

О Т З Ы В

официального оппонента по диссертации ПЕТРОСЯНА Арама Паруировича на тему: «Клиническое значение проангиогенных факторов и матриксных металлопротеиназ у больных раком желудка», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Рак желудка является одной из тех проблем современной клинической онкологии, при которой, несмотря на громадные материальные средства, вкладываемые в организацию первичной медико-санитарной помощи населению России, совершенствование организационных и медицинских мер, направленных на раннюю диагностику и повышение эффективности лечения онкологических заболеваний – в отношении рака желудка поставленные задачи не достигают своего решения. Так, в 2021 году из общего числа впервые выявленных больных со злокачественными новообразованиями, которое составило 580 415 человек, активное выявление больных раком желудка составило только 13,1%, удельный вес выявленных больных в ранних стадиях – 38,2%, III и IV стадии 60,7%. Одногодичная летальность 43,3%. Становится очевидным, что поиск новых маркеров, в том числе биохимических и молекулярно-генетических для ранней диагностики рака желудка и определения прогноза является важнейшей проблемой клинической онкологии. Поэтому избранная Арамом Паруиновичем Петросяном тема диссертационного исследования по определению клинического значения фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), растворимых форм его рецепторов 1 и 2 типа (sVEGFR1, sVEGFR2), а также матриксных металлопротеиназ 2, 7, 9 типа (MMP-2, MMP-7, MMP-9) в сыворотке крови больных раком желудка является **актуальной.**

Научная новизна выполненного исследования заключается в том, что впервые количественными иммуноферментными методами проведено сравнительное исследование спектра различных проангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, VEGFR2) и матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-7, MMP-9) в сыворотке крови больных первичным раком желудка до лечения и здоровых доноров и проанализирована их связь с основными клинικο-морфологическими характеристиками рака желудка и прогнозом.

Установлено, что по данным однофакторного анализа, уровни VEGF более 420 пг/мл, sVEGFR1 менее 94 пг/мл и sVEGFR2 свыше 9,0 нг/мл ухудшают безрецидивную и общую выживаемость больных раком желудка, при этом различия в общей выживаемости в зависимости от уровня VEGF в сыворотке крови значимы только в первые два года после начала лечения. А в отношении матриксных металлопротеиназ получены парадоксальные результаты, в соответствии с которыми более высокий уровень MMP-2, сниженной у больных раком желудка по сравнению с контролем, статистически значимо ухудшает общую

выживаемость пациентов, а для исходно повышенных MMP-7 и MMP-9, напротив, отмечены тенденции к ухудшению общей и безрецидивной выживаемости при более низких концентрациях в сыворотке крови. При этом, в многофакторной модели, включившей критерии системы TNM и пороговые уровни всех исследованных маркеров ангиогенеза и MMP, независимыми прогностическими факторами наряду с критерием T, оказались только уровни матриксных металлопротеиназ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные диссертантом расширяют представление о роли проангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, VEGFR2) и матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-7, MMP-9), характеризующих инвазивный и метастатический потенциал злокачественных опухолей, как маркеров в диагностике и оценке прогноза рака желудка. Многофакторный анализ с включением в модель критериев системы TNM, а также VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2 выделил как значимый независимый фактор прогноза общей выживаемости больных раком желудка критерий T ($p=0,001$) и концентрацию sVEGFR1 ($p=0,015$). Уровни VEGF и sVEGFR2 в сыворотке крови в этой модели не были независимыми факторами прогноза общей выживаемости.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованной литературы. Общий объем диссертации 165 листов машинописного текста, иллюстрирован 49 таблицами и 59 рисунками. Список литературы содержит 212 источников, 20 из которых - отечественных авторов.

Глава 1 «Проангиогенные факторы и матриксные металлопротеиназы при раке желудка (Обзор литературы)» состоит из 9 разделов, в которых приводятся и критически анализируются современные данные о роли проангиогенных факторов при онкологических заболеваниях, клиническом значении экспрессии VEGF, как в опухолевой ткани, так и циркулирующего в периферической крови больных раком желудка, о клиническом значении рецепторов VEGF при раке желудка, об анти-VEGF направленной терапии при раке желудка, моноклональных антителах, ингибиторах тирозинкиназы VEGFR, клиническом значении матриксных металлопротеиназ в инвазии и метастазировании рака желудка и как потенциальных мишеней для таргетной терапии. Диссертант ориентируется в литературных источниках, хорошо знает проблему, детально анализирует каждый литературный источник в сопоставлении с данными других исследователей, которые приведены в разделе «Список литературы».

Глава читается с большим интересом, содержит много самых последних исследований по проблеме молекулярных факторов и возможных биохимических механизмов, влияющих на развитие злокачественных опухолей, в т.ч. и на рак желудка. Замечаний не содержит.

В главе II «Материалы и методы исследования» приводится общая характеристика материала, характеристику лабораторных методов исследования и использованные для обработки материала статистические методы.

В основу рассматриваемой диссертации положены клинические материалы, полученные от 102 больных раком желудка, возраст которых составлял от 25 до 81 года, и находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с ноября 2016 года по декабрь 2019 года. У всех пациентов рак желудка выявлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования биопсии опухоли согласно Международной классификации опухолей желудочно-кишечного тракта ВОЗ. 4 пациента были обследованы в динамике – через 1 – 21 неделю после начала лечения. В группу контроля при исследовании различных показателей вошли 95 практически здоровых доноров в возрасте от 19 до 77 лет. Как больные исследуемой группы раком желудка, так и больные контроля - были тщательно обследованы в рамках цели и задач, поставленных в диссертации. Анализ больных проводился по возрастно-половому составу, по критериям классификации TNM и стадиям. В группе пациентов мужского пола реже выявляли начальные I-II стадии заболевания (18% и 13,6%, соответственно), по сравнению с женщинами (27,9% и 20,9% соответственно). В то же время IV стадию рака желудка обнаружили почти в 2 раза чаще у мужчин (35,6%), чем у женщин (18,6%). Преобладали пациенты с локализацией опухоли в теле желудка (48%), практически с одинаковой частотой в I (20,4%), II (20,4%) и IV (26,5%) стадиях опухолевого процесса, несколько чаще при III стадии (34,7%). Тотальное поражение опухолью желудка имело место в 63,6% (7/11) наблюдений при IV стадии заболевания, наиболее редко опухоль локализовалась в дистальном отделе желудка при IV стадии опухолевого процесса - 16,7% (3/18).

Лабораторные исследования уровней маркеров проводились в образцах сыворотки крови, забранной натощак, с помощью реактивов для прямого иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка полученных материалов проводилась с использованием прикладных программных пакетов Statistica 7.0, SPSS Statistics 21.

Глава III «Концентрации VEGF и его рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных раком желудка» состоит из трех разделов:

3.1 Концентрации VEGF в сыворотке крови больных раком желудка и в контроле;

3.2 Концентрации VEGF и его рецепторов в зависимости от пола и возраста обследованных в основных группах;

3.3 Концентрации VEGF и его рецепторов в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от клинических и морфологических характеристик заболевания

В первом разделе III главы было показано, что концентрации VEGF в сыворотке крови практически здоровых доноров группы контроля были статистически значимо ниже, чем у больных раком желудка, медианы маркера составили соответственно 275 и 419 пг/мл ($p < 0,0001$). При анализе концентрации sVEGFR1 в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и у больных раком желудка установлены статистически значимо большие концентрации sVEGFR1 в группе больных раком желудка (медиана 116 пг/мл) по сравнению с контролем (медиана 102 пг/мл; $p = 0,0029$). Не удалось найти пороговое значение sVEGFR1, приемлемым образом разделяющее группы больных раком желудка и здоровых доноров. Так, показателю чувствительности, равного 76,5% соответствовала специфичность 46,7%. Значению специфичности, равной 76,7% соответствовала чувствительность 32,4%. Таким образом, маркер sVEGFR1 не обладал диагностической ценностью у больных раком желудка. При анализе выявленных концентраций sVEGFR1 в сыворотке крови, ориентируясь на медиану и квартили в группе контроля, установили, что концентрации маркера менее 70 пг/мл не характерны для больных раком желудка (1,0%). У четырех больных раком желудка после проведенного лечения медиана концентрации sVEGFR1 заметно снизилась и составила 99,2 (квартили 76,5 и 128) пг/мл, и была сопоставима с таковым показателем в группе контроля. При сравнении концентраций sVEGFR2 в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и у больных раком желудка выявлены статистически значимо меньшие уровни рецептора в группе больных раком желудка (медиана 8,9 нг/мл) по сравнению с контролем (медиана 10,6 нг/мл; $p < 0,0001$). Также были получены данные о том, что показатель sVEGFR2 в сыворотке крови не обладал необходимой диагностической ценностью у больных раком желудка. У четырех больных раком желудка после проведенного лечения медиана концентрации sVEGFR2 в сыворотке крови практически не изменилась и составила 8,3 (квартили 7,5 и 9,7) нг/мл.

Установлено, что для больных раком желудка не характерны значения sVEGFR1 ≤ 70 пг/мл, тогда как для группы контроля не характерны значения VEGF > 688 пг/мл. Данное правило позволяет распознать с высокой вероятностью 33,3% здоровых доноров и 20,6% больных раком желудка при ошибке отнесения пациента к группе контроля в 1,0% и ошибке отнесения здорового донора к группе больных раком желудка в 4,6%.

Во втором разделе III главы «Концентрации VEGF и его рецепторов в зависимости от пола и возраста обследованных в основных группах» при расчете концентрации VEGF и его рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 в основных группах с учетом пола обследованных не выявлено статистически значимой связи всех исследованных в диссертации показателей ангиогенных факторов сыворотки крови с полом обследованных здоровых доноров и больных раком желудка. При расчете медианы концентрации VEGF и рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 в

основных группах с учетом возраста обследованных не выявлено статистически значимой связи всех показателей с полом обследованных больных раком желудка и здоровых доноров.

В третьем разделе III главы «Концентрации VEGF и его рецепторов в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от клинических и морфологических характеристик заболевания» - не установил статистически значимой связи статистически значимых для изученных показателей (VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2) с критерием T у больных раком желудка, однако следует отметить повышенные концентрации маркеров в группе пациентов с наибольшим размером первичной опухоли T4b.

Концентрации VEGF и рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 в сыворотке крови пациентов в зависимости от критерия N системы TNM не выявили значимых различий в концентрациях изученных проангиогенных факторов у больных раком желудка с учетом критерия распространенности опухолевого процесса. Если для рецептора sVEGFR1 отмечено его некоторое снижение концентрации в сыворотке крови по мере увеличения критерия N, уровни sVEGFR2 в сыворотке крови больных раком желудка не зависели от критерия N системы TNM. При расчете концентрации VEGF и его рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 в сыворотке крови пациентов в зависимости от критерия M системы TNM не установлено достоверных корреляций между системой TNM и уровнями концентрации VEGF и его рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2. Также не установлено достоверной корреляционной связи Концентрации VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2 в сыворотке крови больных раком желудка с учетом локализации опухоли в пораженном органе, её гистологическим строением и степенью дифференцировки.

Глава IV «Концентрации MMP-2, MMP-7, MMP-9 в сыворотке крови больных раком желудка» состоит из 4-х разделов:

- 1) Раздел «Концентрации MMP-2, 7 и 9 в сыворотке крови здоровых доноров и больных раком желудка»
- 2) Раздел «Концентрации MMP-2, 7, 9 в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и больных раком желудка с учетом данных анамнеза»
- 3) Раздел «Концентрации MMP-2, 7, 9 в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания»
- 4) Раздел «Связь концентраций VEGF и его рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 с уровнями MMP-2, 7, 9 одновременно измеренных в сыворотке крови больных раком желудка»

Проведенными исследованиями установлено, что концентрации MMP-2 в сыворотке крови больных раком желудка были статистически значимо ниже, чем в контроле. Показатель обладал выраженной диагностической ценностью, за пороговое значение выбран уровень MMP-2, равный 300 нг/мл. Чувствительность данного порога при разделении групп составила 89,1%, специфичность 81,7%. Однако концентрации MMP-2 не различались значимо в

сыворотке крови обследованных больных раком желудка по таким признакам как пол, возраст, критерий T и M, гистологическое строение опухоли, локализация опухоли в органе. Не установлено связи MMP-2 с концентрациями VEGF и его рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2. Но выявлено значимое увеличение концентраций MMP-2 при увеличении критерия N с 209 нг/мл при N0 до 245 нг/мл при N3. Также обнаружено статистически значимое увеличение концентраций MMP-2 при увеличении стадии заболевания с 201 нг/мл при Ia до 246 нг/мл при IIIc.

Анализ уровней MMP-7 в сыворотке крови больных раком желудка показал, что концентрации маркера у больных раком желудка были статистически значимо выше, чем в контроле и данный показатель обладал диагностической ценностью, за пороговое значение MMP-7 принят уровень маркера равный 3,8 нг/мл (чувствительность теста составила 80,4% при специфичности 77,9%).

Анализ коэффициента соотношений концентраций MMP-2, 7, 9 в сыворотке крови больных раком желудка показал, что для диагностики выше указанные маркеры высокоинформативным при выделении группы контроля от больных раком желудка, особенно соотношение MMP-2/MMP-7. Медианы этого коэффициента соотношения равнялись 283 в контроле и 41,6 в группе больных раком желудка ($p < 0,0001$). Чувствительность соотношения MMP-2/MMP-7 по порогу 100 равнялась 96,0%, специфичность 96,4%. Медианы соотношения MMP2/MMP-9 равнялись 0,61 в контроле и 0,26 в группе больных раком желудка ($p < 0,0001$). Медианы соотношения MMP-9/MMP-7 равнялись 445 в контроле и 135 в группе больных раком желудка ($p < 0,0001$). Чувствительность соотношения MMP-9/MMP-7 по порогу 150 составила 83,8%, специфичность 89,3%.

Глава V «Выживаемость больных раком желудка» состоит из четырех разделов.

1) Раздел «Общая выживаемость больных раком желудка в общей группе», в котором детально представлены отдаленные результаты лечения больных раком желудка. Из 102 больных раком желудка, включенных в исследование, отдаленные результаты прослежены у 99 больных. Пациенты прослежены на протяжении от 1 до 70 месяцев (медиана – 23,5 месяца). За весь период наблюдения от основного диагноза умерли 55 больных, что составило 55,6% от общего числа прослеженных. Продолжительность жизни умерших больных составила от 1 до 62,5 месяцев (медиана – 15,7 месяца). Общая 1-летняя выживаемость составила $82,3 \pm 4,0\%$, 2-летняя $61,4 \pm 5,3\%$, пятилетняя – $40,8 \pm 5,3\%$, медиана выживаемости – 31,1 месяца. Безрецидивную выживаемость удалось оценить только у 35 (34%) обследованных больных раком желудка. За весь период наблюдения рецидив заболевания зафиксирован у 18 больных, что составило 51,4% от общего числа пациентов с известным статусом рецидива.

Продолжительность безрецидивного периода составила от 3 до 36 месяцев (медиана – 12,0 месяца). Общая однолетняя безрецидивная выживаемость составила $73,5 \pm 7,6\%$.

2) Раздел «Общая выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации VEGF и его рецепторов VEGFR1, VEGFR2 в сыворотке крови», при многофакторном анализе связи трёх показателей (VEGF, sVEGFR1, sVEGFR с общей выживаемостью больных раком желудка было доказано, что, только sVEGFR1 является значимым независимым фактором прогноза длительности жизни больных раком желудка.

3) Раздел «Безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации VEGF и рецепторов VEGFR1, VEGFR2 в сыворотке крови» содержит оценку безрецидивной выживаемости на материалах, полученных только от 35 больных. Уровни VEGF и растворимых форм его рецепторов заметно влияют на безрецидивную выживаемость больных раком желудка и в наибольшей степени этот показатель ухудшается при высоких уровнях рецептора sVEGFR2. При многофакторном анализе ни один из исследованных маркеров не проявил себя как независимый фактор прогноза безрецидивной выживаемости.

4) Раздел «Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентраций MMP-2, 7, 9 в сыворотке крови пациентов» установил, что показатели общей выживаемости и безрецидивной выживаемости были ниже у больных с высоким (более 212 нг/мл) уровнем маркера, MMP-2 в сыворотке крови, чем у пациентов с более низкими показателями. Для MMP-7 и MMP-9 статистически значимых различий в общей и безрецидивной выживаемости больных раком желудка не выявлено.

В разделе диссертации «Обсуждение полученных результатов» диссертант оценивает полученные результаты в сопоставлении с результатами, представленными в мировой литературе. Очень сдержанно, выверенно и логически обоснованно представлены материалы в этой главе. Глава содержит глубокий анализ возможных путей диагностики и лечения онкологических заболеваний в ближайшей перспективе в свете полученных результатов. Глава читается с большим интересом.

В Заключении диссертантом подводятся краткие итоги выполненного научного исследования.

Выводы логически вытекают из полученных результатов выполненного исследования. Выводов 6 и замечаний они не вызывают.

Практические рекомендации содержат обоснованные предложения по применению матриксных металлопротеиназ 2 и 7 типа (MMP-2 и MMP-7) для повышения эффективности диагностики рака желудка, а в качестве дополнительных критериев прогноза – VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2 и MMP2.

