

На правах рукописи

ПЕТРОСЯН АРАМ ПАРУИРОВИЧ

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРОАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ И
МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2023 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН

Стилиди Иван Сократович

доктор биологических наук, профессор

Герштейн Елена Сергеевна

Официальные оппоненты

Сельчук Владимир Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии Государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский медицинский стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Сергеева Наталья Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативной терапии опухолей Московского научно-исследовательского института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенрадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «14» сентября 2023 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, Москва, Каширское шоссе, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

В настоящее время рак желудка занимает второе место в структуре заболеваемости у мужчин (10,5%) и четвертое – у женщин (7,0%) [Давыдов М.И. и соавт., 2015]. Более чем у 70% первично выявленных больных заболевание регистрируется при III-IV стадии, а отдаленные результаты лечения рака желудка продолжают оставаться неудовлетворительными. Показатели 5-летней выживаемости после радикальных вмешательств в большинстве клиник не превышают 36% [Скоропад В.Ю. и соавт., 2005; Стилиди И.С. и соавт., 2005].

С целью определения риска раннего метастазирования и прогноза рака желудка используют ряд клиничко-морфологических признаков первичной опухоли (глубина опухолевой инвазии в стенку желудка, гистологический вариант и степень дифференцировки новообразования, стадия заболевания по системе TNM и др.). Однако степень агрессивности опухоли не всегда определяется этими критериями, поэтому в настоящее время проводится активный поиск дополнительных молекулярно-генетических, биологических и биохимических маркеров, характеризующих агрессивный потенциал этих новообразований и предсказывающих высокий риск опухолевой прогрессии. Правильная оценка биологических факторов, коррелирующих с метастатическим и инвазивным потенциалом опухоли, прогнозом заболевания и продолжительностью жизни пациентов, особенно важна при ранних локализованных формах. Среди молекулярно-биологических показателей, которые могут влиять на клиническое течение рака желудка, особое место отводится поиску биологических маркеров, характеризующих ангиогенную и инвазивную активности опухоли [Liu J. et al., 2011; Ye Y. et al., 2014].

Несмотря на то, что интерес к этой проблеме неоангиогенеза возник более 30 лет назад, основной характеристикой его активности в опухолях долгое время оставалась микроскопическая оценка плотности сосудов в опухолевой ткани (индекс микрососудистой плотности в опухоли). Однако, в результате изучения молекулярных механизмов ангиогенеза было продемонстрировано наличие целого ряда регуляторных ангиогенных и антиангиогенных факторов, динамический баланс которых обеспечивает формирование и распространение новых сосудов внутри опухоли. Важнейшим положительным регулятором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов

(vascular endothelial growth factor – VEGF), называемый также фактором проницаемости сосудов. Уникальность этого белка заключается в том, что в отличие от всех других факторов роста он митогенен преимущественно по отношению к эндотелиальным клеткам (ЭК). На поверхности ЭК имеется три рецептора для VEGF, являющихся типичными рецепторными тирозинкиназами.

Классическая модель регуляции ангиогенеза в любой опухоли, в том числе и раке желудка, предусматривает наличие паракринной системы, в которой фактор роста (VEGF) продуцируется опухолевыми клетками, а его рецепторы, воспринимающие сигнал, находятся на ЭК сосудов. Показано, что как опухолевые, так и стромальные клетки, выделенные из первичных карцином желудка человека, продуцируют VEGF *in vitro*, и уровень его продукции значительно выше, чем у соответствующих клеток, выделенных из нормальной слизистой желудка [Takahashi S. et al., 2011]. По данным ряда авторов, VEGF и его рецепторы являются достаточно перспективными биомаркерами не только в качестве классических показателей опухолевого ангиогенеза, но и в качестве возможных факторов неблагоприятного прогноза заболевания.

В механизмах инвазии злокачественных опухолей активное участие принимают ассоциированные с опухолью матриксные металлопротеазами (ММР), разрушающие базальную мембрану, и внеклеточный матрикс (ВКМ), способствуя процессам инвазии и метастазирования [Duffy M. et al., 2004, 2008; Hanahan D. и Weinberg R.A., 2011; Е.С.Герштейн и соавт., 2007]. ММР представляют собой мультигенное семейство, важнейшими представителями которого являются желатиназы А и В (ММР-2 и ММР-9) и матрилизин (ММР-7), [Шадрина А.С. и соавт., 2017]. Для многих ММР показано увеличение экспрессии в опухолях различного генеза. В связи с этим в настоящее время их рассматривают в качестве возможных биологических маркеров, характеризующих основные клинико-морфологические особенности опухоли, ее биологическое «поведение», прогноз и лекарственную чувствительность. Полагают, что использование природных и синтетических ингибиторов ММР - перспективный подход к противоопухолевой терапии [Oba K. et al., 2002; Mimori K. et al., 2004].

Необходимость поиска новых методов оценки биологического поведения опухоли и более точного прогнозирования течения заболевания определяет актуальность изучения проангиогенных факторов и ММР, обуславливающих инвазивно-метастатический фенотип рака желудка.

Цель исследования

Изучить клиническое значение 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 и выявить их связь с клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом заболевания.

Задачи исследования

1. Исследовать содержание VEGF и растворимых форм его рецепторов 1 и 2 типа (sVEGFR1, sVEGFR2) в сыворотке крови больных раком желудка до лечения и сопоставить полученные результаты с соответствующими показателями здоровых доноров (группа контроля).
2. Исследовать содержание MMP-2, MMP-7 и MMP-9 в сыворотке крови больных раком желудка до начала лечения и сравнить полученные данные с соответствующими показателями в группе контроля.
3. Провести анализ взаимосвязи уровней сывороточных маркеров (VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2, MMP-2, MMP-7, MMP-9) с основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка (стадией заболевания, локализацией, гистологическим строением и степенью дифференцировки опухоли).
4. На основании анализа отдаленных результатов лечения больных раком желудка выявить наиболее значимые биологические маркеры в оценке прогноза общей и безрецидивной выживаемости.

Научная новизна

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 и здоровых доноров и проанализирована их связь с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания и прогнозом.

Выявлено, что концентрации ключевого активатора ангиогенеза VEGF в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо выше, чем у здоровых доноров группы контроля, обнаружены также статистически значимо более высокие

уровни sVEGFR1 и более низкие - sVEGFR2. Однако эти маркеры не обладают приемлемой диагностической ценностью и значимо не зависят от таких признаков как пол и возраст пациентов, стадия заболевания, локализация, гистологический вариант и степень дифференцировки опухоли.

Установлено, что концентрации MMP-2 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо ниже, чем в контроле и этот маркер обладает определенной диагностической ценностью: при пороговом уровне 300 нг/мл его чувствительность составляет 89,1%, специфичность - 81,7% относительно здорового контроля. Концентрация MMP-7 у больных раком желудка статистически значимо выше, чем в контроле, при этом MMP-7 при пороговом уровне 3,8 нг/мл имеет чувствительность 80,4% при специфичности относительно здорового контроля 77,9%. Значимых различий для MMP-9 не выявлено. Уровень MMP-2 повышается при увеличении стадии опухолевого процесса, а уровень MMP-9 значимо снижен при высокодифференцированной аденокарциноме по сравнению с менее дифференцированными вариантами.

Анализ показателей общей и безрецидивной выживаемости больных раком желудка, в зависимости от уровней проангиогенных факторов и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови позволил выделить следующие закономерности: 1. 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 2 года после начала лечения; 2) в отношении MMP 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 повышенной MMP-7 и MMP-9, напротив, отмечены тенденции к ухудшению общей и безрецидивной выживаемости при более низких концентрациях в сыворотке крови. В многофакторной модели, включавшей 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

Полученные данные 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.

Так, определение содержания MMP-2 и MMP-7 в сыворотке крови больных раком желудка может быть использовано в качестве дополнительного инструмента в диагностике этого заболевания, так как они обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью относительно здорового контроля. При этом уровни изученных маркеров в сыворотке разнонаправлено влияют на показатели выживаемости пациентов: высокие уровни VEGF, sVEGFR2, MMP-2 и низкие уровни sVEGFR1, MMP-7 и MMP-9 ухудшают безрецидивную и общую выживаемость больных раком 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. В более сложной модели, включавшей помимо показателей системы ангиогенеза также пороговые уровни всех исследованных MMP, независимыми прогностическими факторами наряду с критерием T оказались только уровни последних, но не маркеры системы ангиогенеза.

Таким образом, установлено, что исследованные проангиогенные факторы и MMP могут быть полезны для уточняющей диагностики и корректировки тактики послеоперационного лечения больных раком желудка.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является комплексное сравнительное исследование содержания проангиогенных факторов (VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2) и матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-7, MMP-9) в сыворотке крови больных раком желудка и здоровых доноров с помощью высокочувствительных иммуноферментных тест-систем с использованием современного оборудования. В диссертационном исследовании учитывали клиничко-морфологические особенности рака желудка на основании анализа общеклинических, инструментальных,

рентгенологических и гистологических данных и проводили статистический анализ показателей общей выживаемости первичных больных раком желудка с учетом клинко-морфологических факторов и изучаемых лабораторных маркеров – VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2, MMP-2, MMP-7 и MMP-9.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные 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. Определение содержания MMP-2 и MMP-7 в сыворотке крови больных может быть использовано в качестве дополнительного инструмента в диагностике этого заболевания, так как эти маркеры обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью относительно здорового контроля. Уровни изученных маркеров в сыворотке разнонаправлено влияют на показатели выживаемости пациентов: высокие уровни VEGF, sVEGFR2, MMP-2 и низкие уровни sVEGFR1, MMP-7 и MMP-9 ухудшают безрецидивную и общую выживаемость больных раком желудка. Таким образом, установлено, что исследованные проангиогенные факторы и матриксные металлопротеиназы могут быть полезны для уточняющей диагностики и корректировки тактики послеоперационного лечения больных раком желудка.

Личный вклад

Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор лично проводил набор материала и анализ историй болезни обследуемых пациентов. Диссертантом осуществлены статистическая обработка, анализ и интерпретация собранных материалов, сформулированы выводы и практические рекомендации, оформлена диссертационная работа.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («медицинские науки») и направлению исследований п.2. «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на

современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Положения, выносимые на защиту

1. Концентрации ключевого активатора ангиогенеза VEGF и растворимого рецептора sVEGFR1 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо выше, а содержание sVEGFR2 – ниже, чем у здоровых доноров группы контроля, однако эти маркеры не обладают диагностической ценностью и не связаны с основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка.

2. Концентрации MMP-2 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо ниже, а уровень MMP-7 выше, чем в группе контроля, и эти маркеры связаны с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Уровень MMP-9 не отличается от нормы. Определение MMP-2 и MMP-7 в сыворотке крови может быть использовано в уточняющей диагностике рака желудка: чувствительность MMP-2 при пороговом уровне менее 300 нг/мл составляет 89,1%, специфичность относительно здорового контроля - 81,7%; для MMP-7 при пороговом уровне более 3,8 нг/мл – соответственно, 80,4% и 77,9%.

3. На основании анализа показателей 5-летней общей и безрецидивной выживаемости больных раком желудка в зависимости от уровней проангиогенных факторов и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови можно рекомендовать исследование этих маркеров в качестве дополнительных прогностических факторов для корректировки тактики лечения. Наиболее значимыми критериями ухудшения выживаемости являются уровни VEGF более 420 пг/мл, sVEGFR1 - менее 94 пг/мл, sVEGFR2 - свыше 9,0 нг/м и MMP-2 более 212 нг/мл.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы по изучению роли проангиогенных факторов и матриксных металлопротеиназ апробированы и используются в практической деятельности лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для уточняющей диагностики и корректировки тактики послеоперационного лечения больных раком желудка, а также используются при обучении на циклах повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВО МГМСУ им. А.И.

Евдокимова Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции с участием онкологического отделения хирургических методов лечения №6 (абдоминальной онкологии), онкологического отделения хирургических методов лечения №7 (опухолей гепатопанкреатобиллиарной зоны), онкологического отделения хирургических методов лечения №5 (эндокринной онкологии), лаборатории клинической биохимии отдела клиничко-лабораторной диагностики НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, состоявшейся 2 ноября 2021 года.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на IV Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 3-5 октября 2018 г), IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (17-19 декабря 2018 г., Москва), XXIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Традиции и новации клинической лабораторной диагностики» (Москва, Крокус-Экспо, 20-22 марта 2018 г.); XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 12-14 мая 2021 г.).

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 4 печатных работы, из них 2 научные статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», глав «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя цитируемой литературы. Общий объем диссертации 165 листов машинописного текста, иллюстрирован 49 таблицами и 59 рисунками. Указатель литературы содержит 212

источников отечественных и зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1.2. Общая характеристика обследованных больных раком желудка и здоровых доноров

В исследование включено 102 больных раком желудка в возрасте от 25 лет до 81 года, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с ноября 2016 г. по декабрь 2019 г. У всех пациентов рак желудка выявлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли согласно Международной классификации опухолей желудочно-кишечного тракта (ВОЗ, 2019)].

Основные клиничко-морфологические характеристики обследованных пациентов представлены на рисунках 1 и 2.

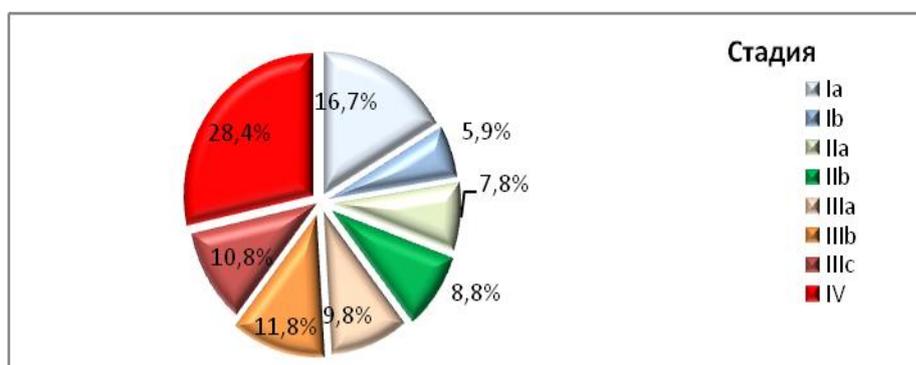


Рисунок 1 - Распределение больных раком желудка по стадиям опухолевого процесса



Рисунок 2 - Распределение больных раком желудка с учетом локализации (А) и степени дифференцировки и гистологического строения (Б) опухоли

95,1% пациентам проведено хирургическое лечение. Больные с III и IV стадиями опухолевого процесса получали комбинированную терапию.

Всего в группу контроля при исследовании различных показателей вошли 95 практически здоровых доноров в возрасте от 19 до 77 лет, медиана составила 47 лет, из них 30 (31,5%) мужчин и 65 (68,5%) женщин.

2.2. Лабораторные методы исследования

Содержание исследуемых маркеров определяли в образцах сыворотки крови, взятой у здоровых доноров и у больных раком желудка до проведения лечения. Образцы крови забирали натошак из кубитальной вены в пробирки с активатором свертывания и центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин, разливали на 3-4 аликвоты объемом 300-400 мкл в пластиковые пробирки и хранили при -40°C до проведения иммуноферментного анализа.

Использованы наборы для прямого иммуноферментного анализа: «Human VEGF Immunoassay», «Human VEGFR1 Immunoassay», «Human VEGFR2 Immunoassay», «Human/Mouse/Rat MMP-2 (total)», «Human MMP-7 (total)», «Human MMP-9 (total)» (Quantikine[®], R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание VEGF и sVEGFR1 выражали в пикограммах (пг); sVEGFR2, ММП-2, 7, 9 – в нанogramмах (нг) - на 1 мл сыворотки крови.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ клинико-лабораторных данных проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и SPSS 20. Если не указано иное, значения количественных признаков в таблицах приведены в виде: медиана (Me); нижний квартиль (Q1 - 25% выборки) - верхний квартиль (Q3 - 75% выборки). При сравнении и анализе взаимосвязи показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, тест корреляции рангов Спирмена (rs). Для расчета порогового уровня и оценки диагностической эффективности применялся метод построения ROC-кривых (Receiver Operating Characteristic). В однофакторном анализе общую выживаемость рассчитывали методом Каплана-Мейера; многофакторный анализ проводили с использованием регрессионной модели Кокса. Различия и корреляции

считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Содержание VEGF в сыворотке крови больных раком желудка и в контроле

Концентрации исследуемых маркеров ангиогенеза в сыворотке крови больных раком желудка и практически здоровых доноров представлены в таблице 1. Уровни VEGF и sVEGFR1 у первичных больных раком желудка статистически были значимо повышены по сравнению с контрольной группой: в 1,5 ($p < 0,001$) и в 1,2 раза ($p < 0,01$) по медиане, соответственно. Уровень sVEGFR2 у пациентов, напротив, был достоверно ниже, чем в контроле ($p < 0,001$).

Таблица 1 - Концентрация VEGF, VEGFR1, VEGFR2 в сыворотке крови здоровых доноров и больных раком желудка

Показатель	Рак желудка N = 102			Контрольная группа N = 65		
	Me	Min-max	Q1;Q3	Me	Min-max	Q1;Q3
VEGF пг/мл	418 ¹	9,3-1512	287;596	275	42,3-911	182;437
sVEGFR1 пг/мл	116 ²	54,5-1486	93,9;358	95,5	0-467	60,5;135
sVEGFR2 нг/мл	8,8 ¹	0,08-17,7	7,4;10,1	10,6	4,4-23,1	9,1;13,3

¹ – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ² – $p < 0,01$ по сравнению с контролем

Для VEGF наилучшее соотношение чувствительности (64%) и специфичности (65%) наблюдалось при пороговом уровне 347 пг/мл, что недостаточно для его использования в качестве диагностически значимого серологического маркера рака желудка. Кроме того, важно подчеркнуть, что повышение уровня VEGF, циркулирующего в периферической крови, отмечалось при опухолях различной локализации и гистогенеза (колоректальный рак, рак почки и др.) (Герштейн Е.С. и соавт., 2017; Kushlinskii N.E. et al., 2014), что также снижает диагностическую значимость этого теста.

Только у 36% больных раком желудка уровень sVEGFR1 превышал показатель 95% группы контроля (462 пг/мл). Даже при снижении специфичности до 70% (пороговый уровень – 126 пг/мл) чувствительность составила всего 40%, а при чувствительности 70% (пороговый уровень – 240 пг/мл) до 50% снижалась специфичность теста.

Наилучшее соотношение чувствительности (61,5%) и специфичности (70%) наблюдалось при пороговом уровне $sVEGFR2 \leq 9,35$ нг/мл. Таким образом, оба этих маркера также не являются диагностически значимыми, однако, как и VEGF, могут быть полезными для мониторинга пациентов с исходно повышенными (сниженными для $sVEGFR2$) показателями.

2. Содержание VEGF и его рецепторов в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от клинических и морфологических характеристик заболевания

Проанализирована взаимосвязь содержания VEGF, $sVEGFR1$ и $sVEGFR2$ в сыворотке крови с показателями распространенности рака желудка (Таблица 2).

Таблица 2 - Содержание VEGF, $sVEGFR1$, $sVEGFR2$ в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от показателей распространенности опухоли

Показатель распространности	N	VEGF пг/мл	VEGFR1 пг/мл	VEGFR2 нг/мл
Стадия				
IA	17	421; 295-554	114; 96,2-370	8,14; 7,12-11,0
IB	6	296; 255-378	274; 110-456	9,24; 8,37-11,0
IIA	8	443; 218-707	124; 116-194	8,22; 6,81-9,86
IIB	9	475; 288-813	112; 86,2-338	8,45; 6,37-9,64
IIIA	10	453; 297-700	104; 95,0-139	8,66; 7,99-9,49
IIIB	13	416; 317-645	125; 115-132	8,90; 7,85-10,13
IIIC	11	442; 357-728	119; 92,1-403	8,90; 7,32-10,88
IV	30	410; 251-490	101; 88,6-396	8,88; 8,51-10,73
Глубина инвазии первичной опухоли (T)				
T ₁	19	421; 281-554	119; 96-432	8,32; 7,12-11,04
T ₂	4	296; 266-346	131; 96-274	8,54; 7,07-10,53
T ₃	21	399; 315-611	118; 96-269	8,04; 6,81-9,78
T _{4a}	49	420; 252-676	110; 92-137	8,90; 7,89-9,99
T _{4b}	9	429; 357-618	334; 122-403	10,7; 8,27-12,51
Метастазы в лимфатических узлах (N)				
N ₀	51	380; 281-554	116; 93,9-386	8,52; 7,03-10,1
N ₁	17	421; 203-691	120; 105-396	8,76; 8,04-9,67
N ₂	22	416; 314-548	113; 86,8-126	9,22; 7,89-10,04
N ₃	12	607; 432-719	116; 92,1-145	8,91; 7,56-10,8
Отдаленные метастазы (M)				
M ₀	78	419 295-671	120 101-363	8,70 7,26-10,07
M+	24	417 272-490	93,9 86,82-122	8,89 8,54-10,99

¹ $p=0,04$ между группами N_0 и N_3 ; ² $p=0,01$ между группами M_0 и $M+$

Значимых взаимосвязей с такими показателями как локализация, гистологическое строение и степень дифференцировки опухоли, а также пол и возраст пациентов не выявлено.

Таким образом, продемонстрировано статистически значимое повышение уровня ключевого регулятора ангиогенеза VEGF, циркулирующего в периферической крови больных раком желудка, по сравнению со здоровым контролем. Уровень маркера повышался уже на самых ранних стадиях заболевания и не зависит от большинства показателей распространённости процесса. Уровень растворимых рецепторов VEGF изменялся разнонаправлено: sVEGFR1 повышался, тогда как sVEGFR2 – снижался. Оба показателя также значимо не зависели от распространённости рака желудка. Взаимосвязи сывороточных уровней маркеров ангиогенеза с гистологическим строением, степенью дифференцировки, локализацией рака желудка не выявлено.

3. Концентрации MMP-2, 7 и 9 в сыворотке крови больных раком желудка и здоровых доноров

Концентрации исследуемых белков в сыворотке крови больных раком желудка и практически здоровых доноров представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Концентрация MMP-2, MMP-7, MMP-9 в сыворотке крови здоровых доноров и больных раком желудка

Показатель	Рак желудка N = 102			Контрольная группа N = 58		
	Me	Min-max	Q1;Q3	Me	Min-max	Q1;Q3
MMP-2 нг/мл	212*	126-508	188;246	469	161-1594	346;650
MMP-7 нг/мл	5,1*	1,1-28,2	4,8;6,6	2,4	1,1-9,4	1,8;3,6
MMP-9 нг/мл	823	251-1974	632;1121	966	239-1732	756;1195

* – $p < 0,001$ по сравнению с контролем

Концентрация MMP-2 в сыворотке крови больных раком желудка была статистически значимо ниже, чем в контроле (медианы, соответственно, 212 нг/мл и 469 нг/мл; $p < 0,001$). С помощью построения кривых ROC за пороговое значение выбран уровень MMP-2, равный 300 нг/мл. Чувствительность данного порогового уровня при разделении групп больных раком желудка и здоровых доноров составила 89,1%,

специфичность - 81,7% .

Концентрация ММР-7 в сыворотке крови больных раком желудка была статистически значимо выше, чем в контроле (медианы, соответственно, равны 5,1 нг/мл и 2,4 нг/мл; $p < 0,001$). По кривой ROC оптимальное пороговое значение ММР-7, наилучшим образом разделяющее группы контроля и больных раком желудка составляло 3,8 нг/мл: чувствительность 80,4% при специфичности 77,9%.

Концентрации ММР-9 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо не отличалась от контроля (медианы, соответственно, 823 нг/мл и 966 нг/мл; $p < 0,001$). Маркер не является диагностически значимым.

4. Концентрации ММР-2, 7, 9 в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания

Взаимосвязь содержания ММР-2, ММР-7 и ММР-9 в сыворотке крови с показателями распространенности рака желудка, представлена в таблице 4.

Таблица 4 - Содержание ММР-2, ММР-7 и ММР-9 в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от показателей распространенности опухоли

Показатель распространности	N	ММР-2 нг/мл	ММР-7 нг/мл	ММР-9 нг/мл
Стадия				
IA	17	201; 162-352	4,3; 3,7-5,4	758; 489-1031
IB	6	202; 181-215	4,4; 3,7-5,0	472; 407-806
IIA	8	217; 200-260	6,5; 3,8-8,3	680; 411-1121
IIB	9	200; 174-211	5,1; 4,1-5,6	1053; 952-1190
IIIA	10	226; 198-254	5,8; 4,8-6,9	801; 469-997
IIIB	13	235; 232-248	6,8; 4,9-8,4	858; 712-1085
IIIC	11	246; 203-352	5,5; 4,5-5,9	793; 530-936
IV	30	202; 184-219	5,2; 4,0-6,6	981; 675-1241
Глубина инвазии первичной опухоли (T)				
T ₁	19	201; 163-263	4,1; 3,8-5,4	758; 489-1031
T ₂	4	202; 182-209	4,9; 4,3-8,1	472; 407-806
T ₃	21	217; 200-260	5,6; 4,0-7,0	758; 500-1053
T _{4a}	49	211; 188-236	5,6; 4,5-7,4	937; 751-1137
T _{4b}	9	246; 208-265	4,4; 4,0-4,7	668; 532-1226
Метастазы в лимфатических узлах (N)				
N ₀	51	209; 174-236	4,6; 4,0-6,0	732; 472-1121
N ₁	17	189; 181-225	4,9; 3,8-6,3	933; 668-1161

N ₂	22	232; 196-245	6,0; 4,0-8,4	944; 754-1127
N ₃	12	245; 204-356	5,7; 4,7-6,9	810; 639-110
Отдаленные метастазы (M)				
M ₀	78	215; 192-253	5,2; 4,1-6,3	793; 512-1053
M+	24	201; 175-222	5,1; 3,9-6,6	960; 668-1256

Выявлены следующие статистически значимые различия: 1) повышение медианы уровней MMP-2 с 201 нг/мл при Ia стадии до 246 нг/мл при IIIc стадии ($p=0,035$); 2) увеличение концентрации MMP-2 с 209 нг/мл при N1 до 245 нг/мл при N3 ($p=0,036$); 3) зависимость уровня MMP-7 от глубины инвазии первичной опухоли: медианы при T1 и T4a, соответственно, 4,1 нг/мл и 5,6 нг/мл ($p=0,02$).

Взаимосвязи концентраций MMP-2 и MMP-7 в сыворотке крови больных раком желудка с гистологическим строением и степенью дифференцировки опухоли не найдено. Медиана концентрации MMP-9 при высокодифференцированной аденокарциноме была статистически значимо ниже ($p=0,014$), чем при других вариантах степени дифференцировки опухоли.

5. Выживаемость больных раком желудка в зависимости от уровней исследованных маркеров в сыворотке крови

Отдаленные результаты лечения (общую выживаемость) удалось оценить у 101 больного раком желудка. Пациенты прослежены на протяжении от 1 до 70 месяцев (медиана – 23,5 мес). 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 мес). Безрецидивную выживаемость (БРВ) 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 месяцев).

5.1. Выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации VEGF и его рецепторов VEGFR1, VEGFR2 в сыворотке крови

В качестве порогового уровня для VEGF, по данным регрессионного анализа выбран показатель 420 пг/мл. На ранних сроках наблюдения превышение этого уровня

статистически значимо ухудшало общую выживаемость пациентов на 16% ($52,3 \pm 12,5\%$ против $68,2 \pm 7,8\%$ при более низких уровнях маркера; $p=0,024$). Однако выявленные на ранних сроках различия в выживаемости между группами при более продолжительном наблюдении нивелировались: 5-летняя выживаемость как больных с высоким уровнем VEGF, так и пациентов с низким уровнем маркера составила 47% (медианы, соответственно, 32 и 38 месяцев) (Рисунок 3).

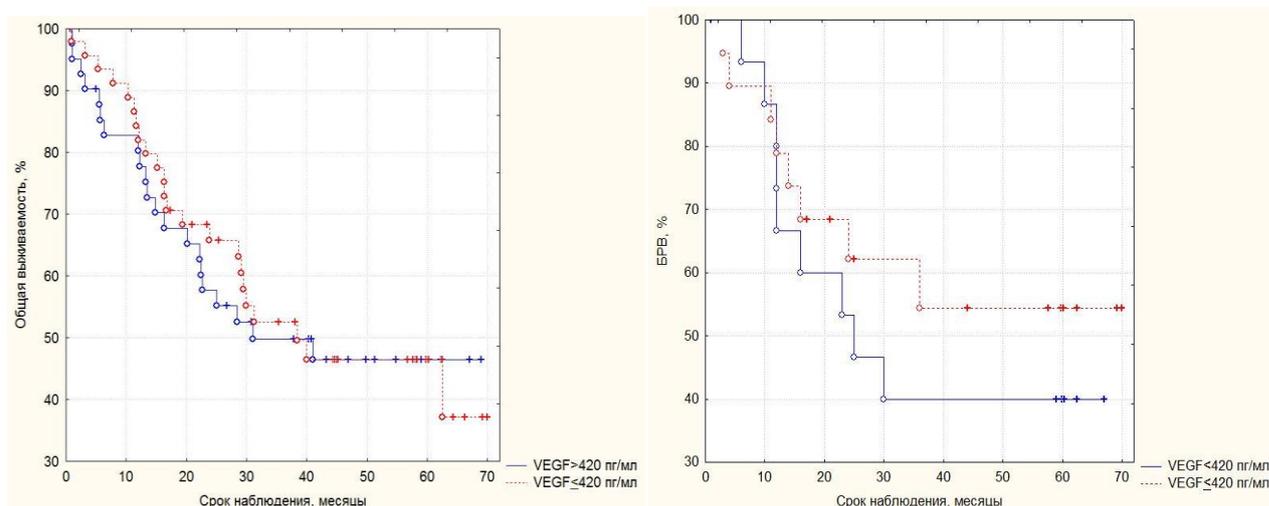


Рисунок 3 - Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации VEGF в сыворотке крови

5-летняя БРВ пациентов с высоким уровнем VEGF в сыворотке крови была на 14% хуже, чем у больных с более низким уровнем VEGF (40% и 54%, соответственно). В первом случае медиана БРВ не достигнута, во втором – составляла 26 месяцев ($p = 0,223$).

По результатам регрессионного анализа наиболее значимым пороговым уровнем для VEGFR1 оказался показатель 94 пг/мл, причем тенденция к снижению как общей, так и безрецидивной выживаемости наблюдалась при уровне маркера ниже этого порогового значения (Рисунок 4).

5-летняя общая выживаемость при низких уровнях sVEGFR1 составила всего 38% (медиана 30 месяцев), при высоких – 0% (медиана 40 месяцев). 5-летняя БРВ при низких уровнях маркера также была на 21% хуже, чем при более высоких ($p = 0,35$).

В качестве порогового уровня для sVEGFR2 выбран близкий к медиане показатель, равный 9 нг/мл (Рисунок 5).

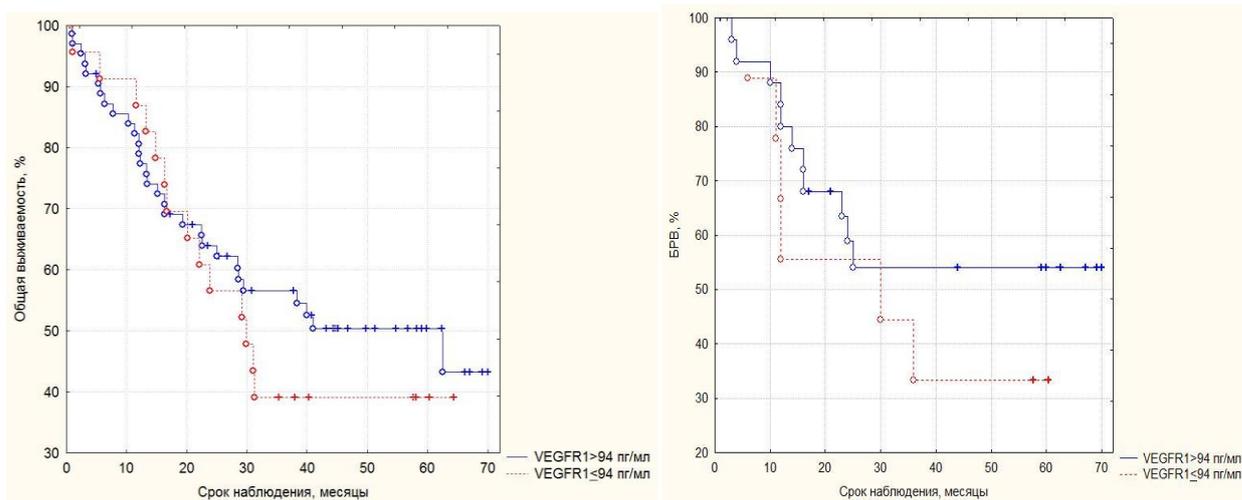


Рисунок 4 - Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации sVEGFR1 в сыворотке крови

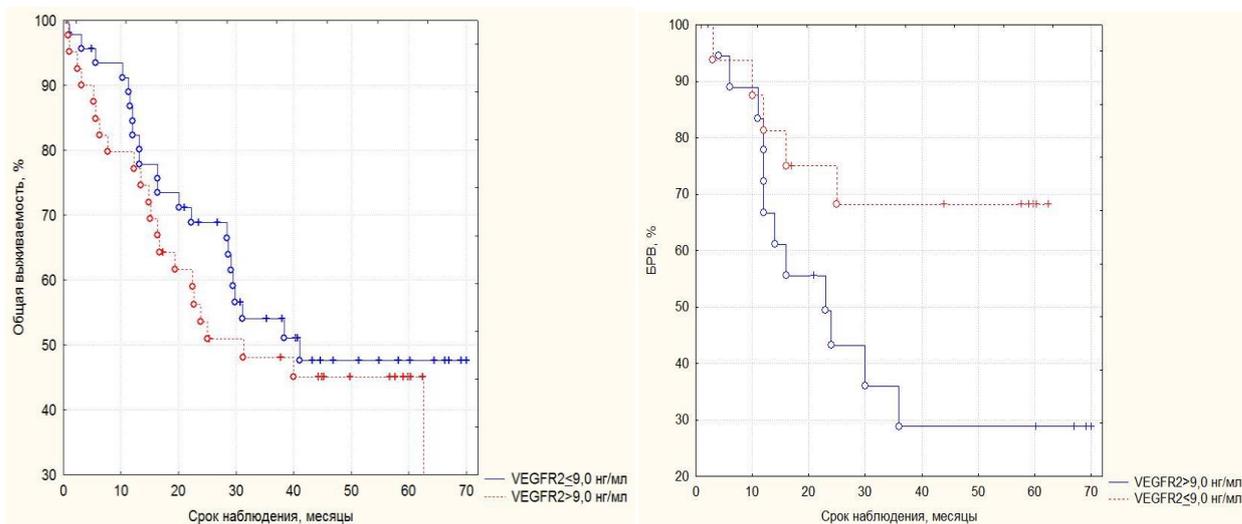


Рисунок 5 - Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации sVEGFR2 в сыворотке крови

Значимых различий в общей выживаемости отмечено не было, хотя на ранних сроках наблюдения выживаемость больных с низким уровнем маркера была лучше, чем у пациентов с высоким показателем sVEGFR2. При этом 5-летняя БРВ при уровне маркера более 9,0 нг/мл составила 28% с медианой 22,5 месяца, а при более низких концентрациях – 68%, медиана не достигнута ($p = 0,016$).

5.2. Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентраций MMP-2, 7, 9 в сыворотке крови пациентов

При оценке влияния уровней MMP в сыворотке крови на общую и безрецидивную

выживаемость больных раком желудка в качестве пороговых значений использовали показатели медианы концентрации соответствующего маркера в сыворотке крови пациентов (212 нг/мл для ММР-2; 5,1 нг/мл для ММР-7; 823 нг/мл для ММР-9).

Как показано на рисунке 6, общая и безрецидивная выживаемость пациентов была хуже у больных с высоким уровнем ММР-2 (более 212 нг/мл), чем у больных с более низкими показателями: в первой группе общая 5-летняя выживаемость составила 23% (медиана 28 месяцев), 5-летняя БРВ – 37% (медиана 30 месяцев); во второй группе соответствующие 5-летние показатели выживаемости составили 60% и 58%. Различия общей выживаемости статистически значимы ($p = 0,018$).

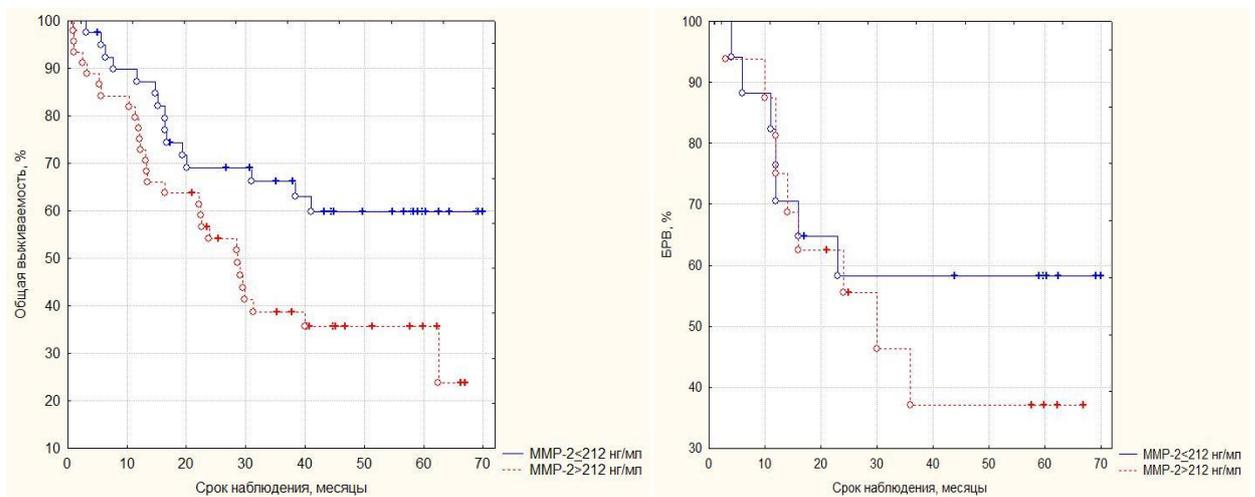


Рисунок 6 - Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации ММР-2 в сыворотке крови

Для ММР-7 статистически значимых различий в общей и безрецидивной выживаемости больных раком желудка не выявлено (Рисунок 7), однако в обоих случаях отмечалась тенденция к улучшению показателей при уровнях маркера выше медианного: в группе с высоким уровнем маркера общая 5-летняя выживаемость составила 50% (медиана 41 месяц), 5-летняя БРВ – 53%; в группе с низким уровнем ММР-7 соответствующие 5-летние показатели выживаемости составили 43 и 42% (медианы составили 28 и 23 месяца, соответственно).

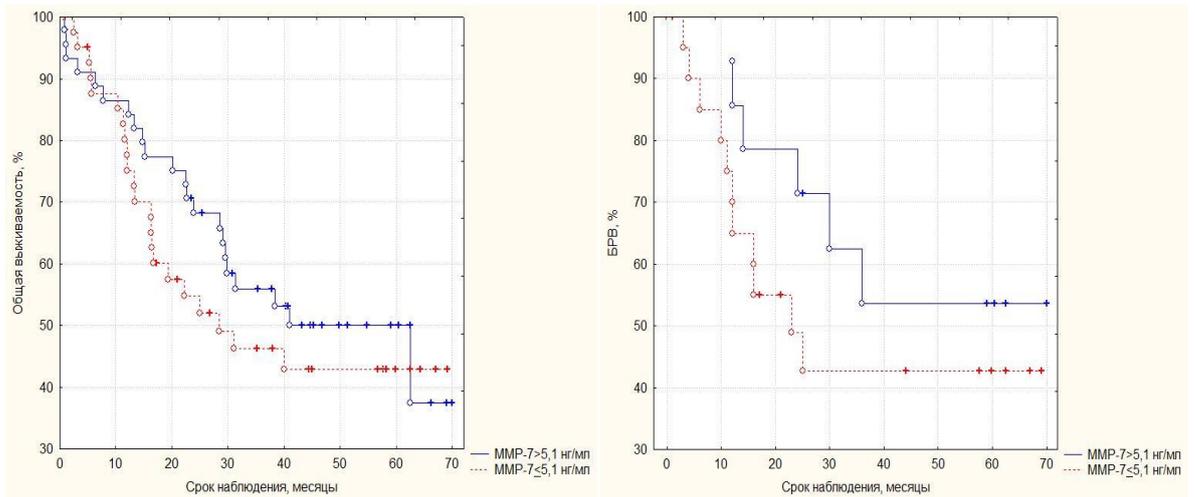


Рисунок 7 - Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации ММР-7 в сыворотке крови

Для ММР-9 также не выявлено статистически значимых различий в общей и безрецидивной выживаемости больных раком желудка (Рисунок 8), но отмечена тенденция к улучшению показателей при уровнях маркера выше медианного: в группе с высоким уровнем маркера общая 5-летняя выживаемость составила 50% (медиана 41 месяц), 5-летняя БРВ – также 50% (медиана 36 месяцев); в группе с низким уровнем ММР-7 соответствующие 5-летние показатели выживаемости составили 44%- и 45% (медианы равны 28 и 23 месяца, соответственно).

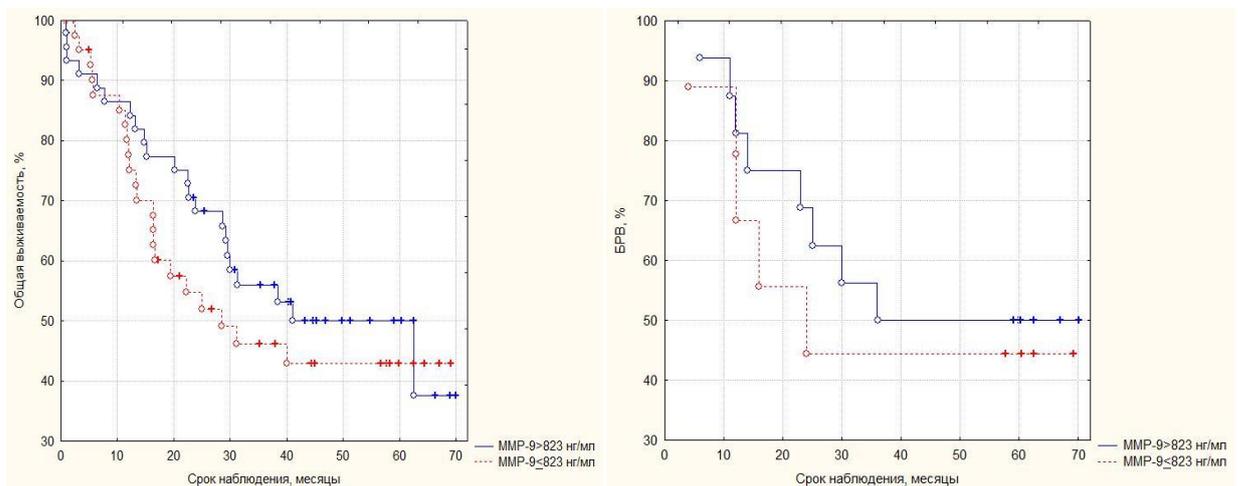


Рисунок 8 - Общая и безрецидивная выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации ММР-9 в сыворотке крови

Таким образом, при анализе влияния уровней исследованных ММР на выживаемость пациентов получены неоднозначные результаты, в соответствии с которыми более высокий уровень ММР-2, сниженной у больных раком желудка по

сравнению с контролем, статистически значимо ухудшает общую выживаемость, а для исходно повышенной MMP-7 и MMP-9, напротив, отмечены тенденции к ухудшению общей и безрецидивной выживаемости при более низких концентрациях в сыворотке крови.

В многофакторной модели, включавшей критерии системы TNM и пороговые уровни всех исследованных MMP и маркеров ангиогенеза (Таблица 5), независимыми прогностическими факторами наряду с критерием T оказались только уровни MMP, а уровень sVEGFR1 независимую прогностическую значимость утратил.

Таблица 5 - Результаты анализа Proportional hazard (Cox) regression

Признак	Beta	t-value	Wald	p
T	0,574430	2,84517	8,095005	0,004442
N	0,008179	0,72221	0,521590	0,470169
M	0,618754	1,55390	2,414612	0,120218
VEGF	0,170488	0,54192	0,293679	0,587876
VEGFR1	-0,008737	-0,02382	0,000568	0,980992
VEGFR2	0,156501	0,50578	0,255818	0,613012
MMP-2	0,727673	2,07739	4,315551	0,037773
MMP-7	-0,641932	-1,99409	3,976405	0,046150
MMP-9	-0,782153	-2,00930	4,037306	0,044513

Неоднозначность получаемых результатов многофакторного анализа говорит о необходимости проведения дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация ключевого активатора ангиогенеза VEGF в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо выше, чем у здоровых доноров (медианы 419 и 275 пг/мл, соответственно), однако этот маркер не обладает диагностической ценностью и не отражает основные клинико-морфологические характеристики заболевания.

2. Уровни sVEGFR1 (медиана - 116 пг/мл) в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо выше, а sVEGFR2 (медиана - 8,9 нг/мл) – ниже, чем в контроле (медианы, соответственно, 102 пг/мл и 10,6 нг/мл). Оба маркера не обладают

диагностической ценностью и не связаны с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания.

3. Концентрация MMP-2 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо ниже, чем в контроле (медианы 212 и 469 нг/мл, соответственно), и при пороговом уровне менее 300 нг/мл маркер обладает диагностической чувствительностью 89,1%, при специфичности 81,7% относительно здорового контроля. При этом уровень MMP-2 свыше 212 нг/мл значимо ухудшает общую выживаемость пациентов.

4. Концентрация MMP-7 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо выше, чем в контроле (медианы 5,1 и 2,4 нг/мл, соответственно); при пороговом уровне 3,8 нг/мл маркер обладает диагностической чувствительностью 80,4% при специфичности относительно здорового контроля 77,9%; уровень MMP-7 повышается при увеличении стадии опухолевого процесса.

5. Концентрация MMP-9 в сыворотке крови больных раком желудка статистически значимо не отличается от контроля (медианы 823 и 966 нг/мл, соответственно), маркер не обладает диагностической ценностью. При этом уровень MMP-9 значимо снижен при высокодифференцированной аденокарциноме по сравнению с умеренно и низкодифференцированными.

6. По данным однофакторного анализа, уровни VEGF более 420 пг/мл, sVEGFR1 менее 94 пг/мл и sVEGFR2 свыше 9,0 нг/мл ухудшают общую и/или безрецидивную выживаемость больных раком желудка, при этом различия в общей выживаемости в зависимости от уровня VEGF в сыворотке крови значимы только в первые 2 года после начала лечения. В многофакторной модели, включавшей критерии системы TNM и пороговые уровни всех исследованных маркеров ангиогенеза и MMP, независимыми прогностическими факторами, наряду с критерием T, оказались только уровни матриксных металлопротеиназ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение содержания матриксных металлопротеиназ 2 и 7 типа (MMP-2 и MMP-7) в сыворотке крови больных раком желудка может быть использовано в качестве дополнительного инструмента в диагностике этого заболевания, т.к. данные маркеры обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью относительно здорового контроля: чувствительность MMP-2 при пороговом уровне 300

нг/мл составляет 89,1%, специфичность относительно здорового контроля - 81,7%; для MMP-7 при пороговом уровне 3,8 нг/мл эти показатели составляют, соответственно, 80,4% и 77,9%.

2. На основании анализа показателей 5-летней общей и безрецидивной выживаемости больных раком желудка, в зависимости от уровней проангиогенных факторов и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови можно рекомендовать исследование этих маркеров в качестве дополнительных прогностических факторов для корректировки тактики лечения. Наиболее значимыми критериями ухудшения выживаемости являются уровни VEGF более 420 пг/мл, sVEGFR1 - менее 94 пг/мл, sVEGFR2 - свыше 9,0 нг/мл и уровень MMP-2 более 212 нг/мл.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Герштейн, Е.С. Компоненты сигнальной системы VEGF и матриксные металлопротеиназы в сыворотке крови больных раком желудка / Е.С. Герштейн, **А.П. Петросян**, О.И. Вашкетова, Н.Е. Кушлинский, И.С. Ситилиди // Материалы IV Российского конгресса лабораторной медицины Москва, 3-5 октября 2018 г. Лабораторная служба. — 2018. — Т.7, № 3. — С. 76.

2. Герштейн, Е.С. Сравнительная оценка содержания матриксных металлопротеиназ и компонентов сигнальной системы VEGF в сыворотке крови больных раком желудка / Е.С. Герштейн, **А.П. Петросян**, Н.Е. Кушлинский, И.С. Ситилиди Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. 17-19 декабря 2018 г., Москва/ // Успехи молекулярной онкологии. — 2018. — Т.5, №4. — С. 71.

3. Герштейн, Е.С. Фактор роста эндотелия сосудов и растворимые формы его рецепторов 1-го и 2-го типов при раке желудка / Е.С. Герштейн, Е.А. Короткова, **А.П. Петросян**, И.С. Стилиди, Н.Е. Кушлинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. — Т. 170, № 12. — С. 783-787 (журнал ВАК).

4. Герштейн, Е.С. Прогностическое значение компонентов сигнальной системы VEGF и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови больных раком желудка / Е.С. Герштейн, Е.А. Короткова, **А.П. Петросян**, Э.А. Сулейманов, И.С. Стилиди, Н.Е. Кушлинский // Клиническая лабораторная диагностика. — 2021. — Том 66, № 11. — С. 650-654 (журнал ВАК).