распространённым РЯ и анализ взаимосвязи этих параметров с ответом на стандартную полихимиотерапию по схеме AP. Обследованы 82 первичные больные распространённым РЯ; в контрольную группу включили 30 здоровых женщин. Все пациентки после хирургического вмешательства получали адъювантную химиотерапию по схеме AP. Уровень VEGF-A в сыворотке определяли прямым иммуноферментным анализом Human VEGF ELISA Kit («RayBiotech», США). Анализ транскрипта VEGF в опухолевой ткани проводили методом RT-PCR с применением зондов TaqMan® Gene Expression Assay («Thermo Scientific», США), нормализацию данных проводили с применением генов-референта 18S и GAPDH. Для расчёта иммуногистохимического (ИГХ) балла цитоплазматической экспрессии VEGF проводили ИГХ-реакции в парных образцах пациенток с РЯ с применением антител («GeneTex», США). Для генотипирования ДНК пациенток использовали тест-системы по анализу функциональных полиморфизмов гена VEGFA C12143A, G634C («Синтол», г. Москва). Уровень VEGF-A в сыворотке крови больных РЯ был повышен по сравнению с нормой и зависел от ответа на химиотерапию по схеме AP. Однако специфичность этого показателя недостаточна для использования в прогностических целях. Не установлено значимых различий цитоплазматической экспрессии VEGF-A в зависимости от ответа на химиотерапию. Уровень мРНК VEGF повышен у 58% пациенток. Не выявлено корреляции между уровнями VEGF в сыворотке и транскрипта в опухолевой ткани. Генотипирование показало, что сочетание генотипов CC/GG снижает риск рецидива в 2,6 раза. Полученные результаты позволяют усомниться в ценности изучения сывороточного уровня VEGF для оценки чувствительности больных РЯ к антиангиогенным препаратам.*

**Ключевые слова:** рак яичников; фактор роста эндотелия сосудов; химиотерапия.

**Для цитирования:** Абакумова Т.В., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Антонеева И.И., Полуднякова Л.В., Кузнецова Т.И., Дергунова Ю.А., Панченко Е.Г. Фактор роста эндотелия сосудов у больных распространённым раком яичников на фоне химиотерапии по схеме AP. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 543-548. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-543-548>

*Abakumova T.V.<sup>1</sup>, Gening S.O.<sup>1,2</sup>, Dolgova D.R.<sup>1</sup>, Gening T.P.<sup>1</sup>, Antonееva I.I.<sup>1,2</sup>, Poludnyakova L.V.<sup>1</sup>, Kuznetsova T.I.<sup>1</sup>, Dergunova Yu.A.<sup>1,2</sup>, Panchenko E.G.<sup>1</sup>*

### THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN PATIENTS WITH ADVANCED OVARIAN CANCER ON THE BACKGROUND OF CHEMOTHERAPY ACCORDING TO THE AP SCHEME

<sup>1</sup>Ulyanovsk State University, 432017, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>Regional Clinical Oncologic Hospital, 432017, Ulyanovsk, Russia

*Antiangiogenic therapy requires to search for molecular markers of angiogenesis in ovarian cancer (OC). The diagnostic and prognostic role of VEGFA in OC is controversial today. The aim of the study was to compare the serum level of VEGF, the cytoplasmic protein content and VEGF transcript in the tumor tissue of primary patients with advanced ovarian cancer and to analyze the relationship between these parameters and the response to standard polychemotherapy using the AP scheme. 82 primary patients with advanced OC were included in the study. The control group included 30 healthy women. All patients received adjuvant chemotherapy according to the AP scheme after surgery. The serum VEGF-A level was determined by direct immunoassay analysis "Human VEGF ELISA Kit" ("RayBiotech", USA). Analysis of the VEGF transcript in tumor tissue was performed by PCR-RT using TaqMan® Gene Expression Assay (Thermo Scientific) probes, and for the data normalization the 18S and GAPDH referee genes were used. To calculate the IHC score of cytoplasmic expression of VEGF, immunohistochemical reactions were performed in paired samples of OC patients using antibodies (GeneTex, USA). For the genotyping of patients' DNA, test systems for the analysis of functional polymorphisms of the VEGF-A C12143A, G634C (LLC "Sintol", Moscow) were used. The level of VEGF-A in the serum of patients with OC was increased in comparison with the norm and depended on the response to chemotherapy according to the AP scheme. However, the specificity of this indicator is insufficient for use in prognostic purposes. There are no significant differences in the cytoplasmic expression of VEGF-A, depending on the response to chemotherapy. VEGF mRNA level was increased in 58% of patients. There was no correlation between serum VEGF levels and the transcript in the tumor tissue. Genotyping showed that the combination of genotypes of CC / GG reduces the risk of recurrence by 2.6 times. The results obtained make it possible to question the value of studying the serum level of VEGF for evaluating the sensitivity of patients with OC to anti-angiogenic drugs.*

**Key words:** ovarian cancer; vascular endothelial growth factor; chemotherapy.

**Для корреспонденции:** Генинг Татьяна Петровна, д-р биол. наук, зав. каф. физиологии и патофизиологии мед. факультета им. Т.З. Биктимирова Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; e-mail: [Naum-53@yandex.ru](mailto:Naum-53@yandex.ru)

**Conflict of interests.** *The authors declare the absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *This work was supported by Grant of the President of Russian Federation (МК-3196.2018.7).*

**Information about authors:**

Abakumova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>  
Dolgova D.R., <https://orcid.org/0000-0001-5475-7031>  
Antoneeva I.I., <https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>  
Kuznetsova T.I., <https://orcid.org/0000-0003-0909-734X>  
Panchenko E.G., <https://orcid.org/0000-0002-9158-2522>

Gening S.O., <https://orcid.org/0000-0001-6970-6659>  
Gening T.P., <https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>  
Poludnyakova L.V., <https://orcid.org/0000-0002-1096-444X>  
Dergunova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-7499-2650>

Received 28.05.2018  
Accepted 13.06.2018

Фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) играет существенную роль в реализации ангиогенеза в яичниках в норме и при патологии [1, 2]. При взаимодействии *VEGF* с рецептором запускается каскад вторичных мессенджеров, которые активируют факторы транскрипции. В результате иницируется генетическая программа ангиогенеза [3]. Семейство *VEGF* включает 5 представителей. *VEGF-A*, он же просто *VEGF*, был охарактеризован как фактор сосудистой проницаемости, и только впоследствии была открыта его митогенная активность в отношении эндотелиоцитов. В то же время он не стимулирует пролиферацию клеток других типов, активирует протеиназы, участвующие в деградации внутриклеточного матрикса, в активации матриксных металлопротеиназ, в результате чего высвобождаются мембраносвязанные проангиогенные факторы [4]. Существует мнение, что переход опухоли из скрытого состояния в активное происходит при приобретении клетками ангиогенного фенотипа в процессе их злокачественной трансформации [5].

Неопластические сосуды в отличие от нормальных характеризуются высокой проницаемостью, хаотичностью ветвления, переплетением, отсутствием структурированности сосудистой сети [6]. Считается, что *VEGF*, повышая внутриопухолевое давление, способствует проникновению опухолевых клеток в сосудистое русло [7] и нарушает поступление цитостатиков в опухоль [8]. В ряде исследований установлена повышенная экспрессия *VEGF* при различных локализациях опухоли [9, 10]. В настоящее время нет единого мнения относительно диагностической и прогностической роли *VEGF-A* при РЯ. Некоторые авторы утверждают, что есть положительная корреляция между уровнем экспрессии *VEGF* в первичных опухолях и вероятностью рецидивов, в том числе при РЯ, и что резистентность опухоли к химиотерапии при повышении экспрессии *VEGF* увеличивается [11, 12]. В то же время существуют данные о том, что в опухолях больных РЯ III–IV стадий до начала лечения экспрессия *VEGF* отсутствовала, а неоадьювантная химиотерапия (ХТ) влияла на уровень экспрессии *VEGF* [13]. Показано, что недостаточная чувствительность и специфичность теста на сывороточный уровень *VEGF* не позволяют рекомендовать его в качестве диагностического. Не обнаружено значимой корреляции между содержанием *VEGF* в сыворотке крови и ткани опухоли при раке почки [14].

Целью исследования была сравнительная оценка уровня *VEGF* в сыворотке крови, цитоплазматического содержания белка и транскрипта *VEGF* в опухолевой ткани первичных больных распространённым РЯ и анализ взаимосвязи этих параметров с ответом на стандартную полихимиотерапию по схеме AP.

*Материал и методы.* Обследованы 82 больные рас-

пространённым РЯ в возрасте 38–64 лет (медиана 53 года). У всех больных РЯ диагноз подтверждён гистологически. По гистотипу у большинства больных (68,8%) злокачественные опухоли представляли собой серозную аденокарциному, у 31,2% – эндометриоидную аденокарциному. Пациентки обследованы стандартно. Выявлен распространённый РЯ в III стадии ( $n = 56$ ) и в IV стадии ( $n = 26$ ). Все пациентки получали стандартную адьювантную химиотерапию по схеме AP (цисплатин плюс доксорубин) – 6 курсов после оперативного вмешательства в объёме оптимальной циторедукции. В зависимости от времени возникновения рецидива после последнего курса ХТ все пациентки были разделены на 3 группы: 1-я группа – с ранним рецидивом (до 6 мес), 2-я – с рецидивом в течение 6–12 мес и 3-я – без рецидива.

Кроме клинико-инструментального обследования (ультразвуковое исследование, компьютерная томография, гистологическое исследование биопсийного и операционного материала) у больных до начала лечения осуществляли забор крови для последующего определения концентрации *VEGF* в сыворотке и генотипирования. В контрольную группу для оценки уровня *VEGF* в сыворотке крови вошли 30 практически здоровых женщин-доноров в возрасте 23–65 лет (медиана 41 год). Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 3 от 15.03.2015 г.).

Уровень *VEGF* в сыворотке крови, полученной до начала химиотерапии, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human VEGF ELISA Kit («RayBiotech», США) на автоматическом планшетном фотометре PLATE SCREEN («Hospitex diagnostics», Италия).

Тотальная РНК выделена из 34 парных операционных образцов первичных больных с верифицированным диагнозом РЯ. РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции по P. Chomczynski & N. Sacchi (2006 г.) [15] с использованием реагента Extract RNA («Евроген», г. Москва). Реакцию обратной транскрипции проводили сразу после выделения тотальной РНК с использованием фермента обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей – MMLV-ревертазы, случайных праймеров (random hexamer) и компонентов набора MMLV RT Kit («Евроген») на амплификаторе нуклеиновых кислот CFX96 («BioRad», США). Для последующего анализа экспрессии гена *VEGF-A* методом PCR-RT использованы праймеры с зондом TaqMan® Gene Expression Assay Hs03929054\_s1 («Thermo Scientific», США). Для нормализации данных в качестве генов-реферери выбраны гены *18S* (Hs99999901\_s1) и *GAPDH* (Hs03929097\_g1). Для постановки полимеразной цепной

Уровень *VEGF* в сыворотке крови первичных больных раком яичников

Показатель	Контроль (n = 15)	3-я группа, без рецидива (n = 20)	2-я группа, рецидив в течение 6–12 мес (n = 24)	1-я группа, рецидив в течение 6 мес (n = 27)
VEGF, нг/мл	107,71 ± 20,952 (21,503–193,918)	1092,27 ± 206,110 (21,37–2701,82)	884,40 ± 318,696 (121,8–4691,28)	602,83 ± 150,504 (45,44–2501,95)
<i>p</i>		< 0,001	< 0,001	

реакции (ПЦР) использована готовая смесь qPCRmix-HS для работы с флуоресцентными зондами, содержащая смесь рекомбинантного фермента Taq ДНК-полимеразы и моноклональных антител (1 мкл на пробу). Протокол амплификации выглядел следующим образом: 95°C – 5 мин; 95°C – 20 с; 64°C – 20 с; 72°C – 45 с (повтор 45 циклов). Канал детекции – Fam.

Расчёт относительной экспрессии гена проводили по методу Pfaffl [16].

1) Рассчитывали медиану  $C_t$  по трём повторам для целевого гена (*VEGF-A*) и референсных (*18S* и *GAPDH*);

2) далее рассчитывали  $\Delta C_{t1}$  (для опухоли),  $\Delta C_{t2}$  (для условной нормы) и разницу между ними – значение  $\Delta\Delta C_t$ ;

3) относительную экспрессию рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ;

4) полученные данные представляли в виде десятичного логарифма для удобства анализа.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической ЭДТА-стабилизированной крови набором «ДНК-экспресс-кровь» («Литех», г. Москва). Генотипирование полиморфизмов C12143A (rs2146323), G634C (rs2010963) *VEGF-A* осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов производства «Синтол» на амплификаторе CFX96 с последующим анализом порогового цикла ( $C_t$ ) ПЦР-продуктов по каналам Fam (норма) и Hex (мутация) на основании сигнала положительных контролей.

ИГХ-исследование материала проводили на серийных парафиновых срезах по стандартной методике с использованием поликлональных кроличьих антител к *VEGF-A* (разведение 1:800, «GeneTex», США). Высокотемпературную демаскировку антигенов осуществляли при 98°C в цитратном буфере (pH = 6,0) в течение 30 мин. В качестве детекционной системы использовали N-Histofine Simple Stain Max PO Multi («Nichirei Biosciences Inc.», Япония). В качестве положительного контроля на *VEGF* использовали ткань почки практически здорового человека. Для оценки цитоплазматической экспрессии *VEGF-A* использовали индекс метки, высчитывая процент позитивно окрашенных опухолевых клеток от общего количества в зонах с наибольшим их содержанием (позитивной считали реакцию при коричневой окраске более 10% цитоплазмы клеток). Оценка иммуногистохимических реакций (ИГХ-балл) базировалась на интенсивности окрашивания (отсутствовала, слабая, умеренная, сильная) и разделении иммунопозитивных (положительных) клеток согласно рекомендациям D.J. Dabbs («Diagnostic immunohistochemistry», 4rd Edition, 2014) в модификации [17].

Статистическая обработка результатов включала тестирование распределения частот генотипов на соответствие равновесию Харди–Вайнберга, расчёт частот генотипов регуляторных регионов гена *VEGF-A*. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к развитию

патологии и последующего исхода заболевания судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR) и его 95% доверительного интервала (95% CI). Корреляционную связь между параметрами анализировали с применением коэффициента Спирмена, статистическую достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica 6.0. При изучении специфичности и чувствительности теста *VEGF* для дифференциации двух подгрупп методом ROC-анализа и расчёта безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Майера использовали ПО Statistika 8.0. Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тест  $\chi^2$ .

**Результаты.** В результате проведённых исследований нами установлено, что уровень *VEGF* в сыворотке крови первичных больных РЯ значимо повышен по сравнению с таковым в контрольной группе (табл. 1).

Наиболее выраженное повышение уровня *VEGF* имело место в 1-й группе у пациенток, которые не имели рецидива в течение 6 мес после последнего курса ХТ. Его медианный уровень у больных первичным РЯ был в 10 раз выше, чем в контрольной группе. Превышение во 2-й группе, у больных с рецидивом (6–12 и более мес) и в 1-й группе, у больных с ранним рецидивом (до 6 мес) после последнего курса ХТ составило соответственно 8,2 и 5,5 раза. Таким образом, полученные результаты показали значимое увеличение количества *VEGF* в сыворотке крови больных РЯ по сравнению с контролем. Однако специфичность данного маркера недостаточна для использования его в прогностических целях (рис. 1, а, б).

В связи с этим определённый интерес представляет связь показателей *VEGF* в периферической крови с экспрессией данного фактора роста в ткани опухоли. В результате ИГХ-определения содержания *VEGF* в опухолевой ткани и гистологически неизменной ткани яичников (рис. 2, а, б) у 29 обследованных больных РЯ не удалось установить значимых различий ИГХ-балла в зависимости от ответа на ХТ по схеме AP (5,545 у пациенток без рецидива и 5,125 – у пациенток с рецидивом). Расчёт критерия  $\chi^2$  также не дал статистически значимых различий ИГХ-балла в зависимости от ответа на ХТ.

Уровень мРНК *VEGF* был повышен в опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной тканью яичника у 58% пациенток. Статистически значимой корреляции между уровнем *VEGF* в сыворотке крови и экспрессией гена *VEGF* в опухолевой ткани не выявлено ( $r = -0,3$ ;  $p > 0,1$ ). Оценка периода безрецидивной выживаемости по уровню транскрипта *VEGF* в опухолевой ткани пациенток с РЯ после ХТ по схеме AP не выявила достоверно значимой разницы между группами с низкой и высокой экспрессией гена-мишени ( $p = 0,11$ ) (рис. 3).

При проведении молекулярно-генетического исследования по анализу генотипов полиморфного варианта

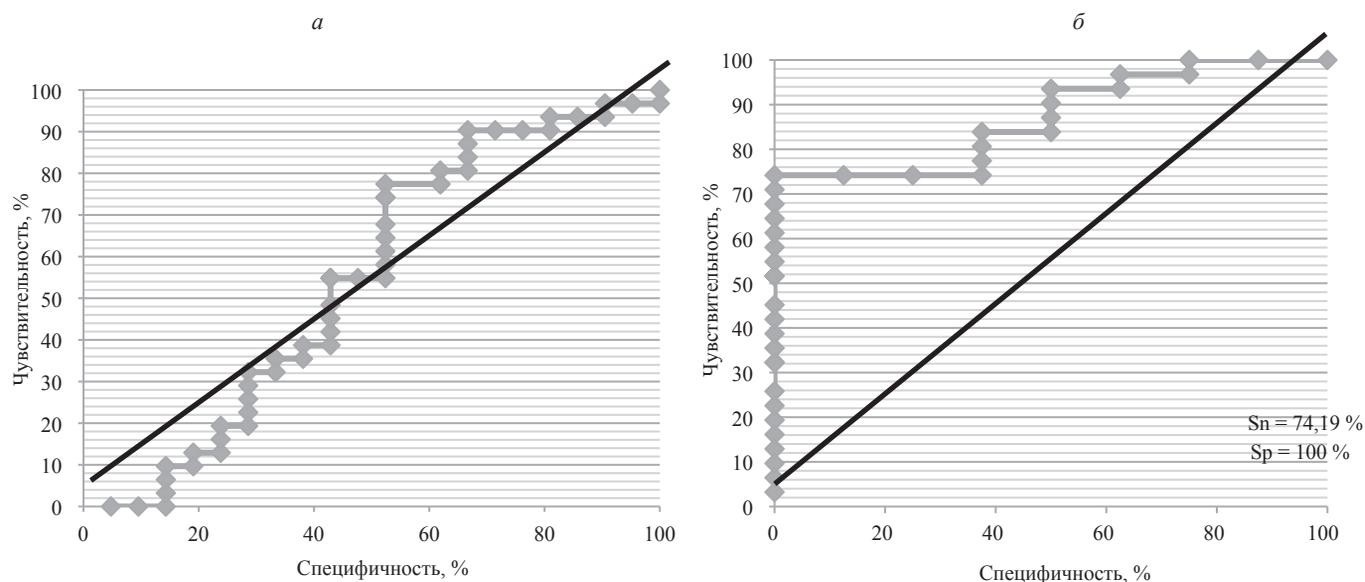


Рис. 1. Определение значимости классификатора *VEGF* при сравнении больных РЯ без рецидивов и с рецидивами в течение 6–12 мес после ХТ (а) и с контрольной группой (б) методом ROC-анализа.

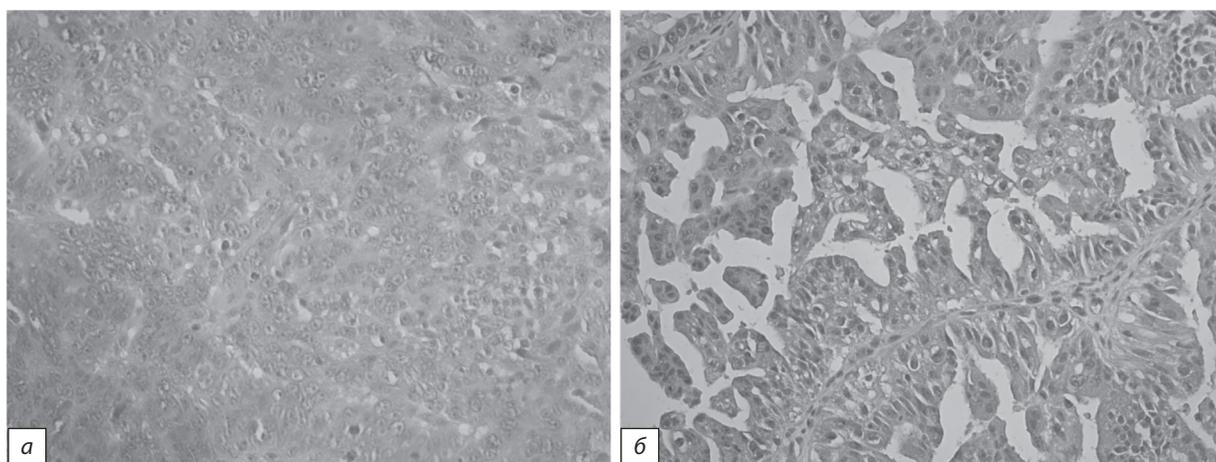


Рис. 2. Уровень экспрессии *VEGF*:

а – низкий уровень экспрессии *VEGF* в строме (ИГХ-балл 2); б – высокий уровень экспрессии *VEGF* в опухоли РЯ (ИГХ-балл 9).

rs2010963 *VEGF* нами установлено, что снижение экспрессии *VEGF*, связанное с заменой G в позиции 634 на C в промоторной части гена, выступает в качестве протективного фактора при развитии рецидива у пациенток с распространенным РЯ. Выявлено высокое отношение шансов (OR = 1,93;  $p = 0,09$ ) в группе пациенток с РЯ с носительством аллеля C (генотипы GC/CC) и с безрецидивным периодом более 12 мес после проведения стандартной ХТ (табл. 2).

Нами также была проанализирована ассоциация однонуклеотидной замены *VEGF* C12143A (rs2146323) с проявлением ранних рецидивов в выборке пациенток с РЯ. Показано, что минорный генотип AA чаще встречается у больных РЯ в группе с рецидивом, чем в группе пациенток с безрецидивным периодом в течение 12 мес после химиотерапевтического лечения (OR = 1,29;  $p = 0,87$ ). Проведение комплексного анализа двух генотипов *VEGF* (C12143A – G-634C) показало высокое

Таблица 2

Генотипы *VEGF*, ассоциированные с риском рецидивов у больных раком яичников после химиотерапевтического лечения по схеме AP

Полиморфизм гена <i>VEGF</i>	Генотипы	2-я группа, рецидив в течение 6–12 мес	3-я группа, пациенты с РЯ без рецидива	Отношение шансов (OR)	ДИ 95%	$p$
<i>VEGF</i> C-12143A rs2146323	AA	38% ( $n = 21$ )	30% ( $n = 18$ )	1,29	0,44– 3,78	0,87
<i>VEGF</i> G-634C rs2010693	GC/CC	34,3% ( $n = 30$ )	56,4% ( $n = 24$ )	1,93	0,91– 4,13	0,09
<i>VEGF</i> C-12143A: G-634C	CC-GG	27,8% ( $n = 18$ )	50,0% ( $n = 15$ )	2,60	0,52– 13,04	0,5

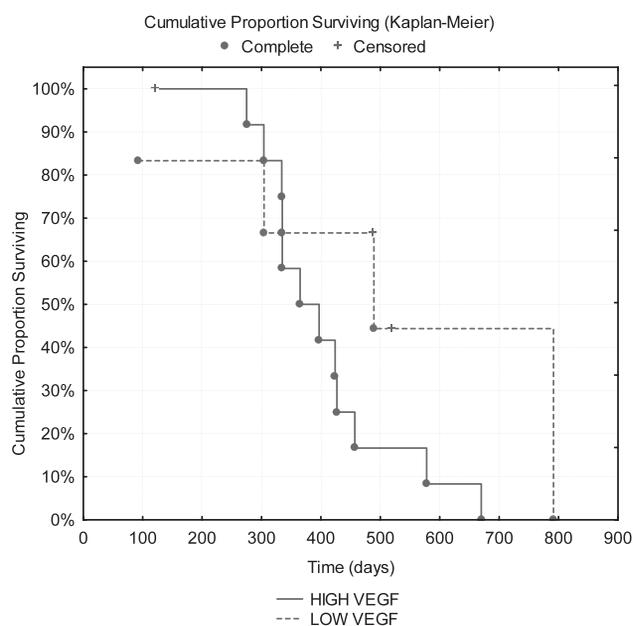


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость по Каплану-Майеру у пациентов с РЯ в зависимости от уровня транскрипта *VEGF* в опухоли.

значение OR (OR = 2,60 при  $p = 0,5$ ), свидетельствующее о высокой частоте встречаемости генотипов CC-GG в группе больных с РЯ без рецидивов в течение первого года после окончания адьювантной химиотерапии по схеме AP.

**Обсуждение.** Сравнительно недавно в обзорах результатов исследований постулировалась диагностическая и прогностическая роль циркулирующего *VEGF* у пациентов с различными типами рака [11, 12, 18]. Мы выявили значимое увеличение уровня сывороточного *VEGF* при РЯ, однако специфичность этого показателя была недостаточной для использования в прогностических целях, что также подтверждается рядом исследователей [19, 20]. При определении иммуногистохимически в опухолевой и гистологически неизменённой ткани яичника повышение уровня мРНК *VEGF* имело место только у 58% пациенток при отсутствии корреляции с уровнем *VEGF* в сыворотке крови и отсутствием значимой разницы показателей безрецидивной выживаемости между группами с низкой и высокой экспрессией гена-мишени.

Вероятно, следует согласиться с мнением авторов, утверждающих, что источником *VEGF* в периферической крови является не только его продукция тканью опухоли [14].

В ряде исследований оценивалась связь полиморфизма гена *VEGF* с риском развития и характером протекания РЯ [21, 22]. Ген *VEGF-A* у человека локализован на хромосоме 6p21.3, имеет 7 интронов и 8 экзонов и обладает около 140 полиморфизмами (SNP), которые влияют на проявление функциональной активности белка [23]. Экспериментальные данные показывают, что генетическая вариабельность в регуляторных областях гена *VEGF-A* может определять риски онкологических заболеваний, а также течение опухолевого процесса, регулируемое ангиогенезом [24]. Аллель G634C оказывает влияние на посттранскрипционном уровне, усиливая инициацию старт-кодона, приводящую к большей продукции *VEGF* [25]. Показано,

что при рефрактерном к препаратам платины РЯ при лечении бевацизумабом пациентки с генотипом СТ *VEGF* 936C/T имели лучшую медиану выживаемости PFS по сравнению с имевшими гомозиготные генотипы дикого типа (CC) и гомозиготный вариант (TT) [26]. В исследовании, проводившемся с 1985–1997 гг. с 319 первичными больными РЯ, изучена связь выживаемости с полиморфными вариантами гена *VEGF* rs833068 и rs2010963. Выявлено, что у носительниц минорного гомозиготного генотипа наблюдается значительное сокращение общей выживаемости в выборке австралийских пациенток. В эксперименте с анализом SNP *VEGF* rs3025033 и rs2146323 не выявлено статистически значимой ассоциации с выживаемостью пациенток Австралийской выборки [27]. При генотипе GG полиморфизма G-634C установлено повышение экспрессии гена *VEGF* за счёт активации промотора.

Показано, что при комбинации определённых генетических полиморфизмов *VEGF*, которые характеризуются высокой экспрессией продукта, можно предполагать/прогнозировать усиление ангиогенного ответа опухоли на стандартное лечение [25]. Мы показали, что сочетание генотипов CC/GG определяет снижение риска рецидива в 2,6 раза.

**Заключение.** При изучении уровня *VEGF* в сыворотке крови, генотипирования *VEGF*, цитоплазматической экспрессии и уровня мРНК *VEGF* в опухолевой ткани первичных больных РЯ и взаимосвязи этих показателей с ответом на стандартную ХТ по схеме AP установлено значимое повышение уровня *VEGF* в сыворотке крови у больных РЯ по сравнению со здоровыми. Его уровень зависел от ответа на ХТ по схеме AP. Не обнаружено значимой корреляции между уровнем *VEGF* в сыворотке крови и уровнем мРНК в опухолевой ткани. Полученные результаты позволяют предположить неопухоловое происхождение значительной части циркулирующего в крови *VEGF*, что делает сомнительной ценность исследования сывороточного *VEGF* для оценки чувствительности больных РЯ к антиангиогенным препаратам.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-3196.2018.7).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–5, 7–9, 11–12, 15–19, 21–27 см. REFERENCES)

- Антонеева И.И., Петров С.Б. Опухолевые сосуды при РЯ. *Медлайн-экспресс*. 2008; 4(198): 25-7.
- Чехонин В.П., Шейн С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль *VEGF* в развитии неопластического процесса. *Вестник РАМН*. 2012; 2: 23-33.
- Михановский А.А., Харченко Ю.В., Круговая И.Н., Данилюк С.В., Щит Н.Н., Федоренко Н.В., Теплова М.А. Биомолекулярные маркеры как факторы прогноза рака яичников III-IV стадий. *Международный медицинский журнал*. 2016; 22(3): 55-8.
- Гернштейн Е.С., Колпаков А.В., Бежанова С.Д., Морозов А.А., Алфёров А.А., Огнерубов Н.А., Казанцева И.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 536-41.
- Гернштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Терешкина И.В., Ермилова В.Д., Овчинникова Л.К., Галдава Д.Э., Кузнецова О.В. Фактор роста эндотелия сосудов и опухоли женской репродуктивной

системы. Часть 2. Рак яичников и эндометрия. *Онкогинекология*. 2015; 2: 4-11.

## REFERENCES

1. Araujo V.R., Duarte A.B., Bruno J.B., Lopes Pinho C.A., Figueiredo de J.R. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*. 2013; 21(3): 295-304.
2. Hyder S.M., Stancel G.M. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones. *Histol Histopathol*. 2000; 15(1): 325-34.
3. Rosen L.S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002; 9: 36-44.
4. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-76.
5. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*. 2004. 9(1): 2-10.
6. Antoneeva I.I., Petrov S.B. Tumor vessels in ovarian cancer. *Medlajnjekspress*. 2008; 4(198): 25-27. (in Russian)
7. Lee T.H., Avraham H.K., Jiang S., Avraham S. Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(7): 5277-84.
8. Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapt. *Nat Med*. 2001; 7(9): 987-9.
9. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in anti-angiogenic therapy. *Science*. 2005; 307(5706): 58-62.
10. Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Vestnik RAMN*. 2012; 2: 23-33. (in Russian)
11. Poon R.T., Fan S.T., Wong J. Clinical implications of circulating angiogenesis factor in cancer patients. *J.Clin.Oncol*. 2001; 19(4): 1207-25.
12. Toi M., Matsumoto T., Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive and therapeutic implications. *Lancet Oncol*. 2001; 2(11): 667-73.
13. Mikhanovskiy O.A., Kharchenko Yu.V., Krupova I.M., Danyliuk S.V., Shchyt N.N., Fedorenko N.V., Teplova M.A. Biomolecular markers as factors of prognosis of stage 3-4 ovarian cancer. *Mezhdunarodnyj meditsinskiy zhurnal*. 2016; 22(3): 55-8. (in Russian)
14. Gernshtein E.S., Kolpakov A.V., Bezhanova S.D., Morozov A.A., Alferov A.A., Ognerubov N.A., Kasantseva I.A., Kushlinskii N.E. The growth factor of endotelium of vessels and its receptors type I and II in blood serum in patients with kidney cancer: clinical morphological correlations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(9): 536-41. (in Russian)
15. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation: twenty-something years on. *Nat. Protoc*. 2006; 1(2): 581-5.
16. Plaffl M.V. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9): e45.
17. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications. 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier; 2010.
18. Pegram M.D., Reese D.M. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*. 2002; 3 (Suppl 11): 29-37.
19. Koukourakis M.J., Limbelis V., Tentes J., Kontomanolis E, Kortsaris A, Sivridis E, Giatromanolaki A. Serum VEGF levels and tissue activation of VEGFR2/VDR receptors in patients with breast and gynecologic cancer. *Cytokine*. 2011; 53(3): 370-5.
20. Gershteyn E.S., Koushlinitskiy D.N., Tereshkina I.V., Ermilova V.D., Ovchinnikova L.K., Galdava D.E., Kouznetsova O.V. Vascular Endothelial Growth Factor And The Tumors Of Female Reproductive System. Part II. Ovarian Cancer And Endometrial Cancer. *Onkoginekologija*. 2015; 2: 4-11. (in Russian)
21. Schneider B.P., Radovich M., Miller K.D. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Genetic Variability in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(17): 5297-5302.
22. Camerin G.R, Brito A.B, Vassallo J, Derchain S.F, Lima C.S. VEGF gene polymorphisms and outcome of epithelial ovarian cancer patients. *Future Oncol*. 2017; 13(5): 409-14.
23. Vincenti V., Cassano C., Rocchi M., Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996; 93: 1493-5.
24. Steffensen K.D, Waldstrøm M., Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. 2010; 117(1): 109-16.
25. Huez I., Bornes S., Bresson D. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol. Endocrinol* 2001; 15: 2197-210.
26. Hefler L.A, Mustea A., Kongsen D. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*. 2007; 13: 898-901.
27. Lose F., Nagle C.M, O'Mara T. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and ovarian cancer survival. *Gynecol Oncol*. 2010; 119(3): 479-83.

Поступила 28.05.18  
Принята к печати 13.06.18