

На правах рукописи

ОЛЬШАНСКАЯ АННА СЕРГЕЕВНА

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ HIF-ЗАВИСИМЫХ
РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И ТИРОЗИНКИНАЗ У БОЛЬНЫХ РАКОМ
ПОЧКИ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – доктор биологических наук, академик РАН **Лукьянов Сергей Анатольевич**).

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Волкова Мария Игоревна

доктор медицинских наук, профессор

Хайленко Виктор Алексеевич

Официальные оппоненты:

Алексеев Борис Яковлевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по науке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Носов Дмитрий Александрович, доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующий онкологическим отделением противоопухолевой лекарственной терапии (с дневным стационаром) федерального государственного бюджетного учреждения «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «04» марта 2021 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 202_ года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Почечно-клеточный рак (ПКР) является наиболее распространенной опухолью почечной паренхимы. Изучение молекулярно-генетических особенностей ПКР позволило выделить несколько основных вариантов опухоли. Наиболее распространенным и изученным является светлоклеточный рак почки, ассоциированный с высокой частотой мутаций гена фон Гиппеля-Линдау (VHL), инактивация которого приводит к экспрессии гипоксия-индуцированных факторов и их мишеней, прежде всего, ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (РТК). Ключевыми HIF-зависимыми сигнальными путями, индуцирующими рост, размножение опухолевых клеток и ангиогенез при раке почки, являются сосудистый эндотелиальный фактор роста и его рецепторы (VEGF/VEGFR), фактор роста фибробластов и его рецепторы (FGF/FGFR) фактор роста тромбоцитарного происхождения и его рецепторы (PDGF/PDGFR). Подавление HIF-зависимых ростовых факторов и их РТК лежит в основе большинства режимов современной таргетной терапии ПКР.

Несмотря на то, что воздействие на HIF-зависимые сигнальные пути уже пришло в клиническую практику, особенности экспрессии и прогностической роли ростовых факторов и РТК у больных ПКР практически не изучены. Завершенные работы, как правило, посвящены исследованию РТК на опухолевых клетках. В доступной нам литературе мы не обнаружили данных об экспрессии РТК на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, и лимфоцитах периферической крови. Кроме того, отсутствуют комплексные исследования, направленные на изучение коэкспрессии VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR при раке почки.

Мы полагаем, что факты, изложенные выше, являются достаточным основанием для инициации комплексного исследования HIF-зависимых ростовых факторов и их РТК у больных ПКР.

Цель исследования

Изучить экспрессию и прогностическую роль HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ для улучшения прогноза больных раком почки путем индивидуализации лечебного подхода.

Задачи исследования

1. Изучить экспрессию HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) в клетках первичной опухоли, опухолевого тромба и метастазов у больных раком почки.

2. Оценить корреляцию уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) в клетках первичной опухоли, опухолевого тромба и метастазов с характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки.

3. Исследовать влияние экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) в клетках первичной опухоли, опухолевого тромба и метастазов на выживаемость больных раком почки.

4. Изучить экспрессию HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) на опухолеинфильтрирующих лимфоцитах у больных раком почки.

5. Оценить корреляцию уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) на опухолеинфильтрирующих лимфоцитах с характеристиками опухолевого процесса и прогнозом больных раком почки.

6. Изучить и сравнить экспрессию HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) на периферических лимфоцитах у больных раком почки и здоровых доноров.

7. Оценить корреляцию уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) на лимфоцитах периферической крови с характеристиками опухолевого процесса и прогнозом больных раком почки.

8. Исследовать динамику экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) на периферических лимфоцитах у больных раком почки до и после удаления первичной опухоли.

Методы и методология исследования

В исследование включено 65 больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+, подвергнутых нефрэктомии. Всем больным выполнена нефрэктомия с расширенной забрюшинной лимфодиссекцией. В 50 (76,9%) случаях объем операции также включал тромбэктомию. Хирургическое лечение было радикальным в 40 (61,5%) наблюдениях и имело циторедуктивный характер в 25 (39,5%) случаях. На операционном материале 65 больных, иммуногистохимическим методом, проведено исследование экспрессии молекулярно-биологических маркеров: VEGFA, FGF2, VEGFR-1, -2, -3; PDGFR α,β ; FGFR-1,-2. Оценено влияние экспрессии данных маркеров на клинико-морфологические показатели и выживаемость пациентов. В отдельном разделе работы проанализирована экспрессия HIF-зависимых рецепторных тирозинкиназ на периферических лимфоцитах крови 10 здоровых доноров и 19 больных раком почки.

Научная новизна

В диссертационном исследовании впервые продемонстрировано, что в клетках опухоли, опухолевого тромба, метастазов, а также на опухоль-инфильтрирующих (TIL) и периферических лимфоцитах больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ экспрессируются HIF-зависимые ростовые факторы и РТК VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGFR. Доказано, что экспрессия всех изученных ростовых факторов и РТК прямо взаимосвязана друг с другом ($p < 0,05$). Впервые выявлена достоверная корреляция уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и РТК в клетках опухоли любой локализации и на TILs высокой степенью анаплазии опухоли и значительной распространенностью опухолевого процесса. Продemonстрировано, что на выживаемость всех пациентов с ПКР влияют гиперэкспрессия VEGFR-2 и FGFR-2 в клетках первичной опухоли ($p < 0,05$), а оперированных больных раком почки с опухолевым венозным тромбозом – коэкспрессия VEGFR-1 в клетках опухоли почки, VEGFR-2 и VEGFA в клетках опухолевого тромба ($p = 0,004$). Впервые выявлено снижение экспрессии РТК на лимфоцитах периферической крови при ПКР. Доказано, что низкая экспрессия РТК на периферических лимфоцитах у больных раком почки до лечения коррелировала с высокой категорией T и наличием опухолевого венозного тромбоза. Продemonстрировано, что у больных раком почки через 180 суток после нефрэктомии отмечается достоверное нарастание экспрессии РТК на лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$ для всех).

Теоретическая и практическая значимость

Высокая теоретическая значимость работы основана на получении результатов комплексной оценки экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и РТК в клетках опухоли, опухолевого тромба, метастазов, а также на ТИЛи периферических лимфоцитах у больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+.

Практическая значимость исследования заключается в выделении пограничных уровней экспрессии VEGFA, VEGFR-1, VEGFR-2 и FGFR-2 в клетках ПКР, что может быть использовано в клинической практике для определения прогноза заболевания.

Практическое приложение могут найти результаты дальнейших исследований динамики экспрессии РТК на периферических лимфоцитах. Полученные нами данные открывают перспективу разработки маркера, который мог бы использоваться для диагностики и наблюдения за больными ПКР.

Личный вклад

Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, посвящённой изучаемой в представленной работе проблеме. Автор лично принимал участие в лечебном процессе у группы пациентов, вошедших в исследование и лабораторных исследованиях. Автором разработан дизайн работы, произведен сбор данных на основе медицинской документации, определены факторы для создания базы данных и сформированы электронные таблицы для проведения статистического анализа. Автором проведена статистическая обработка и интерпретация данных, полученных в результате исследования. Автором оформлена диссертационная работа и сформулированы выводы.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки») и области исследований п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

Положения, выносимые на защиту

На поверхности и в цитоплазме клеток первичной опухоли больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ обнаружена экспрессия ростовых факторов VEGFA (32,4 HS) и FGF2

(44,2 HS), а также РТК VEGFR-1 (97,2 HS), VEGFR-2 (39,2 HS), PDGFR β (26,6 HS), PDGFR α (62,9 HS), FGFR-1 (7,5 HS) и FGFR-2 (46,6 HS). Экспрессия всех изученных ростовых факторов и РТК прямо взаимосвязана друг с другом ($p < 0,005$ для всех).

Отмечена достоверная корреляция гиперэкспрессии изучаемых маркеров с высокой степенью анаплазии опухоли G3-4 (FGF2, VEGFR-1, -2; PDGFR α , β) и значительной распространенностью опухолевого процесса: категорией pT3-4 (VEGFR-1 и -2), опухолевой инвазией паранефрия (VEGF, VEGFR-1, FGF2, FGFR-2), опухолевой венозной инвазией (VEGFR-1 и -2), протяженностью опухолевого тромбоза (PDGFR β), опухолевой инвазией венозной стенки (FGFR-2), категориями pN+ (PDGFR α) и M+ (PDGFR β), развитием множественных метастазов (VEGFR2), метастазированием в надпочечники (VEGF, VEGFR-2, PDGFR β и FGFR-1) и печень (FGF2, VEGFR-1 и FGFR-2) ($p < 0,05$ для всех).

В однофакторном анализе отмечено значимое неблагоприятное влияние на специфическую выживаемость гиперэкспрессии VEGFR-2 ≥ 100 HS ($p < 0,0001$) и FGFR-2 ≥ 80 HS ($p = 0,014$). В регрессионном анализе гиперэкспрессия VEGFR-2 имела тенденцию к независимому влиянию на специфическую выживаемость (HR 2,4 (95% CI: 0,9-6,5); $p = 0,081$) наряду с такими общепризнанными факторами риска, как степень анаплазии G3-4 (HR 1,7 (95% CI: 1,0-3,1); $p = 0,072$) и опухолевый венозный тромбоз (HR 6,2 (95% CI: 0,8-49,1); $p = 0,082$).

Клетки ПКР, формирующие опухолевый тромб, характеризуются меньшим уровнем экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2, а также РТК VEGFR-1, -2; PDGFR α , FGFR-1, -2 по сравнению с клетками первичной опухоли почки. Инвазия опухолевого тромба в венозную стенку ассоциирована с гиперэкспрессией VEGFR-1 и FGFR-2 в клетках внутрисосудистой опухоли. В однофакторном анализе выявлено неблагоприятное влияние на ОВ пациентов, подвергнутых нефрэктомии, тромбэктомии, гиперэкспрессии VEGFR-1 ≥ 90 HS в клетках первичной опухоли, а также тенденция к снижению ОВ при гиперэкспрессии VEGFR-2 ≥ 40 HS и экспрессии VEGFA < 15 HS в клетках опухолевого тромба. Однолетняя выживаемость пациентов с ≥ 2 факторами риска составила 27,3%, < 2 факторов риска – 87,5% ($p = 0,004$).

Клетки метастазов рака почки экспрессируют ростовые факторы VEGFA и FGF2, а также РТК VEGFR-1, -2, -3; PDGFR α, β ; FGFR-1, -2. Клетки метастатических очагов имеют меньший уровень экспрессии VEGFA и FGF2, а также VEGFR-1 и VEGFR-3 по

сравнению с первичной опухолью почки ($p < 0,05$ для всех). Гиперэкспрессия ростовых факторов и их рецепторных опухолевыми клетками ассоциирована с неблагоприятным течением опухолевого процесса. Гиперэкспрессия PDGFR α в клетках опухоли почки коррелирует с категорией pT, повышенная продукция FGF2 в клетках метастаза – с опухолевой инвазией паранефрия и степенью анаплазии G, гиперэкспрессия VEGFR-2 в клетках метастаза – с метастатическим поражением более одного органа ($p < 0,05$ для всех). Уровень экспрессии VEGFR-2 в клетках метастаза прямо взаимосвязан со смертью от прогрессирования рака почки ($r = 0,502$; $p = 0,020$).

У больных раком почки CD45+, CD3+, CD8+ лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, а также CD45+, CD3+, CD8+ периферические лимфоциты экспрессируют VEGFR-1, -2; PDGF α, β ; FGFR-2. Уровень экспрессии VEGFR-2 и PDGFR β на TIL выше, чем в клетках опухоли ($p < 0,0001$ для CD8+ и $p < 0,09$ для CD45+ и CD3+). Отмечена прямая корреляция уровня экспрессии VEGFR-1 на CD3+ и CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, а также FGFR-2 на CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, с развитием прогрессирования рака почки после радикального хирургического лечения ($p < 0,05$).

Отмечена достоверно более низкая экспрессия VEGFR-1, -2; PDGFR α, β ; FGFR-2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови неоперированных больных раком почки по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$ для всех). Более низкая экспрессия VEGFR-1 и VEGFR-2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до лечения коррелировала с высокой категорией T, а также наличием опухолевого венозного тромбоза. У больных раком почки через 180 суток после нефрэктомии отмечается достоверное нарастание экспрессии VEGFR-1, -2 на CD45+ и VEGFR2 – на CD3+ и CD8+ лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$ для всех).

Внедрение результатов исследования

Разработанная методика выявления молекулярно-морфологических закономерностей диссеминированного рака почки апробирована в онкологическом отделении хирургических методов лечения №4 (онкоурологии) НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 04.09.2020 года на совместной научной конференции онкологического отделения хирургических методов лечения №12 (онкодерматологии), онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) №2, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) №3, онкологического отделения хирургических методов лечения №4 (онкоурологии), онкологического отделения хирургических методов лечения №2 НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, отделения организации и проведения клинических исследований ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедры онкологии факультета дополнительного профессионального образования ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки России.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит введение, 5 глав, выводы, приложения, список сокращений и список литературы. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 12 рисунками. Перечень используемой литературы включает 134 источника, из которых 2 отечественных и 132 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включено 65 больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+, подвергнутых нефрэктомии. Медиана возраста – 59,0 лет, соотношение мужчин и женщин – 1,9:1. У всех пациентов диагностирован рак почки. У большинства больных имели место односторонние опухоли почек (59 (90,8%)), однако у 6 (9,2%) пациентов было выявлено двухстороннее поражение. В 50 (76,9%) случаях отмечена опухолевая венозная инвазия. У 45 (69,2%) больных на момент операции имелись отдаленные метастазы (солитарные – 22 (33,8%), множественные – 23 (35,4%)). Более одной локализации метастазов было у 11 (16,9%) больных. Метастазы рака почки локализовались в надпочечнике у 28 (43,1%) наблюдениях, легких – у 22 (33,8%), костях – у 5 (7,7%), печени – у 2 (3,1%) пациентов.

Всем больным выполнена нефрэктомия с расширенной забрюшинной лимфодиссекцией. В 50 (76,9%) случаях объем операции также включал тромбэктомию. В 28 (43,1%) наблюдениях помимо первичной опухоли удалялись опухолевые очаги других локализаций (адреналэктомия – 24 (36,9%), резекция контралатеральной почки – 1 (1,5%), резекция легкого – 1 (1,5%), удаление костного метастаза – 1 (1,5%)). Хирургическое лечение было радикальным в 40 (61,5%) наблюдениях и имело циторедуктивный характер в 25 (39,5%) случаях.

Гистологически во всех удаленных образцах первичной опухоли верифицирован почечно-клеточный рак, при этом в доминирующем большинстве случаев выявлен светлоклеточный вариант опухоли (59 (90,8%)). Несветлоклеточный почечно-клеточный рак обнаружен в 6 (9,2%) наблюдениях. Степень анаплазии G расценена как G1-2 у 29 (44,6%), G3-4 – у 36 (65,4%) пациентов. Категория pT1-T2 имела место в 12 (18,5%), pT3-T4 – в 53 (81,5%) наблюдениях. Опухолевая инвазия паранефральной клетчатки выявлена в 29 (44,6%) препаратах. Во всех образцах, полученных во время тромбэктомии, тромботические массы имели строение, аналогичное опухоли почки; опухолевая инвазия венозной стенки отмечена в 4 (6,2%) случаях. Метастазы в удаленных забрюшинных лимфоузлах диагностированы в 12 (18,5%) наблюдениях. Гистологическое исследование подтвердило, что все удаленные опухоли других локализаций имели строение почечно-клеточного рака и являлись метастазами первичной опухоли, локализовавшейся в удаленной почке.

Пациенты, подвергнутые радикальному хирургическому вмешательству, находились под динамическим наблюдением. Из 25 больных, подвергнутых циторедуктивным операциям, противоопухолевая терапия была назначена 22 (88,0%) (цитокины – 3 больным с метастазами в легкие, антиангиогенная таргетная терапия – 19 пациентам).

Для исследования использовали проспективно отобранные операционные образцы опухолевой ткани (первичная опухоль – $n = 65$, парные образцы первичной опухоли и опухолевого тромба – $n = 25$, парные образцы первичной опухоли и метастаза в надпочечнике – $n = 21$). Во всех случаях выполнялось рутинное морфологическое исследование. Экспрессия ростовых факторов VEGFA и FGF2, а также РТК VEGFR-1, -2, -3; PDGFR α,β ; FGFR-1,-2 изучалась в ткани ПКР путем иммуногистохимического исследования с использованием соответствующих первичных антител. Для проявки антител использовали набор REALTM EnVisionTM DetectionSystem, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako). Срезы докрасивали гематоксилином Майера (Sigma), депарафинизировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте и заключали под покрывное стекло. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа Nikon Eclipse 50i при увеличении $\times 200$.

Экспрессию оценивали полуколичественным методом определения интенсивности окрашивания (0, 1+, 2+ и 3+) и подсчетом относительного количества окрашенных клеток, выраженного в процентах (0–100%). Значение уровня экспрессии по иммуногистохимической шкале (H-score (HS)) рассчитывалось путем умножения процента окрашенных клеток на показатель интенсивности окрашивания.

Для исследования экспрессии HIF-зависимых РТК на TIL производили их выделение из 19 операционных образцов опухоли почки в течение <4 часов после хирургического вмешательства, используя модифицированный нами протокол V. Baldan (2015).

С целью изучения экспрессии HIF-зависимых РТК на периферических лимфоцитах взяты образцы крови 10 здоровых доноров и 19 больных раком почки непосредственно перед и через 180 дней после хирургического вмешательства. Периферические лимфоциты выделяли из цельной крови с использованием Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) и отделяли центрифугированием в течение 25 минут при 400g.

Клеточный осадок ресуспензировали в свежей среде RPMI 1640 (Gibco). Изолированные периферические и TIL были подготовлены для проточной цитометрии.

Изолированные периферические и TIL изучались непосредственно после выделения. Клетки инкубировали в течение 15 мин при 4°C с нормальными мышинными иммуноглобулинами (mIgG) (6 мкг мкг/10⁶ клеток) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), затем - с мечеными флуорохромом антителами к поверхностным антигенам в течение 30 мин при 4°C (FITC анти-CD45, клон HI30, PE анти-VEGFR-2, клон 7D4-6, PE анти-PDGFR α , клон 16.A1, PE анти-PDGFR β , клон 18.A2 (SonyBiotech), PE анти-VEGFR-1, клон D-2, PE анти-FGFR-2, клон C-8 (Invitrogen). Клетки получали на проточномцитометре NovoCyte 2000R (ACEA Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress v.1.2.4. Для обеспечения строгого одноклеточного стробирования дублеты были исключены с использованием SSC и FSC высоты и ширины, как рекомендовано сетью проточной цитометрии. Соответствующие контроли изотипа были использованы на всех этапах. Медиану интенсивности флуоресценции рассчитывали путем вычитания флуоресценции изотипа из флуоресценции окраски.

Для статистической обработки все данные о пациентах и результатах их лечения были формализованы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в базу данных, созданную на основе электронных таблиц Microsoft Excel 2016. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью известных статистических методов при использовании блока программ "SPSS 19.0 for Windows".

Результаты исследования

Экспрессия ростовых факторов и рецепторов тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки

В цитоплазме и на мембране клеток первичной опухоли 65 больных раком почки обнаружена экспрессия ростовых факторов, а также РТК. Частота экспрессии VEGFA составила 55,4% при среднем уровне экспрессии $32,4 \pm 5,5$ HS, его рецептор первого типа продуцировался в 75,4% опухолей ($97,2 \pm 10,2$ HS), второго типа – несколько реже, в 55,4% препаратов ($39,2 \pm 6,5$ HS). Окрашивание FGF2 выявлено в 60,0% случаев ($44,2 \pm 5,4$ HS); отмечены большая частота и интенсивность экспрессии FGFR-2 (66,2%; $46,6 \pm 6,3$ HS) по сравнению с FGFR-1 (32,3%; $7,5 \pm 2,2$ HS). В 58,5% опухолей обнаружена экспрессия PDGFR α ($62,9 \pm 8,4$ HS), в 44,6% – PDGFR β ($26,6 \pm 5,3$ HS).

Проведен анализ взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и РТК между собой. Выявлена сильная взаимосвязь уровней экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2. Отмечена прямая корреляция между уровнем экспрессии VEGFA и РТК FGFR-1, -2. Уровень экспрессии FGF2 оказался прямо взаимосвязан с продукцией РТК VEGFR-1, -2; PDGFR α и FGFR-2. Уровни РТК также сильно прямо коррелировали между собой: VEGFR-1 – с VEGFR-2, PDGFR α , FGFR-2; VEGFR-2 – с VEGFR-1, PDGFR α , PDGFR β ; PDGFR α – с VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR β , FGFR-2; PDGFR β – со всеми изученными РТК; FGFR-1 - с PDGFR β и FGFR-2; FGFR-2 – с VEGFR-1, PDGFR α , PDGFR β и FGFR-2 ($p < 0,05$ для всех) (Таблица 1).

Таблица 1 – Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и РТК в клетках первичной опухоли у больных ПКР

Уровень экспрессии	Корреляция Пирсона (r), 2-сторонняя значимость	Уровень экспрессии							
		VEGFA	FGF2	VEGFR-1	VEGFR-2	PDGFR α	PDGFR β	FGFR-1	FGFR-2
VEGFA	r	-	,350**	,199	-,170	,013	,064	,257*	,287*
	Знч.		,004	,113	,175	,918	,611	,039	,021
FGF2	r	,350**	-	,420**	,296*	,246*	,099	,035	,390**
	Знч.	,004		,001	,017	,048	,433	,784	,001
VEGFR-1	r	,199	,420**	-	,711**	,618**	,465**	,185	,347**
	Знч.	,113	,001		,000	,000	,000	,140	,005
VEGFR-2	r	-,170	,296*	,711**	-	,484**	,381**	-,044	,193
	Знч.	,175	,017	,000		,000	,002	,731	,124
PDGFR α	r	,013	,246*	,618**	,484**	-	,521**	,187	,338**
	Знч.	,918	,048	,000	,000		,000	,135	,006
PDGFR β	r	,064	,099	,465**	,381**	,521**	-	,391**	,583**
	Знч.	,611	,433	,000	,002	,000		,001	,000
FGFR-1	r	,257*	,035	,185	-,044	,187	,391**	-	,442**
	Знч.	,039	,784	,140	,731	,135	,001		,000
FGFR-2	r	,287*	,390**	,347**	,193	,338**	,583**	,442**	-
	Знч.	,021	,001	,005	,124	,006	,000	,000	

** Корреляция значима на уровне 0,01 (2-сторон.).

* Корреляция значима на уровне 0,05 (2-сторон.).

Проведен анализ возможной взаимосвязи характеристик опухолевого процесса с уровнями экспрессии ростовых факторов и РТК на клетках первичной опухоли. Отмечена достоверная корреляция гиперэкспрессии изучаемых маркеров с неблагоприятными признаками опухоли и значительной распространенностью опухолевого процесса. Степень анаплазии опухоли прямо коррелировала с уровнями экспрессии FGF2, а также VEGFR-1, -2; PDGFR α , β ($p < 0,05$ для всех). Категория pT

значимо возрастала по мере увеличения уровней экспрессии VEGFR-1 и -2 ($p < 0,05$ для всех).

Опухолевая инвазия паранефрия коррелировала с гиперэкспрессией VEGFA и VEGFR-1, а также FGF2 и FGFR-2 ($p < 0,05$ для всех). Опухолевая венозная инвазия была значимо взаимосвязана с повышением уровней экспрессии VEGFR-1 и -2 ($p < 0,05$ для всех); протяженность опухолевого тромбоза – с гиперэкспрессией PDGFR β , опухолевая инвазия венозной стенки – FGFR-2 ($p < 0,05$ для всех). Гиперэкспрессия PDGFR α коррелировала с появлением регионарных, PDGFR β – отдаленных метастазов ($p < 0,05$ для всех). Отмечена прямая взаимосвязь количества метастазов и уровня экспрессии VEGFR-2 ($p = 0,009$). Развитие метастазов в надпочечниках коррелировало с гиперэкспрессией VEGFA, а также VEGFR-2, PDGFR β и FGFR-1; в печени – с высокой экспрессией FGF2, VEGFR-1 и FGFR-2 ($p < 0,05$ для всех).

Медиана наблюдения за всеми 65 больными составила $19,9 \pm 2,9$ (1-133) месяца. Рецидивы рака почки развились у 17 (42,5%) из 40 радикально оперированных больных. Медиана общей (ОВ) и специфической (СВ) выживаемости 65 пациентов составила $43,8 \pm 7,7$ и $52,1 \pm 8,0$ месяца соответственно. Медиана безрецидивной выживаемости (БРВ) 40 радикально оперированных пациентов достигла $79,2 \pm 43,1$ месяца, медиана беспрогрессивной выживаемости (БПВ) 25 больных после циторедуктивной операции – $7,4 \pm 2,4$ месяца.

Проведен анализ предсказательной ценности уровней экспрессии VEGFA/VEGFR-1, -2; FGF2/FGFR-1, -2; PDGFR α, β на опухолевых клетках для прогнозирования рецидива рака почки после радикального хирургического лечения, прогрессирования заболевания после циторедуктивной нефрэктомии, а также смерти от рака почки. Отмечена тенденция к значимому влиянию на риск смерти прогрессирования рака почки после циторедуктивной нефрэктомии уровня экспрессии VEGFA ($p = 0,082$). Выявлена тенденция к значимому влиянию на риск смерти от рака почки у оперированных больных уровня экспрессии VEGFR-2 ($p = 0,089$) и FGFR-2 ($p = 0,092$) в клетках первичной опухоли. Значимой прогностической ценности уровней экспрессии FGF2 и других РТК на опухолевых клетках не выявлено. Выделено пограничное значение VEGFA, составившее 80 HS. Отмечена тенденция к достоверному снижению БПВ пациентов с гипоекспрессией VEGFA < 80 HS по сравнению с VEGFA ≥ 80 HS (медиана $6,7 \pm 1,2$ vs. $48,8 \pm 0,0$ месяца соответственно, $p = 0,054$). Выделено

пограничное значение VEGFR-2, равное 100 HS. В однофакторном анализе выявлено достоверное снижение медианы СВ с $59,3 \pm 12,1$ до $6,2 \pm 0,3$ месяца у больных с гиперэкспрессией VEGFR-2 ≥ 100 HS по сравнению с пациентами, имевшими более низкую экспрессию данного маркера ($p < 0,0001$). Выделено пограничное значение FGFR-2, равное 80 HS. В однофакторном анализе выявлено достоверное снижение медианы СВ с $52,1 \pm 11,4$ до $15,7 \pm 3,3$ месяца у больных с гиперэкспрессией FGFR-2 ≥ 80 HS по сравнению с пациентами, имевшими более низкую экспрессию данного маркера ($p = 0,014$).

В регрессионном анализе отмечена тенденция к независимому влиянию на СВ степени анаплазии G3-4 (отношение рисков (HR) 1,7 (95% доверительные интервалы (CI): 1,0-3,1); $p = 0,072$), опухолевого тромбоза (HR 6,2 (95% CI: 0,8-49,1); $p = 0,082$) и гиперэкспрессии VEGFR-2 (HR 2,4 (95% CI: 0,9-6,5); $p = 0,081$).

Экспрессия ростовых факторов и рецепторов тирозинкиназ в клетках опухолевого тромба у больных раком почки

В цитоплазме и на мембране клеток опухолевого тромба так же, как и клеток первичной опухоли у 25 больных раком почки экспрессировались VEGF-A, FGF-2, а также VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR- α , - β . Уровни экспрессии перечисленных маркеров приведены в таблице 2. Отмечено, что клетки опухолевого тромба характеризуются тенденцией к более низкой экспрессии ростовых факторов VEGF-A ($p = 0,060$) и FGF-2 ($p = 0,046$), достоверно более низкой экспрессией рецепторов VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR- α ($p < 0,05$ для всех), а также тенденцией к более низкой экспрессии FGFR-1 ($p = 0,077$) и FGFR-2 ($p = 0,090$) по сравнению с клетками первичной опухоли почки.

Таблица 2 – Экспрессия ростовых факторов и РТК в клетках первичной опухоли и опухолевого венозного тромба у больных ПКР (n=25)

Экспрессия, средняя \pm σ , HS	Клетки опухоли почки	Клетки опухолевого тромба	Значимость 2-сторонняя
VEGF-A	$21,2 \pm 5,0$	$9,2 \pm 3,6$	0,060
FGF-2	$58,0 \pm 9,6$	$33,2 \pm 7,3$	0,046
VEGFR-1	$156,4 \pm 13,1$	$79,6 \pm 9,3$	$< 0,0001$
VEGFR-2	$88,4 \pm 10,1$	$45,6 \pm 7,5$	0,001
PDGFR- α	$98,8 \pm 12,9$	$52,4 \pm 9,8$	0,006
PDGFR- β	$38,4 \pm 9,4$	$24,0 \pm 6,5$	0,216
FGFR-1	$2,4 \pm 1,3$	$0,0 \pm 0,0$	0,077

FGFR-2	52,4±9,4	30,8±8,2	0,090
--------	----------	----------	-------

Проведен корреляционный анализ взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и РТК в клетках опухоли и опухолевого тромба с характеристиками опухолевого процесса. Степень анаплазии G была прямо взаимосвязана с уровнем экспрессии VEGFR-1 ($p=0,035$) и FGFR-1 в клетках опухоли ($p=0,022$). Отмечена прямая значимая корреляция инвазии опухолевого тромба в венозную стенку и уровней экспрессии VEGFR-1 ($p=0,023$) и FGFR-2 ($p=0,005$) на клетках внутрисосудистой опухоли. Других значимых взаимосвязей не было выявлено ($p>0,05$ для всех).

Медиана наблюдения за всеми 25 больными составила 16,4 (0,3-74,5) месяца. Рецидивы развились у 5 (41,7%) из 12 радикально оперированных больных. Медиана ОВ и СВ всех пациентов составила 43,7 месяца, медиана БРВ радикально оперированных больных – 11,2 месяца, медиана ВВП у нерадикально оперированных пациентов на фоне первой линии терапии равнялась 10,3 месяца.

Проведена оценка ценности уровней экспрессии ростовых факторов и РТК в клетках опухоли почки и опухолевого тромба для прогнозирования развития рецидивов ПКР после радикального хирургического лечения, прогрессирования опухолевого процесса после циторедуктивных операций и смерти от прогрессирования ПКР. Предикторами прогрессирования ПКР после циторедуктивных операций являлись уровни экспрессии VEGFR-1 в клетках первичной опухоли ($p=0,064$) и VEGF-A в клетках опухолевого тромба ($p=0,019$). В связи с малым числом наблюдений в подгруппах выделить пограничные значения данных маркеров не удалось. Статистически значимое влияние на риск смерти от прогрессирования ПКР оказывали уровни экспрессии VEGFR-1 ($p=0,009$) и VEGFR-2 ($p=0,008$) в клетках первичной опухоли, а также уровни продукции VEGFR-2 ($p=0,040$) и VEGF-A ($p=0,059$) в клетках опухолевого тромба. Значимой прогностической ценности уровней экспрессии FGF-2 и других РТК выявлено не было.

Проведен поиск пограничных значений уровней экспрессии маркеров, влияющих на ОВ. Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFR-1 в клетках первичной опухоли ≥ 90 HS составила 15,6 месяца, пациентов с экспрессией < 90 HS – не достигнута; разница результатов между группами статистически незначима ($p=0,230$). Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFR-2 в клетках первичной опухоли ≥ 95 HS составила 6,0 месяцев,

пациентов с экспрессией <95 HS – 52,1 месяца ($p=0,011$). Медиана ОБ больных с экспрессией VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба ≥ 40 HS составила 7,4 месяца, пациентов с экспрессией <40 HS – не достигнута; имеется тенденция к значимому различию результатов между группами ($p=0,093$). Медиана ОБ больных с экспрессией VEGF-A в клетках опухолевого тромба <15 HS составила 15,7 месяца, пациентов с экспрессией ≥ 15 HS не достигнута; имеется тенденция к значимому различию результатов между группами ($p=0,095$).

Экспрессия ростовых факторов и рецепторов тирозинкиназ в клетках метастазов рака почки

В цитоплазме и на мембране клеток метастазов рака почки в надпочечниках у 21 больного экспрессировались ростовые факторы VEGFA и FGF2, а также РТК VEGFR1-3; PDGFR α,β ; FGFR1,2. Уровень экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2 и РТК VEGFR1 был значимо ниже в клетках метастатических очагов, чем в клетках первичной опухоли ($p<0,05$ для всех) (Таблица 3).

Таблица 3 – Экспрессия ростовых факторов и РТК в клетках первичной опухоли и метастазов у больных ПКР ($n=21$)

Ростовые факторы и РТК	Экспрессия, средняя \pm σ , HS		Значимость 2-сторонняя
	Клетки опухоли почки	Клетки метастаза опухоли в надпочечник	
VEGF	66,9 \pm 12,0	19,1 \pm 5,7	0,001
FGF2	67,6 \pm 6,0	41,4 \pm 7,7	0,011
VEGFR-1	91,9 \pm 13,9	50,5 \pm 9,2	0,017
VEGFR-2	11,4 \pm 5,7	5,7 \pm 3,6	0,274
VEGFR-3	20,5 \pm 7,4	5,2 \pm 2,8	0,064
PDGFR- α	48,1 \pm 12,8	17,1 \pm 5,4	0,032
PDGFR- β	10,9 \pm 3,4	9,5 \pm 3,3	0,768
FGFR-1	11,4 \pm 2,4	9,5 \pm 3,9	0,685
FGFR-2	50,9 \pm 8,8	33,3 \pm 8,1	0,150

Проведен корреляционный анализ возможной взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и РТК в клетках опухоли и метастаза в надпочечнике с характеристиками опухолевого процесса. Отмечено, что низкая степень дифференцировки и значительная распространенность рака почки ассоциированы с гиперэкспрессией ряда изучавшихся маркеров. Так, степень анаплазии опухоли коррелировала с уровнем экспрессии FGF2 в клетках метастаза ($p=0,038$), категория pT -

с уровнем экспрессии PDGFR α в клетках первичной опухоли ($p=0,035$), вращение опухоли в паранефрий - с уровнем экспрессии FGF2 в клетках метастаза в надпочечник ($p<0,0001$). Наличие метастатических очагов за пределами надпочечников было прямо взаимосвязано с уровнем экспрессии VEGFR-2 в клетках метастаза ($p=0,020$). Других значимых взаимосвязей не было выявлено ($p>0,05$ для всех).

Медиана наблюдения за всеми больными - 22,0 (1-133) месяца. Двухлетняя ОВ и СВ составили 80,5% и 84,7%, медианы данных показателей равнялись $79,2\pm 19,7$ и $79,3\pm 19,6$ месяца соответственно. Медиана БРВ 15 радикально оперированных пациентов достигла $79,3\pm 48,9$ месяца (2-летняя - 66,7%), медиана БПВ 6 больных, получавших первую линию противоопухолевой терапии после циторедуктивной операции, - $20,6\pm 13,9$ месяца (2-летняя - 30,0%).

Проведен поиск взаимосвязи рецидива рака почки после радикальной операции и смерти от рака почки после хирургического лечения с уровнями экспрессии ростовых факторов и РТК в клетках первичной опухоли и метастаза. Обнаружена прямая взаимосвязь смерти от прогрессирования и экспрессии VEGFR2 в клетках метастаза ($r=0,502$; $p=0,020$). Небольшое количество наблюдений не позволило выделить пограничное значение уровня экспрессии данного маркера. Других значимых корреляций не отмечено.

Экспрессия ростовых факторов и рецепторов тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах у больных раком почки

Изучалась экспрессия рецепторов VEGFR -1 и -2, PDGFR α и - β , FGFR-2 на TILCD45+, CD3+ и CD8+. Все типы клеток экспрессировали вышеперечисленные РТК, зарегистрированные уровни экспрессии перечислены в таблице 4. Значимых различий экспрессии РТК на TIL разных субпопуляций не выявлено ($p>0,05$ для всех).

Таблица 4 – Экспрессия РТК на CD45+, CD3+ и CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах у больных ПКР

Экспрессия РТК, средняя \pm σ	CD45+*	CD3+**	CD8+**
VEGFR1	28,1 \pm 3,2	30,3 \pm 3,9	31,7 \pm 3,5
VEGFR2	44,3 \pm 3,5	49,6 \pm 4,1	52,8 \pm 4,9
PDGFR α	40,5 \pm 2,8	42,3 \pm 3,7	46,2 \pm 4,9
PDGFR β	52,3 \pm 5,1	57,6 \pm 5,8	63,3 \pm 6,4
FGFR2	23,2 \pm 3,0	24,3 \pm 2,9	26,2 \pm 3,0

* экспрессия оценивалась в 19 образцах

** экспрессия оценивалась в 11 образцах

Значимых взаимосвязей экспрессии VEGFR-1, -2; PDGFR α,β ; FGFR-2 на опухолеинфильтрирующих лимфоцитах (CD45+, CD3+, CD8+) с характеристиками ПКР не выявлено.

Медиана наблюдения за 19 больными раком почки составила 24,0 месяца. Рецидивы ПКР зарегистрированы у 4 (25,0%) из 16 радикально оперированных больных. Медиана ОВ и СВ всех пациентов и составила 33,8 и 33,8 месяца; медиана БРВ радикально оперированных больных не достигнута (2-летняя – 66,7%); медиана БПВ нерадикально оперированных больных равнялась 11 месяцев.

Проведен поиск взаимосвязи между уровнями экспрессии ростовых факторов и РТК на ТИЛ с прогрессированием рака почки после хирургического лечения и смертью от рака почки. Отмечена прямая корреляция уровня экспрессии VEGFR-1 на ТИЛ CD3+ и CD8+, а также FGFR-2 на ТИЛ CD8+ с развитием прогрессирования рака почки после радикального хирургического лечения ($p < 0,05$). В связи с малым количеством наблюдений выделить пограничные значения данных маркеров не удалось. Других значимых взаимосвязей не выявлено.

Экспрессия рецепторных тирозинкиназ на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови больных почечно-клеточным раком и здоровых добровольцев

Производилась оценка экспрессии РТК на лимфоцитах периферической крови CD45+, CD3+, CD8+ у 19 больных ПКР до и через 180 дней после нефрэктомии, а также на лимфоцитах периферической крови CD45+ у здоровых добровольцев.

Выявлено, что на мембране лимфоцитов периферической крови CD45+, а также субпопуляций лимфоцитов CD3+ и CD8+ у больных ПКР, не получавших лечения, экспрессируются VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α и β , FGFR2. Различий уровней экспрессии РТК между субпопуляциями лимфоцитов у пациентов с ПКР не выявлено ($p < 0,05$ для всех) (Таблица 5).

Таблица 5 – Экспрессия РТК на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных ПКР до и через 180 суток после нефрэктомии

Экспрессия, средняя $\pm \sigma$	Больные ПКР, до операции ^a	Больные ПКР, 180 суток после нефрэктомии ^a	2-сторонняя значимость
Периферические лимфоциты CD45+			
VEGFR-1	28,8 \pm 2,7	43,4 \pm 5,9	0,001
VEGFR-2	27,1 \pm 2,2	57,8 \pm 7,4	0,002
PDGFR α	44,9 \pm 3,7	49,1 \pm 10,1	0,546
PDGFR β	62,6 \pm 3,8	47,4 \pm 9,8	0,768
FGFR-2	41,4 \pm 6,3	35,1 \pm 2,8	0,223
Периферические лимфоциты CD3+			
VEGFR-1	39,6 \pm 5,4	52,6 \pm 6,0	0,128
VEGFR-2	36,2 \pm 4,4	64,5 \pm 7,8	0,003
PDGFR α	52,9 \pm 5,3	52,9 \pm 10,2	0,997
PDGFR β	69,2 \pm 6,1	50,3 \pm 9,0	0,090
FGFR-2	48,9 \pm 8,9	38,0 \pm 3,1	0,329
Периферические лимфоциты CD8+			
VEGFR-1	34,0 \pm 5,1	47,1 \pm 6,3	0,122
VEGFR-2	30,9 \pm 3,8	59,4 \pm 8,4	0,003
PDGFR α	49,9 \pm 4,9	52,8 \pm 11,1	0,801
PDGFR β	66,3 \pm 5,4	49,5 \pm 9,6	0,121
FGFR-2	47,8 \pm 8,0	36,3 \pm 2,8	0,252

^a не выявлено достоверных различий экспрессии VEGF-1, -2; PDGFR α , β ; FGFR2 между субпопуляциями лимфоцитов периферической крови до и после нефрэктомии

Лимфоциты периферической крови CD45+ здоровых добровольцев также экспрессировали VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α и β , FGFR2. Отмечена достоверно более высокая экспрессия РТК, включая VEGFR1 и VEGFR2, PDGFR α и β , FGFR2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови здоровых добровольцев по сравнению с больными ПКР, которым не удалена первичная опухоль ($p < 0,05$ для всех; Таблица 6).

Таблица 6 – Экспрессия РТК на CD45+ лимфоцитах периферической крови у здоровых добровольцев и больных раком почки до нефрэктомии

Экспрессия, средняя $\pm \sigma$	Здоровые добровольцы (n 10)	Больные ПКР, до операции (n 19)	2-сторонняя значимость
VEGFR-1	78,1 \pm 4,7	28,8 \pm 2,7	0,001
VEGFR-2	79,6 \pm 5,1	27,1 \pm 2,2	0,002
PDGFR α	80,1 \pm 3,9	44,9 \pm 3,7	0,012
PDGFR β	75,5 \pm 3,7	62,6 \pm 3,8	0,045
FGFR-2	72,1 \pm 3,1	41,4 \pm 6,3	0,001

При изучении динамики уровней экспрессии РТК у больных ПКР выявлена достоверно более высокая экспрессия VEGFR1 и VEGFR2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови через 180 дней после удаления первичной опухоли по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$ для всех). Наличие неудаленных метастазов не влияло на динамику экспрессии VEGFR1, VEGFR2 (Таблица 7).

Таблица 7 – Экспрессия РТК на CD45+лимфоцитах периферической крови у больных ПКР до и через 180 суток после радикальной и циторедуктивной нефрэктомии

Экспрессия на CD45+, средняя $\pm \sigma$	Больные ПКР до операции (n 19)	Больные ПКР после радикальной нефрэктомии (n 13)	Больные ПКР после циторедуктивной нефрэктомии (n 6)
VEGFR-1	28,8 \pm 2,7	43,4 \pm 8,9 ^a	39,3 \pm 0,8 ^a
VEGFR-2	27,1 \pm 2,2	58,0 \pm 9,4 ^a	57,3 \pm 14,3 ^a
PDGFR α	44,9 \pm 3,7	51,3 \pm 12,1	44,7 \pm 21,7
PDGFR β	62,6 \pm 3,8	47,0 \pm 11,5	48,3 \pm 21,8
FGFR-2	41,4 \pm 6,3	32,8 \pm 2,7	39,7 \pm 6,9

a – различия достоверны по сравнению с экспрессией РТК на CD45+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до удаления первичной опухоли

Через 180 суток после нефрэктомии отмечено достоверное увеличение уровня экспрессии VEGFR2 на CD3+ ($p=0,003$) и CD8+ ($p=0,003$) лимфоцитах периферической крови больных ПКР до и через 180 суток после нефрэктомии (таблица 5). Других значимых изменений продукции РКТ не выявлено.

Проведен корреляционный анализ, направленный на выявление статистически значимых взаимосвязей экспрессии VEGFR1, VEGFR2; PDGFR α,β ; FGFR2 на лимфоцитах периферической крови (CD45+, CD3+, CD8+) с характеристиками рака почки. Отмечена значимая обратная взаимосвязь уровней экспрессии VEGFR1 и VEGFR2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных ПКР до лечения с категорией Т, а также наличием опухолевого венозного тромбоза ($p < 0,05$ для всех). Других значимых корреляций не выявлено.

Медиана наблюдения за 19 больными ПКР составило 24,0 \pm 1,9 месяца. Рецидивы ПКР зарегистрированы у 4 (25,0%) из 16 радикально оперированных больных. Медиана ОВ и СВ всех пациентов составила 33,8 и 33,8 месяца; медиана БРВ радикально оперированных больных не достигнута (2-летняя – 66,7%); медиана БПВ нерадикально оперированных больных равнялась 11 месяцев. Зависимости показателей

продолжительности жизни от уровней и видов экспрессии РТК на периферических лимфоцитах получено не было (все $p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. У больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ на поверхности и в цитоплазме клеток первичной опухоли, опухолевого тромба и метастазов экспрессируются HIF-зависимые ростовые факторы VEGFA и FGF2, а также рецепторные тирозинкиназы VEGFR-1, -2; PDGFR α,β ; FGFR-1, -2. Клетки опухолевого тромба и метастазов характеризуются меньшим уровнем экспрессии по сравнению с клетками первичной опухоли ($p < 0,05$). Экспрессия всех изученных ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ прямо взаимосвязана друг с другом ($p < 0,05$).

2. Выявлена достоверная корреляция уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ с высокой степенью анаплазии опухоли G3-4 (FGF2; VEGFR; PDGFR) и значительной распространенностью опухолевого процесса: категорией pT3-4 (VEGFR), опухолевой инвазией паранефрии (VEGF/VEGFR, FGF2/FGFR), опухолевой венозной инвазией (VEGFR), протяженностью опухолевого тромба (PDGFR), опухолевой инвазией венозной стенки (FGFR; VEGFR), категориями pN+ и M+ (PDGFR), развитием множественных метастазов (VEGFR2) ($p < 0,05$ для всех).

3. У больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ отмечено достоверное снижение специфической выживаемости при гиперэкспрессии VEGFR-2 ($p < 0,0001$) и FGFR-2 в клетках первичной опухоли ($p = 0,014$). У пациентов, подвергнутых нефрэктомии, тромбэктомии, выявлено достоверное снижение общей выживаемости при сочетании гиперэкспрессии VEGFR-2 в клетках опухоли почки, гиперэкспрессии VEGFR-2 и гипоекспрессии VEGFA в клетках опухолевого тромба ($p = 0,004$). Уровень экспрессии VEGFR-2 в клетках метастазов прямо коррелировал со смертью от прогрессирования рака почки ($r = 0,502$; $p = 0,020$).

4. У больных раком почки CD45+, CD3+, CD8+ лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, экспрессируют VEGFR-1, -2; PDGF α,β ; FGFR-2. Уровень экспрессии VEGFR-2 и PDGFR β на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах выше, чем в клетках опухоли ($p < 0,0001$ для CD8+ и $p < 0,09$ для CD45+ и CD3+).

5. Отмечена прямая корреляция уровня экспрессии VEGFR-1 на CD3+ и CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, а также FGFR-2 на CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, с развитием прогрессирования рака почки после радикального хирургического лечения ($p < 0,05$).

6. Выявлена достоверно более низкая экспрессия VEGFR-1, -2; PDGFR α,β ; FGFR-2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови больных раком почки, которым не удалена первичная опухоль, по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$ для всех).

7. Низкая экспрессия VEGFR-1 и VEGFR-2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до лечения коррелировала с большей местной распространенностью первичной опухоли (высокой категорией T, наличием опухолевого венозного тромбоза) ($p < 0,05$ для всех).

8. У больных раком почки через 180 суток после нефрэктомии независимо от наличия неудаленных отдаленных метастазов отмечается достоверное нарастание экспрессии VEGFR-1, -2 на CD45+ и VEGFR2 – на CD3+ и CD3+CD8+ лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$ для всех).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Волкова, М.И. Пазопаниб в терапии распространенного почечноклеточного рака / М.И. Волкова, **А.С. Ольшанская** // Медицинский совет. – 2018. – № 19. – С. 90-94.

2. Волкова, М.И. Первый опыт применения комбинации ленватиниба и эверолимуса при распространенном почечно-клеточном раке, резистентном к антиангиогенной терапии, в широкой клинической практике России / М.И. Волкова, О.И. Евсюкова, **А.С. Ольшанская**, В.Б. Матвеев // Онкоурология. – 2018. – Т. 14. – № 1. – С. 76-86.

3. Волкова, М.И. Экспрессия тирозинкиназных рецепторов на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови больных почечно-клеточным раком и здоровых добровольцев / М.И. Волкова, **А.С. Ольшанская**, Д.А. Хоченков, С.А. Ашуба, Ю.А. Хоченкова, И.В. Тимофеев // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. 18-24.

4. Матвеев, В.Б. Изменение позиций иммунотерапии при распространенном раке почки: ниволумаб в комбинации с ипилимумабом в 1-й линии лечения / В.Б.

Матвеев, М.И. Волкова, **А.С. Ольшанская** // Онкоурология. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 125-130.

5. Матвеев, В.Б. Кабозантиниб: от исследований к реальной клинической практике / В.Б. Матвеев, **А.С. Ольшанская**, М.И. Волкова // Онкоурология. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 28-41.

6. Волкова, М.И. Эффективность и безопасность комбинации левватиниба и эверолимуса у больных диссеминированным раком почки, прогрессирующим на фоне антиангиогенной таргетной терапии: результаты российского многоцентрового наблюдательного исследования ROSLERCM / М.И. Волкова, М.Т. Айвазов, З.В. Амоев, К.Г. Бабина, П.С. Борисов, А.А. Воронцова, **А.С. Ольшанская** и др. // Онкоурология. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 56-69.

7. Волкова, М.И. Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли опухолевого тромба у больных почечно-клеточным раком / М.И. Волкова, **А.С. Ольшанская**, Д.А. Хоченков, Н.Л. Вашакмадзе, С.А. Ашуба, Ю.А. Хоченкова, И.В. Тимофеев, В.Б. Матвеев // Онкоурология. – 2020. – Т. 16. – № 1. – С. 17-26.

8. Tsimafeyeu, I. Expression of receptor tyrosine kinases on peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma and healthy donors / I. Tsimafeyeu, M. Volkova, **A. Olshanskaia**, G. Raskin, S. Aschuba, Y. Khochenkova, A. Bondarenko, D. Khochenkov // Oncology. – 2020. – Vol. 98 – P. 252-258.

9. Khochenkov, D. Is there receptor tyrosine kinases expression on lymphocytes in patients with renal cell carcinoma? First-in-human study / D. Khochenkov, **A. Olshanskaia**, M. Volkova // Annals of oncology. – 2017. – Vol. 28. – P. 054.

10. Tsimafeyeu, I. Lymphocytes express receptor tyrosine kinases in patients with renal cell carcinoma and healthy donors / I. Tsimafeyeu, M. Volkova, **A. Olshanskaia**, G. Raskin, S. Aschuba, Y. Khochenkova, A. Bondarenko, D. Khochenkov // Annals of oncology – 2018. Vol. 29. – P. viii7-viii8.

11. Volkova, M.I. Lenvatinib in combination with everolimus in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) resistant to antiangiogenic targeted therapy: An initial Russian experience / M.I. Volkova, **A. Olshanskaia**, O.I. Samuseva, V.B. Matveev // Journal of Clinical Oncology – 2018. – Vol. 36. – № 15. – P. e16562.