

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**ОЛЬШАНСКАЯ АННА СЕРГЕЕВНА**

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

14.01.12 – Онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Волкова Мария Игоревна**

доктор медицинских наук, профессор

**Хайленко Виктор Алексеевич**

**Москва – 2020**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
1.1 Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторы.....	17
1.2 Фактор роста фибробластов (FGF) и его рецепторы.....	26
1.3 Фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF) и его рецепторы .....	31
1.4. Заключение .....	35
ГЛАВА 2. ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ .....	37
2.1 Актуальность проблемы.....	37
2.2 Материал и методы .....	37
2.2.1 Характеристика больных раком почки.....	37
2.2.2 Методология исследования.....	41
2.2.2.1 Методика хирургического лечения.....	41
2.2.2.2 Иммуногистохимическое исследование.....	42
2.2.2.3 Методы статистической обработки данных.....	44
2.3 Результаты.....	45
2.3.1 Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки.....	45
2.3.2. Взаимосвязь между экспрессией ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки .....	48
2.3.3. Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли с прогнозом больных раком почки.....	50
2.4 Дискуссия.....	59
2.5 Заключение .....	66

ГЛАВА 3. ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И ОПУХОЛЕВОГО ТРОМБА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ.....	68
3.1 Актуальность проблемы.....	68
3.2 Материал и методы .....	68
3.2.1 Характеристика больных раком почки.....	68
3.2.2 Методология исследования.....	71
3.3 Результаты.....	71
3.3.1 Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого венозного тромба у больных раком почки....	71
3.3.2 Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ с характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки с опухолевым венозным тромбозом.....	73
3.3.3. Влияние уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба на прогноз больных раком почки.....	75
3.4 Дискуссия.....	84
3.5 Заключение .....	86
ГЛАВА 4. ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ В НАДПОЧЕЧНИКАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ.....	88
4.1 Актуальность проблемы.....	88
4.2 Материал и методы .....	89
4.2.1 Характеристика больных раком почки.....	89
4.2.2 Методология исследования.....	92
4.3 Результаты.....	92
4.3.1 Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках у больных раком почки .....	92

4.3.2	Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках с характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки.....	93
4.3.3	Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках с прогнозом больных раком почки .....	96
4.4	Дискуссия.....	97
4.5	Заключение .....	99
ГЛАВА 5. ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ НА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТАХ И ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ.....		
5.1	Актуальность проблемы.....	100
5.2	Материал и методы .....	101
5.2.1	Характеристика больных раком почки и здоровых добровольцев.....	101
5.2.2	Методология исследования.....	104
5.2.2.1	Изоляция лимфоцитов .....	104
5.2.2.2	Проточная цитометрия .....	105
5.2.2.3	Другие использованные методы.....	106
5.3	Результаты.....	106
5.3.1	Экспрессия рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови .....	106
5.3.2	Поиск взаимосвязи между экспрессией рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови и характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки .....	109
5.3.3	Поиск взаимосвязи между экспрессией рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови и прогнозом больных раком почки. ....	111
5.4	Дискуссия.....	113

5.5. Заключение .....	114
ВЫВОДЫ .....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак почки – распространенная солидная опухоль. Несмотря на прорыв, достигнутый в области системной противоопухолевой терапии, наиболее эффективным методом лечения больных клинически-локализованным и местно-распространенным почечно-клеточным раком (ПКР) остается хирургический. Диссеминация опухолевого процесса имеется у 30% пациентов на момент установки диагноза, еще у 50% больных после радикального хирургического лечения развиваются метастазы. Появление отдаленных метастазов рака почки является показанием для системной противоопухолевой терапии [1].

Изучение молекулярно-генетических особенностей ПКР позволило выделить несколько основных вариантов опухоли. Наиболее распространенным и изученным является светлоклеточный рак почки [115], ассоциированный с высокой частотой мутаций гена вон Гиппеля-Линдау (VHL) [19], инактивация которого приводит к экспрессии гипоксия-индуцированных факторов (HIF) [112] и их мишеней, прежде всего, ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (РТК) [62; 113]. 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) [15]. Подавление этих цепей внутриклеточной передачи сигнала лежит в основе большинства режимов современной таргетной терапии, имеющей доказанную эффективность при ПКР [25, 27, 38, 39, 41, 48, 63, 87-89, 106-108, 119].

Удивительно, но несмотря на то, что воздействие на HIF-зависимые сигнальные пути уже пришло в клиническую практику, особенности экспрессии и прогностической роли ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ у больных

ПКР практически не изучены. Завершенные работы, как правило, посвящены исследованию рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках. В доступной нам литературе мы не обнаружили данных об экспрессии рецепторных тирозинкиназ 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 рецепторных тирозинкиназ 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 опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах у больных раком почки.

5. Оценить корреляцию уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (VEGF/VEGFR, FGFR/FGFR, PDGF/PDGFR) на опухоль-инфильтрирующих 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.

### **Научная новизна**

В диссертационном исследовании впервые продемонстрировано, что в клетках опухоли, опухолевого тромба, метастазов, а также на опухоль-инфильтрирующих и периферических лимфоцитах больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ экспрессируются HIF-зависимые ростовые факторы и рецепторные тирозинкиназы VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGFR. Доказано, что экспрессия всех изученных ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ прямо взаимосвязана друг с другом ( $p < 0,05$ ). Впервые выявлена достоверная корреляция уровней экспрессии HIF-зависимых ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках опухоли



любой локализации и на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах с высокой степенью анаплазии опухоли и значительной распространенностью опухолевого процесса. Продемонстрировано, 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 рецепторных тирозинкиназ на лимфоцитах периферической крови при ПКР. Доказано, что низкая экспрессия рецепторных тирозинкиназ на периферических лимфоцитах у больных раком почки до лечения коррелировала с высокой категорией T и наличием опухолевого венозного тромбоза. Продемонстрировано, что у больных раком почки через 180 суток после нефрэктомии отмечается достоверное нарастание экспрессии рецепторных тирозинкиназ 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 рецепторных тирозинкиназ в клетках опухоли, опухолевого тромба, метастазов, а также на опухоль-инфильтрирующих и 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 рецепторных тирозинкиназ на периферических лимфоцитах.

Полученные нами данные открывают перспективу разработки маркера, который мог бы использоваться для диагностики и наблюдения за больными ПКР.

### **Методы и методология 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 рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2, -3; PDGFR $\alpha,\beta$ ; FGFR-1,-2 изучалась в ткани ПКР путем иммуногистохимического исследования с использованием соответствующих первичных антител. Для проявки антител использовали набор REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako). Срезы докрашивали гематоксилином Майера (Sigma), депарафинизировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте и заключали под покровное 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 рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах производили их выделение из 19 операционных образцов опухоли почки в течение <4 часов после хирургического вмешательства, используя модифицированный нами протокол Baldan V. (2015) [13].

С целью изучения экспрессии HIF-зависимых рецепторных тирозинкиназ 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 опухоль-инфильтрирующие лимфоциты были подготовлены для проточной цитометрии.

Изолированные периферические и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты изучались непосредственно после выделения. Клетки инкубировали в течение 15 мин при 4°C с нормальными мышиными иммуноглобулинами (mIgG) (6 мкг мкг/10<sup>6</sup> 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-PDGFRa, клон 16.A1, PE анти-PDGFRb, клон 18.A2 (Sony Biotech), PE анти-VEGFR-1, клон D-2, PE анти-FGFR-2, клон C-8 (Invitrogen). Клетки получали на проточном цитометре 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”.

### **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 рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1 (97,2 HS), VEGFR-2 (39,2 HS), PDGFR $\beta$  (26,6 HS), PDGFR $\alpha$  (62,9 HS), FGFR-1 (7,5 HS) и FGFR-2 (46,6 HS). Экспрессия всех изученных ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ 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 $\alpha$ ,  $\beta$ ) 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  $\beta$ ), опухолевой инвазией венозной стенки (FGFR-2), категориями pN+ (PDGFR $\alpha$ ) и M+ (PDGFR $\beta$ ), развитием множественных метастазов (VEGFR2), метастазированием в надпочечники (VEGF, VEGFR-2, PDGFR $\beta$  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  $\geq 100$  HS ( $p < 0,0001$ ) и FGFR-2  $\geq 80$  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 рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , 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 ОБ пациентов, подвергнутых нефрэктомии, тромбэктомии, гиперэкспрессии VEGFR-1  $\geq 90$  HS в клетках первичной опухоли, а также тенденция к снижению ОБ при гиперэкспрессии VEGFR-2  $\geq 40$  HS и экспрессии VEGFA  $< 15$  HS в клетках опухолевого тромба. Однолетняя выживаемость пациентов с  $\geq 2$  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 рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2, -3; PDGFR $\alpha, \beta$ ; 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 $\alpha$  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 $\alpha,\beta$ ; FGFR-2. Уровень экспрессии VEGFR-2 и PDGFR $\beta$  на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах 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 $\alpha,\beta$ ; 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).

### **Степень достоверности результатов**

Достаточная для анализа результатов выборка, адекватные поставленным задачам лабораторные методы исследования, достаточный для анализа онкологических результатов период наблюдения за больными, детальный анализ исходов лечения, наряду с применением адекватных методов статистической обработки данных, свидетельствуют о достоверности полученных результатов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рак почки – распространенная солидная опухоль. Несмотря на прорыв, достигнутый области системной противоопухолевой терапии, наиболее эффективным методом лечения больных клинически-локализованным и местно-распространенным почечно-клеточным раком (ПКР) остается хирургический. Диссеминация опухолевого процесса имеется у 30% пациентов на момент установки диагноза, еще у 50% больных после радикального хирургического лечения развиваются метастазы. Появление отдаленных метастазов рака почки является показанием для системной противоопухолевой терапии [1].

Рак почки прогностически разнороден. Несмотря на многочисленные усилия по разработке прогностических шкал, позволяющих моделировать течение опухолевого процесса, основными факторами, используемыми с этой целью в медицинской практике, остаются клинические характеристики пациента (соматический статус, длительность периода до лечения диссеминированной опухоли, уровни нейтрофилов, тромбоцитов, скорректированного по альбумину кальция) и клинико-морфологические признаки опухолевого процесса, отраженные в классификации TNM [55, 89, 117]. Однако исследования потенциальных молекулярных маркеров, способных предсказать течение заболевания, и, возможно, служить инструментом для диагностики рака почки, продолжаются.

Изучение молекулярно-генетических особенностей ПКР позволило выделить несколько основных вариантов опухоли. Наиболее распространенным и изученным является светлоклеточный рак почки [115], ассоциированный с высокой частотой мутаций гена вон Гиппеля-Линдау (VHL) [19], инактивация которого приводит к экспрессии гипоксия-индуцированных факторов [112] и их мишеней, прежде всего, - ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ (РТК) [62; 113]. РТК включают рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептор фактора роста фибробластов



(FGFR), рецептор фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGFR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R). Активация рецепторных тирозинкиназ (РТК) инициирует множественные нисходящие сигнальные пути, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K)/АКТ, Ras/Raf/MEK/ERK1/2, фосфолипаза С (PLC), сигнальный преобразователь и активатор транскрипции (STAT)3/STAT5-зависимые сигнальные пути. Эти множественные нисходящие сигнальные пути являются основой взаимодействия между РТК [15i]. Подавление этих цепей внутриклеточной передачи сигнала лежит в основе большинства режимов современной таргетной терапии, имеющей доказанную эффективность при раке почки [25, 27, 38, 39, 41, 48, 63, 87-89, 106-108, 119]. В рамках экспериментальной части некоторых протоколов было продемонстрировано, что экспрессия молекул-мишеней может являться предиктором ответа на таргетное лечение [98]. Влияние экспрессии ростовых факторов и РТК на течение опухолевого процесса у больных раком почки, не получавших таргетную терапию, практически не изучалось, хотя подобные данные могли бы внести существенный вклад в понимание процессов туморогенеза при ПКР.

### **1.1 Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторы**

Кислород и питательные вещества имеют решающее значение для выживания и функционирования клеток в организме. Эта потребность удовлетворяется путем развития обширной сосудистой системы, поддерживающейся процессом ангиогенеза [5]. В процессе ангиогенеза эндотелиальные клетки, реагируя на изменения в локальной среде, мигрируют в направлении растущей опухоли, образуя трубчатые структуры, укрепляемые периэндотелиальными опорными клетками. Сформировавшиеся сосуды образуют сеть, способствующую росту и метастазированию опухоли. Нормальный ангиогенез балансируется сложной регуляторной системой, представленной как про-, так и антиангиогенными факторами [5-6]. Дерегуляция ангиогенеза – «классический товарный знак» ПКР -

приводит к развитию aberrантного микроокружения и ускорению развития опухоли. Инициация ангиогенеза обусловлена, прежде всего, совместным действием фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и факторов роста фибробластов 1 и 2 типов (FGF1/2) [53].

VEGF является основным проангиогенным фактором, экспрессия которого регулируется множеством факторов роста, цитокинов и других внеклеточных молекул, продуцируемых в ответ на различные метаболические и механические условия окружающей среды клетки [7, 49]. VEGF играет ключевую роль в опухолевом ангиогенезе. Гиперэкспрессия VEGF является одним из центральных факторов, который приводит к возникновению и прогрессированию ПКР. Для увеличения размеров опухоли необходима интенсификация кровоснабжения, которая достигается путем экспрессии и секреции VEGF, индуцирующего образование новых кровеносных сосудов вокруг опухоли. Кроме того, под действием этого подсемейства факторов роста происходит диссеминация раковых клеток [53]. Именно эти свойства сделали VEGF и VEGF-индуцированный ангиогенез привлекательными терапевтическими мишенями для лечения ПКР [54].

VEGF представляет собой секретируемый клетками димерный гликопротеин. Семейство VEGF у человека содержит пять членов: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PlGF [114]. Рецепторы VEGF (VEGFR) представляют собой РТК типа V, активируемые при лиганд-опосредованной димеризации [120]. Два высокоаффинных рецептора VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (Flk-1/KDR), были идентифицированы в эндотелиальных клетках. Было показано, что Flk-1 (VEGFR2) играет главную роль в ангиогенезе опухоли. В целом существует три типа рецепторов, причем VEGFR-3 связывается только с VEGF-C и -D. Каждый из трех типов рецепторов (VEGFR-1, 2 и 3) состоит из семи иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области, трансмембранной области и последовательности тирозинкиназы с доменом киназной вставки [114].

Передача сигналов инициируется за счет связывания VEGF с его ТКР, трансфосфорилирующими тирозиновые остатки сигнальных молекул, содержащих домен SH2, тем самым активируя киназозависимые факторы транскрипции (известные как белки STAT) для активации клеточных ответов, индуцируемых VEGF. Как VEGFR-1, так и VEGFR-2 участвуют в функции эндотелиальных клеток и ангиогенезе [101], тогда как VEGFR-3, с которым могут связываться только VEGF-C и VEGF-D, играет критическую роль в лимфангиогенезе и, в основном, участвует в нормальном эмбриональном развитии [58]. Показано, что VEGF-1 необходим для стимуляции миграции моноцитов и макрофагов [60]. Нейропилины-1 и -2 являются важными корецепторами для передачи сигналов VEGF, увеличивающими сродство VEGF-A165 к его рецепторам [92].

VEGF активно участвует в ангиогенезе. Продемонстрирована важная роль VEGF в регуляции ангиоинвазии. Гипоксия побуждает паренхиматозные клетки высвободить VEGF-A во внеклеточный матрикс. VEGF-A индуцирует клеточную продукцию мембраносвязанного дельта-подобного лиганда-4 (Dll4), который служит для активации рецептора Notch, трансмембранного рецептора, регулирующего пролиферацию, выживаемость и гибель соседних клеток через межклеточный контакт [75]. Кроме того, Dll4 ингибирует миграционное поведение посредством активации рецептора Notch на соседних клетках. Кончик клеточной филоподии, богатого актином выступа на клеточной мембране, служит клетке инструментом для исследования окружающей среды, оценки и выравнивания градиента VEGF-A, а также прорастания в сторону этого градиента. Концевая клетка закрепляется на субстрате, актиновые микрофиламенты в ее филоподиях сокращаются, подтягивая клетку к источнику VEGF-A, в то время как остальные клетки размножаются. Когда кончики клеток из разных ростков встречаются, они сливаются, превращаясь в функциональный капилляр, по которому может течь кровь [6]. Функция VEGF в прорастании сосудов не совсем ясна, хотя предполагается, что VEGF,

взаимодействующий с ангиопоэтином-1 (Ang-1), играет роль в стимуляции этого процесса [84].

Для выживания опухолям нужен кислород. Сначала они могут получать достаточное количество кислорода, используя окружающую сосудистую сеть и изменяя ее морфологию и физиологию. Однако, когда опухоль становится слишком большой, и испытывать недостаток притока крови и поступления кислорода в достаточном объеме, включается «ангиогенный переключатель», и начинается процесс опухолевого ангиогенеза [93; 82]. Ангиогенное переключение запускается гипоксией, возникающей на этапе появления дефицита кислорода, диффундирующего от предсуществующей сосудистой сети к опухолевым клеткам [21]. Гипоксия вызывает выработку индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), регулирующего группу нижестоящих генов [21, 79]. HIF инициирует гиперэкспрессию проангиогенных генов, включая VEGF, Ang-1, -2, и регуляторных механизмов (таких как микро-рибонуклеиновые кислоты (РНК)), подавляя ингибиторы ангиогенеза (ангиостатин и интерферон) [79; 93]. Опухолевые клетки высвобождают VEGF в окружающее внеклеточное пространство, которое связывается с VEGFR окружающих эндотелиальных клеток, способствуя местному ангиогенезу и формируя опухоль-ассоциированные микрососуды для доставки крови, несущей кислород, к опухоли.

По сравнению с нормальной сосудистой системой опухолевые сосуды крайне беспорядочны и малоэффективны в отношении доставки питательных веществ. Они имеют более извитой ход, больший диаметр и менее равномерное разветвление по сравнению с их нормальными аналогами, плохо пропускают кровь и имеют высокую проницаемость для больших молекул [82; 91]. Эти аномалии опухолевой сосудистой сети приводят к хронической гипоксии части опухоли, стабилизируя сигнальный путь HIF / VEGF, описанный выше, и, как следствие, приводят к стимуляции ангиогенеза [79]. Перепроизводство VEGF-A приводит к развитию значительного

количества концевых клеток сигнального пути Dll4, что отчасти является причиной высокой степени разветвленности опухолевой сосудистой сети [79; 33].

Онкогены играют заметную роль в запуске ангиогенного переключения. Экспрессия онкогена H-Ras в линии клеток кишечного эпителия крыс IEC-18 приводит к усилению регуляции VEGF и значительному увеличению васкуляризации *in vivo* [104]. Передача сигналов Ras также приводит к стабилизации полученных матричных РНК (мРНК) и возможному усилению их транскрипции [94]. Ген-супрессор p53 обычно служит для подавления VEGF при одновременном повышении активности тромбоспондина-1, антиангиогенного фактора; мутации в этих генах служат для повышения активности VEGF [18, 103]. p53 действует как необходимый фон для c-Myc, гена, запускающего экспрессию VEGF, одновременно подавляя тромбоспондин-1. В опухолях мутации p53 служат для повышения активности c-Myc, тем самым увеличивая экспрессию VEGF [18].

По сравнению с VEGF-A VEGF-B играет незначительную роль в ангиогенезе [133]. VEGF-C и VEGF-D активно участвуют в лимфангиогенезе. В опухолях отмечается гиперэкспрессия VEGF-C и VEGF-D, активирующих VEGFR-3 посредством паракринной сигнальной петли, тем самым стимулируя рост лимфатических сосудов [131, 4].

Антиангиогенная таргетная терапия – современный стандарт лечения распространенного ПКР, при этом абсолютное большинство зарегистрированных препаратов блокируют VEGF или его рецепторы. Разработанные тирозинкиназные ингибиторы (ТКИ) инактивируют достаточно широкий спектр рецепторных тирозинкиназ, однако все препараты блокируют VEGFR. В настоящее время в первой линии терапии ПКР рекомендовано использование моноклональных антител к VEGF (бевацизумаб), ТКИ сунитиниба (ингибитор PDGFR, VEGFR-1-3, c-KIT), пазопаниба (ингибитор VEGFR-1-3, PDGFR и c-KIT), акситиниба (ингибитор VEGFR-1, -2, -3, PDGFR) в комбинации с ингибитором контрольных точек пембролизумабом, а также кабозантиниба (ингибитор VEGFR-1-3, AXL, MET

(рецептор фактора роста гепатоцитов), RET, рецептора фактора роста стволовых клеток KIT, FLT3, ROS1, MER, TYRO3, TRKB и TIE-2). Во второй линии терапии после цитокинов показано назначение ТКИ сорафениба (ингибитор Raf-1, B-Raf, VEGFR-2, PDGFR, FMS-подобной тирозинкиназы-3 и c-KIT) и пазопаниба; во второй линии терапии после ингибиторов ангиогенеза – ТКИ акситиниба, ленватиниба (ингибитор FGFR 1-4, VEGFR 1-3, PDGFR- $\alpha$ , рецепторов RET, KIT) в комбинации с эверолимусом (ингибитор мишени рапамицина млекопитающих) и кабозантиниба. Антиангиогенная монотерапия в первой линии лечения позволяет добиться частоты объективных ответов (ЧОО), составляющей 20-31%, при медиане беспрогрессивной выживаемости (БПВ), колеблющейся от 8,4 до 11 месяцев, и общей выживаемости (ОВ) – от 18,3 до 26,6 месяца. Во второй линии лечения монотерапия ингибиторами VEGF обеспечивает ЧОО 2-19%, медиану БПВ - 5,5-7,4 месяца и ОВ – 17,8-21,4 месяца [25, 27, 38, 39, 41, 48, 63, 87-89, 106-108, 119].

Несмотря на высокую конкордантность результатов применения одних и тех же анти-VEGF препаратов в разных исследованиях, индивидуальный разброс показателей эффективности терапии очень велик и вряд ли может быть объяснен только различиями клинических характеристик пациентов. Очевидно, что только часть больных получает пользу от антиангиогенного лечения. Существует острая необходимость в разработке биомаркеров – предикторов ответа на антиангиогенную терапию. Высокая противоопухолевая эффективность ингибиторов VEGF продемонстрирована у пациентов, которые имеют мутации VHL. Однако больные ПКР с диким типом VHL также способны отвечать на антиангиогенную терапию. Предпринимаются постоянные попытки выделения предикторов противоопухолевого ответа, включая оценку экспрессии молекул-мишеней в опухолевых клетках и сосудистой сети опухоли, внутриклеточного давления, сатурации опухоли кислородом, циркулирующих в крови эндотелиальных клеток, уровня молекул-мишеней в сыворотке и визуализации опухолевого кровотока. В некоторых работах изучалось потенциальное влияние VEGF и VEGFR на исход

терапии антиангиогенными таргетными препаратами и прогноз пациентов. Опубликованные результаты противоречивы.

В систематическом анализе (2017), включившем данные 900 больных диссеминированным ПКР, получавших ТКИ сунитиниб в рамках 8 исследований, продемонстрировано влияние полиморфизма генов VEGF и VEGFR (особенно, VEGFR1) на результаты терапии ТКИ. Так, носители VEGFR1 rs9582036 AA / AC и rs9554320 CC / AC имели лучшие показатели ОБ; VEGFA rs2010963 оказался ассоциирован со снижением БПВ [23].

Porta C. et al. (2010) выявили, что уровень растворимых форм VEGF в сыворотке крови 85 больных ПКР являлся независимым фактором риска БПВ на фоне терапии сунитинибом [98]. Paule V. et al. (2010) показали, что уровни растворимых изоформ VEGF (VEGF<sub>121</sub> и VEGF<sub>165</sub>) коррелировали с ответом на терапию сунитинибом у 23 пациентов с метастатическим ПКР, а отношение VEGF<sub>121</sub>/VEGF<sub>165</sub> >1,25 являлось фактором риска ОБ (P=0,02) [96].

В ряде ранних работ не было подтверждено влияния уровня экспрессии VEGF в опухоли почки на эффективность анти-VEGF терапии и выживаемость больных ПКР [59; 71].

Minardi D. et al. (2013) изучали корреляцию экспрессии VEGF, определенной иммуногистохимическим методом на опухолевых и эндотелиальных клетках 41 больного ПКР, получавшего сунитиниб. Для оценки уровня экспрессии VEGF рассчитывали показатель H-score (HS), учитывающий как количество экспрессирующих маркер клеток, так и интенсивность окрашивания. Авторы выявили корреляцию VEGF HS со стадией ПКР и группой прогноза Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) [86]. Исследователи отметили значимое снижение выживаемости без отдаленных метастазов и ОБ после радикальной нефрэктомии при гиперэкспрессии VEGF (>100HS) как на опухолевых, так и на эндотелиальных клетках. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что клетки ПКР, продуцирующие значительное количество VEGF, имеют выраженную способность к

росту и диссеминации, а ангиогенная активность может быть выше в опухолях с высокой склонностью к инвазии. Авторам не удалось продемонстрировать влияния уровня экспрессии VEGF на БПВ и ОВ, рассчитанных от момента назначения сунитиниба [86].

В дальнейшем та же исследовательская группа изучила прогностическую роль экспрессии VEGF у 137 больных ПКР, ранее не получавших лечения, пытаясь выделить подгруппу пациентов, способных получить пользу от адьювантного назначения антиангиогенной таргетной терапии после хирургического вмешательства. Авторы отметили достоверно более высокую экспрессию VEGF при большей стадии ПКР и степени дифференцировки опухоли G3–4. Медиана ОВ оказалась значимо выше при низкой (<25%) экспрессии VEGF по сравнению с гиперэкспрессией (>25%) данного маркера (206 месяцев и 65 месяцев соответственно,  $p < 0,001$ ) [85].

Tsuchiya N. (2001) оценил экспрессию VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 в 23 образцах ПКР, окружающей нормальной ткани почек и эндотелиальных клетках с помощью стандартных методов иммуногистохимического анализа. Авторы не выявили взаимосвязи между экспрессией изучавшихся маркеров и клинικο-морфологическими характеристиками опухоли [125].

Противоположные результаты были получены в другой работе. Lkhagvadorj S. et al. (2014) выполнили иммуногистохимическое исследование экспрессии VEGFR-1 в 126 образцах ткани светлоклеточного ПКР, фиксированных в парафине. Экспрессия VEGFR-1 была обнаружена в 59 (46,8%) препаратах. Авторы отметили, что более высокая экспрессия VEGFR-1 прямо коррелировала с низкой степенью анаплазии опухоли по Фурману и отсутствием инвазии тканей почечного синуса, но не влияла на ОВ [83].

Kluger H. et al. (2008) провели исследование ретроспективной серии из 334 образцов ПКР, оценив экспрессию VEGF и его рецепторов VEGFR-1, -2, -3 количественным флуоресцентным иммуногистохимическим методом в трех



тканевых компонентах: клетках опухоли, эндотелия сосудов и нормальной окружающей ткани почки. Как VEGF, так и VEGFR были сильно коэкспрессированы как в опухоли, так и в соседних нормальных клетках ( $p < 0,001$  для всех). Экспрессия VEGFR-1 и -2 на опухолевых клетках значимо обратно коррелировала с площадью сосудов ( $P < 0,0001$ ). Отмечена обратная координированная экспрессия VEGF и VEGFR. Экспрессия VEGF/VEGFR оказалась ассоциирована со степенью анаплазии опухоли, но не коррелировала с гистологическим вариантом ПКР. Высокая коэкспрессия VEGF и VEGFR в опухолевых клетках являлась независимым фактором риска ОБ. Авторы предполагают, что больные с высокой коэкспрессией VEGF и VEGFR могут иметь больший шанс ответа на антиангиогенную таргетную терапию [74].

Исследовав 84 препарата светлоклеточного ПКР, Jacobsen J. et al. (2004) отметил более высокую экспрессию VEGFR-2 при ранних стадиях заболевания и продемонстрировал снижение медианы ОБ у пациентов с уровнем VEGF ниже медианы [68].

Eronat O. et al. (2018) изучали экспрессию VEGFR-2 и -3 в клетках из образцов опухоли, полученных во время радикальной нефрэктомии или резекции почки у 48 больных ПКР. Авторы не обнаружили корреляции данных маркеров с размером, гистологическим вариантом и степенью анаплазии опухоли по Фурману, категорией pT, наличием регионарных и отдаленных метастазов. Исследователи полагают, что полученные результаты не позволяют использовать VEGFR-2 и VEGFR-3 в качестве предикторов прогноза при ПКР [37].

Bierer S. et al. (2008) получили аналогичные результаты, изучая уровень экспрессии лимфангиогенных факторов, включая VEGF-C, VEGF-D и VEGFR-3, в 166 образцах светлоклеточного и папиллярного ПКР. Ни один из этих маркеров не имел существенной связи с категориями T, N, M, БПВ и ОБ [17].

## 1.2 Фактор роста фибробластов (FGF) и его рецепторы

Семейство факторов роста фибробластов (FGF) состоит из 23 сигнальных полипептидов FGF, которые функционируют как мощные митогены, стимулируя рост фибробластов, эндотелиальных и раковых клеток. Семейство FGF играет важную роль в эмбриональном развитии, поддержании систем органов у взрослых, регенерации тканей, заживлении ран и кроветворении. FGF2, также известный как базовый FGF (bFGF), является наиболее изученным членом семейства FGF и представляет собой регулятор роста и дифференцировки клеток в физиологических и патологических условиях [99; 77]. FGF2 существует в низко- и высокомолекулярной изоформах, которые транслируются из общей мРНК через альтернативные кодоны инициации трансляции [43]. Низкомолекулярный (LMW) FGF2 представляет собой белок 18 кДа, транслируемый с обычного стартового кодона AUG [65]. LMW FGF2 содержится в клеточных цитоплазме и ядре, а также может секретироваться клетками-мишенями [42]. Изоформы FGF2 с высокой молекулярной массой (HMW) (22-, 22,5-, 24- и 34-кДа) продуцируются путем инициации трансляции выше и в рамке кодона AUG в сайте CUG. HMW FGF2 локализуется в ядре и передает сигналы независимо от FGFR [132]. Подобно HMW FGF2, LMW FGF2 может также функционировать в цитозоле и ядре клеток посредством эндоцитоза активированных комплексов FGF-FGFR [27]. Было показано, что как FGFR1, так и FGF2 локализуются в ядерном матриксе, где они могут совместно активировать транскрипцию и, таким образом, контролировать пролиферацию клеток [35].

Было идентифицировано пять FGFR, четыре из которых (1-4) являются трансмембранными РТК [40]. Внеклеточные области этих рецепторов содержат три иммуноглобулин-подобных домена (IgI, IgII и IgIII), связанных с цитоплазматическим доменом через трансмембранную  $\alpha$ -спираль. Во время экспрессии гена FGFR-1, -2, -3 могут подвергаться альтернативному сплайсингу.

Домен IgIII состоит из инвариантного экзона IgIIIa, альтернативно сплайсированного к IgIIIb или IgIIIc. Экспрессия IgIIIb и IgIIIc важна для определения специфичности передачи сигналов FGF. В то время как FGF1 связывается со всеми FGFR, FGF2 связывается с FGFR1 (IIIb), FGFR1 (IIIc), FGFR2 (IIIc) и FGFR4 [77]. LMW FGF2 преимущественно связывается с FGFR1 (IIIc) [134]. У FGFR5 отсутствует внутриклеточный домен тирозинкиназы, тем не менее, этот рецептор может связываться с множественными лигандами FGF, действуя в качестве негативного регулятора передачи сигналов [127].

Чтобы инициировать передачу сигналов LMW FGF2 взаимодействует с гепарин-сульфат-протеогликанами (HSPG) и FGFR. После связывания FGF, HSPG и FGFR с образованием тройного комплекса FGFR димеризуются, что приводит к конформационным изменениям в структуре FGFR и последующему межмолекулярному трансфосфорилированию множества цитоплазматических остатков тирозина. FGFR передает внеклеточные сигналы двум основным внутриклеточным субстратам, которые представляют собой фосфолипазу C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) (также известную как FRS1) и субстрат FGFR 2 (также известный как FRS2). Фосфорилирование остатков тирозина FGFR1 создает сайты связывания для домена SH2 PLC- $\gamma$ , необходимого для фосфорилирования и активации PLC- $\gamma$ . FRS2, напротив, ассоциирован с юкстамембранной областью FGFR. Фосфорилирование FRS2 имеет важное значение для активации Ras-митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) и фосфоинозитид-3-киназы-Акт (PI3K-Акт) в опухолевых и эндотелиальных клетках [66, 72].

Биодоступность, стабильность и концентрация FGF2 в клеточном микроокружении контролируется за счет взаимодействия FGF2 с молекулами внеклеточного матрикса (ECM). FGF2 может прочно связываться с HSPG в ECM и высвобождается только благодаря действию FGF-связывающего белка (FGF-ВР). Взаимодействие FGF со свободным или связанным с HSPG гепарином также регулирует биодоступность FGF. Тромбоспондин-1 (TSP-1), пентраксин 3 (PTX3) и

хсFGFR1 (растворимая форма внеклеточной части FGFR1) предотвращают взаимодействие FGF2 с FGFR [10].

Экспрессия FGF2 и FGFR в нормальных клетках строго регулируется. Однако передача сигнала FGF2 в опухоли нарушена. Гиперэкспрессия FGFR в опухолевых клетках обусловлена дерегуляцией транскрипции или хромосомной амплификацией [8]. Повышенная продукция FGFR1 индуцирует клеточную трансформацию [16]. Амплификация FGFR2 сопровождается угнетением С-концевого экзона, регулирующего интернализацию рецептора для подавления передачи сигнала [22]. Нарушение прекращения передачи сигнала FGFR приводит к непрерывной активации рецептора. Кроме того, мутация FGFR также поддерживает его экспрессию на поверхности клетки. Мутации во внеклеточном домене FGFR облегчают связывание лигандов, тогда как мутации в трансмембранных и киназных доменах приводят к постоянной активации рецепторов [8]. По данным исследований на клеточных линиях рака, переход от FGFR IIIb к FGFR IIIc путем альтернативного сплайсинга приводит к дополнительной аутокринной активации рецептора [111].

Гиперэкспрессия FGF/FGFR стимулирует ряд процессов, способствующих размножению опухолевых клеток, ангиогенезу и изменениям микроокружения опухоли. Прежде всего, FGF2 является мощным проангиогенным фактором роста. После высвобождения опухолевыми, стромальными клетками и внеклеточным матриксом (ECM) FGF2 оказывает паракринное и аутокринное влияние на эндотелиальные клетки [50]. Эндотелиальные клетки преимущественно экспрессируют FGFR-1 и, в меньшей степени, - FGFR-2 [69]. Активация этих рецепторов приводит к пролиферации, миграции клеток эндотелия и ангиогенезу. FGF2 усиливает выработку Тромбоспондин-1 (TSP-1), пентраксин 3 (PTX3) в эндотелиальных клетках, что приводит к деградации ECM и способствует образованию сосудов [31]. Ответ эндотелиальных клеток на FGF2 регулируется интегринами, способствующими клеточной адгезии, миграции, пролиферации и

морфогенезу [122]. Доказана перекрестная связь между передачей проангиогенных сигналов FGF и VEGF [20].

FGF2, секретируемый стромальными фибробластами, индуцирует пролиферацию опухолевых клеток посредством паракринной передачи сигналов FGFR [47]. Кроме того, фибробласты в опухолевой строме могут быть активированы FGF2, секретируемым эндотелиальными и опухолевыми клетками [24]. Активированные фибробласты продуцируют протеазы, разрушающие ECM и способствующие секреции факторов роста, включая FGF2, в опухолевом микроокружении [110].

Рак почки – гипervasкулярная опухоль, что позволяет предполагать возможное влияние FGF2/FGFR на туморогенез. Ранние исследования были направлены на изучение FGF2 в сыворотке крови у больных ПКР. Некоторым исследовательским группам не удалось подтвердить гипотезу о повышении сывороточного FGF2 у всех пациентов с ПКР [36]. Другие авторы доказали достоверное повышение концентрации FGF2 в сыворотке больных раком почки по сравнению со здоровыми добровольцами, однако не выявили корреляции уровня маркера со степенью распространенности опухолевого процесса [61]. Тем не менее, в некоторых работах сывороточная концентрация FGF2 прямо коррелировала со стадией ПКР и наличием отдаленных метастазов [45; 105; 116]. Более того, в исследовании Duensing S. et al. (1995) повышенные уровни FGF2 оказались ассоциированы со снижением ОВ после операции [34].

Впервые экспрессия FGF2 в ткани ПКР была изучена Horstmann M. et al. (2005) с использованием иммуногистохимического метода. Авторы использовали фиксированные в парафине блоки тканей из центральной и краевой частей опухоли, а также нормальной окружающей почечной паренхимы 259 пациентов. Тест считали отрицательным при окрашивании <5%, положительным –  $\geq 5\%$  из 400-500 опухолевых клеток. Как центральная часть опухоли, так и ее край экспрессировали FGF2, при этом частота экспрессии оказалась выше в краевой зоне (71/188 (37,7%) и

57/202 (28,2%)), которую авторы расценивали как фронт опухолевого роста. Нормальная ткань почки имела меньшую частоту экспрессии FGF2 (32/120 (26,6%)) [61].

Tsimafeyev I. et al. (2011) отметили выраженную гиперэкспрессию FGFR-1 в клетках ПКР. Экспрессия FGFR изучалась в образцах ткани опухоли почки (n 100) и регионарных метастазах ПКР (n 40) иммуногистохимическим полуколичественным методом. Гиперэкспрессия FGFR1 отмечена в 98% образцах первичных опухолей и в 82,5% препаратов лимфогенных метастазов, FGFR2 - в 4% и 5% образцах соответственно. В нормальной ткани почки экспрессия FGFR1 была значительно ниже (2,5%;  $p=0,001$ ); а экспрессия FGFR2 не обнаружена [124]. Iacovelli R. et al. (2018) оценивали экспрессию FGFR-1 и FGFR-2 в 36 операционных образцах ткани ПКР и зарегистрировали положительное окрашивание ( $\geq 5\%$ ) с меньшей частотой, в 16% и 30% случаев соответственно [64].

Влияние FGF/FGFR на прогноз больных раком почки практически не изучено. В исследовании Horstmann M. (2005) повышенная экспрессия FGF2 в крае роста опухоли являлась независимым фактором риска ОВ наряду со степенью анаплазии G и категорией N+ [Horstmann 2005]. В нескольких исследованиях отмечено негативное влияние повышенной экспрессии FGF/FGFR на прогноз больных ПКР, получающих антиангиогенную терапию. Так, по данным некоторых авторов, высокий сывороточный уровень FGF коррелировал с прогрессированием диссеминированного ПКР на фоне терапии сунитинибом [97; 130]. Iacovelli R. (2018) отметил корреляцию низкой экспрессии FGFR-2 с увеличением БПВ на фоне таргетной антиангиогенной терапии [64]. Но T. et al. (2015) отметили достоверное снижение БПВ больных диссеминированным ПКР, получавших третью линию терапии сорафенибом (n 40), имевших гиперэкспрессию FGFR-1 и FGFR-2 [57].

Исследования, процитированные выше, служат подтверждением гипотезы о возможной роли сигнального пути FGF/FGFR в развитии резистентности к анти-VEGF препаратам. Использование FGF/FGFR в качестве мишеней для

лекарственной терапии после ингибиторов VEGF является весьма привлекательным подходом. Разработан ряд молекул, способных блокировать FGFR. В настоящее время в рандомизированном исследовании уже удалось доказать эффективность анти-FGFR-1,-2,-3 ТКИ ленватиниба (в комбинации с эверолимусом), позволившего преодолеть резистентность к анти-VEGF терапии у больных ПКП [63].

### **1.3 Фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF) и его рецепторы**

Постоянно пополняющаяся фактологическая база свидетельствует о том, что процессы апоптоза при различных злокачественных опухолях нарушаются из-за дерегуляции ряда сигнальных сетей и комплексов, способствующей выживанию клеток. Результаты работ, изучающих передачу сигналов, индуцированных PDGF, стимулируют новые направления исследований, которые должны не только объяснить молекулярные механизмы канцерогенеза, но и определить мишени для таргетной терапии. Семейство PDGF состоит из полипептидных гомодимеров PDGF-A и -DD, а также гетеродимера PDGF-AB. PDGF могут связываться с РТК PDGFR- $\alpha$  и - $\beta$ . Гены-мишени PDGF регулируются сигнальным путем HIF. Изоформы PDGF внутриклеточно трансдуцируют сигналы, связываясь с рецепторами PDGF $\alpha$  и  $\beta$ -тирозинкиназы. Структурно эти рецепторы PDGF сходны друг с другом и состоят из пяти иммуноглобулин-подобных доменов во внеклеточной области и доменов тирозинкиназы, расположенных во внутриклеточной области. Ig-подобные домены 2 и 3 предоставляют сайт связывания для лиганда, который дополнительно стабилизируется путем прямого взаимодействия рецептор-рецептор с участием Ig-подобного домена 4. Идентифицировано 10 аутофосфорилированных остатков тирозина в рецепторе PDGFR $\alpha$  и 11 – в рецепторе PDGFR $\beta$ . Белки, содержащие домен SH2, селективно связываются с различными фосфорилированными остатками в PDGFR. Например, было показано, что фосфолипаза C- $\gamma$ , SHP-2 тирозинфосфатаза и белок, активирующий GTPase для Ras, связывают до аутофосфорилированных остатков тирозина в PDGFR. PDGFR также обеспечивает сайт связывания для

белков, которые не обладают внутренней ферментативной активностью. Хорошо изученные примеры включают Grb2, который связывает SOS1 для активации сигнального каскада Ras и ERK MAP-киназы. Регуляторная субъединица p85 PI3K также связывается с PDGFR, который впоследствии образует комплекс с субъединицей p110. Сигнал, индуцированный PDGF, позитивно и негативно модулируется рядом молекул [8].

Все члены семейства PDGF проявляют выраженную ангиогенную активность. Ось передачи сигнала PDGF /PDGFR представляет собой хорошо изученный механизм привлечения периваскулярных гладкомышечных клеток и перицитов как во время эмбрионального развития, так и у взрослых, когда возникает необходимость в созревании сосудов [9]. В связи с этим PDGF и PDGFR играют решающую роль в нормальном развитии различных органов, включая сердечно-сосудистую систему, легкие, кишечник, почки, кожу, яички, а также нейроглию [102].

PDGF играет как минимум три роли, которые могут привести к развитию опухоли, включая аутокринную стимуляцию раковых клеток, индукцию и поддержание ангиогенеза, а также контроль опухолевого интерстициального давления. Блокада аутокринной стимуляции роста опухоли путем блокирования PDGFR в клеточных линиях и на моделях ксенотрансплантата показала положительные результаты в отношении дерматофибросарком, рака предстательной железы, яичников и глиом [126]. В экспериментальной модели было показано, что лишенные VEGF клетки нуждаются в PDGFR $\alpha$  для привлечения фибробластов в строму опухоли. Продемонстрировано, что PDGF является основным хемотаксическим фактором стромальных фибробластов, продуцируемым опухолевыми клетками, и нарушение паракринной передачи сигналов с помощью PDGFR $\alpha$  значительно снижает интенсивность роста опухоли, ингибируя как рост опухолевых клеток, так и ангиогенез [67]. PDGF и другие факторы роста, в частности VEGF, способствуют ангиогенезу, связанному с опухолью, посредством



аутокринных и/или паракринных механизмов, а также миграции во время инвазии опухоли. На экспериментальной модели глиомы было продемонстрировано, что PDGF-B усиливает ангиогенез, стимулируя экспрессию VEGF в опухоль-специфических эндотелиальных клетках и привлекая перициты [52]. В той же модели было показано, что PDGF-B усиливает пролиферацию как опухолевых, так и эндотелиальных клеток. В ткани глиобластомы человека PDGFR $\alpha$  экспрессируется опухолевыми клетками, а PDGFR $\beta$  - эндотелием новообразованных кровеносных сосудов [56].

Экспрессия PDGF и их рецепторов продемонстрирована при широком спектре злокачественных опухолей человека. При ПКР исследования, посвященные изучению данного сигнального пути, немногочисленны.

По данным The Cancer Genome Atlas (TCGA) дефекты, включая мутации, делеции и количественные aberrации генов PDGF A/B/C/D и PDGFR $\alpha/\beta$  при ПКР обнаруживаются редко, в <10% случаев [7].

Sulzbacher I. et al. (2003) провели иммуногистохимическое исследование хирургических образцов ткани ПКР 112 пациентов, выявили экспрессию PDGF-A в 56,3% и PDGFR- $\alpha$  – в 87,5% случаев и определили прогностически значимые пограничные значения данных маркеров как окрашивание >38,8% из 500 клеток для PDGFR- $\alpha$  и >18,4% клеток для PDGF-A. Гиперэкспрессия PDGF-A и PDGFR- $\alpha$  коррелировала со степенью анаплазии опухоли G3-4. Экспрессия ростового фактора не являлась фактором прогноза пациентов, в то время как гиперэкспрессия его рецептора в однофакторном анализе оказалась ассоциирована со снижением безрецидивной выживаемости [121]. В другом исследовании гиперэкспрессия PDGFR- $\alpha$ , также являлась фактором неблагоприятного прогноза: Kusuda Y. et al. (2010) изучали экспрессию 19 молекулярных маркеров у больных диссеминированным раком почки, подвергнутых нефрэктомии, и получавших сорафениб после развития резистентности к цитокинам. Авторы не выявили маркеров-предикторов ответа на таргетную терапию. Гиперэкспрессия PDGFR- $\alpha$

являлась независимым фактором риска БПВ в одно- и многофакторном анализе [80]. В работе Tawfik O. et al. (2007), направленной на определение прогностической значимости ряда молекулярных маркеров при ПКР у 62 радикально оперированных пациентов, экспрессия PDGFR- $\alpha$  не коррелировала с характеристиками опухоли, однако являлась независимым фактором риска ОБ наряду с костными метастазами [123].

Song S. et al. (2014) провели иммуногистохимическое исследование экспрессии VEGF/VEGFR2 и PDGF-B/PDGFR- $\beta$  в 1423 операционных образцах ткани рака почки (светлоклеточного – 88,7%). Цитоплазматическая гиперэкспрессия PDGF-B и PDGFR- $\beta$  чаще всего отмечалась при папиллярном раке почки (45% и 27,5% соответственно) и была выявлена в 22,3% и 32,8% препаратов светлоклеточных опухолей соответственно [118]. Cumpănas A. et al. (2016) изучали экспрессию PDGF-B/PDGFR $\beta$  в опухолевых клетках и сосудах в 50 образцах ткани ПКР. Экспрессия PDGF-B была обнаружена в зрелых и незрелых сосудах, а также клетках ПКР. Уровень PDGF-B коррелировал со степенью анаплазии опухоли по Фурману и был выше при папиллярном раке. PDGFR $\beta$  экспрессировался в трети случаев, при этом высокой экспрессии выявлено не было, а умеренная экспрессия имела место только в препаратах папиллярного ПКР. Созревание кровеносных сосудов включает ингибирование VEGF-зависимой активации эндотелиальных клеток. Ингибиторная фракция VEGF165b, по данным Cumpănas A. (2016), значимо коррелировала с коэкспрессией PDGF-B/PDGFR $\beta$ . Возможно, раннее и быстрое созревание сосудов при ПКР обусловлено блокадой эндотелиальных клеток с помощью VEGF165b, а также привлечением и созреванием периваскулярных клеток, управляемых осью PDGF-B/PDGFR $\beta$  [28]. В 2007 году Ball S. et al. показали, что VEGF-A стимулирует экспрессию PDGFR $\alpha$  и - $\beta$  и, кроме того, связывается с обоими типами рецепторов, что делает VEGF-A потенциальным регулятором для привлечения как эндотелиальных, так и периваскулярных клеток [14].

Wang W. et al. (2015) исследовали экспрессию PDGF-B и PDGFR $\beta$  у 174 больных ПКР и обнаружили достоверное снижение канцер-специфической смертности при гиперэкспрессии PDGF-B ( $p \leq 0,001$ ) [Wang]. В другой работе, включившей образцы ткани 314 больных ПКР, авторы выявили, что периваскулярная гиперэкспрессия PDGFR- $\beta$  является негативным фактором прогноза, прямо коррелирует с высокой стадией и G3-4 степенью анаплазии опухоли, а также ассоциирована с достоверным снижением ОБ [44].

Предполагается, что наряду с FGF/FGFR сигнальный путь PDGF/PDGFR может играть роль в развитии резистентности к анти-VEGF таргетной терапии, и применение препаратов, обладающих способностью ингибировать PDGFR, способно блокировать прогрессирование ПКР. В настоящее время доказана эффективность ряда анти-PDGFR ТКИ, включая сунитиниб, сорафениб, акситиниб и ленватиниб [41; 38; 106; 63].

#### **1.4. Заключение**

Согласно современной и весьма стройной теории, рак почки характеризуется патологической активацией ряда взаимодействующих друг с другом сигнальных путей, регулируемых HIF, включая VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR. Ростовые факторы, активируя РТК, оказывают митогенное действие на клетки опухоли, проангиогенное влияние на эндотелий и перициты, а также изменяют состав опухолевого микроокружения, способствуя туморогенезу. Наиболее весомым подкреплением этих теоретических выкладок служит доказанная в рандомизированных исследованиях эффективность мультикиназных ингибиторов.

Удивительно, но несмотря на то, что воздействие на HIF-зависимые сигнальные пути уже пришло в клиническую практику, особенности экспрессии и прогностической роли ростовых факторов и тирозинкиназ у больных ПКР практически не изучены. Завершенные работы, как правило, посвящены исследованию рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках. В доступной нам

литературе мы не обнаружили данных об экспрессии ростовых факторов и тирозинкиназ на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, и периферических лимфоцитах. Кроме того, фактически отсутствуют комплексные исследования, направленные на изучение коэкспрессии VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR.

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

## **ГЛАВА 2. ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ**

### **2.1 Актуальность проблемы**

Главными событиями, ведущими к прогрессированию ПКР, являются митогенез, ангиогенез и лимфангиогенез, поддерживаемые высоким уровнем ростовых факторов в опухолевом микроокружении. Рак почки – опухоль, характеризующаяся гиперэкспрессией HIF-зависимых факторов роста, прежде всего – VEGF и FGF, а также рецепторных тирозинкиназ, таких как VEGFR, PDGFR и FGFR. По данным ранних исследований, ключевую роль в ангиогенезе при ПКР играют VEGF-A и его рецепторы VEGFR-1, -2, а также FGF2, его рецептор FGFR-1 и, в меньшей степени, – FGFR-2 [101]. По последним данным, PDGFR $\alpha$  и PDGFR $\beta$  имеют важное значение в формировании образующихся сосудов [102]. FGF2 и его тирозинкиназы FGFR-1 и FGFR-2 обладают митогенным действием и способствуют секреции факторов роста в межклеточный матрикс [50; 110].

Данный раздел нашей работы посвящен изучению экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2 и тирозинкиназ VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ; FGFR-1, -2 в клетках опухоли, исследованию их взаимосвязи между собой, с характеристиками опухоли и прогнозом больных ПКР.

### **2.2 Материал и методы**

#### **2.2.1 Характеристика больных раком почки**

В исследование включено 65 больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+, подвергнутых нефрэктомии. Медиана возраста – 59,0 (33-79) 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. Медиана диаметра наибольшей опухоли почечной паренхимы составила 10 (2,5-26) см. В 50

(76,9%) случаях отмечена опухолевая венозная инвазия. У 45 (69,2%) больных на момент операции имелись отдаленные метастазы. Солитарные метастатические очаги диагностированы в 22 (33,8%), множественные – в 23 (35,4%) наблюдениях. 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 (Таблица 1).

Всем больным выполнена нефрэктомия с расширенной забрюшинной лимфодиссекцией. В 50 (76,9%) случаях объем операции также включал тромбэктомию. В 28 (43,1%) наблюдений помимо первичной опухоли удалялись опухолевые очаги других локализаций: адреналэктомия выполнена 24 (36,9%), резекция контралатеральной почки – 1 (1,5%), резекция легкого – 1 (1,5%), удаление костного метастаза – 1 (1,5%) пациенту. 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, при этом у 8 (12,3%) больных имело место поражение более одного лимфоузла. Гистологическое исследование подтвердило, что все удаленные опухоли других локализаций имели строение почечно-клеточного рака и являлись метастазами первичной опухоли, локализовавшейся в удаленной почке.

**Таблица 1** – Характеристика и лечение 65 больных раком почки

Характеристика	Пациенты (n = 65)	
	Количество	%
Возраст, медиана $\pm \sigma$ (min-max), годы	59,0 $\pm$ 1,2 (33-79)	
Пол		
Мужской	43	66,2
Женский	22	33,8
Сторона поражения почки		
Правая	35	53,8
Левая	24	36,9
Обе	6	9,2
Размер опухоли почки, медиана (min-max)	10,0 $\pm$ 0,6 (2,5-26,0)	
Категория pT		
pT1a	2	3,1
pT1b	2	3,1
pT2a	8	12,3
pT3a	10	15,4
pT3b	29	44,6
pT3c	12	18,5
pT4	2	3,1
Опухолевый венозный тромбоз	50	76,9
Категория pN1	12	18,5
Категория M1	45	69,2
Количество метастазов		
1	22	33,8
>1	23	35,4
Количество локализаций метастазов		
1	34	52,3
>1	11	16,9
Локализация метастазов		
надпочечник	28	43,1
легкие	22	33,8
кости	5	7,7
печень	2	3,1

Вариант почечно-клеточного рака		
Светлоклеточный	59	90,8
Папиллярный, 1 тип	2	3,1
Папиллярный, 2 тип	3	4,6
Хромофобный	1	1,5
Степень анаплазии G		
G1	3	4,6
G2	26	40,0
G3	27	41,5
G4	9	13,8
Нефрэктомия		
Радикальная	40	61,5
Циторедуктивная	25	39,5
Удаление других опухолевых очагов		
Резекция второй почки	1	1,5
Адреналэктомия	24	36,9
Резекция легкого	1	1,5
Резекция печени	1	1,5
Удаление костного метастаза	1	1,5
Системная терапия после циторедуктивной операции*	22	88,0
Цитокиновая терапия	3	12,0
Анти-VEGF таргетная терапия	19	76,0

\*рассчитано для 25 нерадикально оперированных пациентов

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).



## **2.2.2 Методология исследования**

### **2.2.2.1 Методика хирургического лечения**

Все операции были выполнены в условиях комбинированной анестезии одной хирургической бригадой по стандартному плану. Лапаротомным доступом обнажали забрюшинное пространство со стороны поражения, выделяли почечные сосуды, последовательно перевязывали почечные артерию и вену непосредственно в области устьев. Мобилизовали, перевязывали и пересекали мочеточник. Выделяли и удаляли опухолево-пораженную почку с паранефральной клетчаткой в пределах фасции Герота.

При опухолях правой почки мобилизовали и удаляли паракавальную и аортокавальную клетчатку с лимфоузлами от ножек диафрагмы до уровня устья нижней брыжеечной артерии, при левосторонних поражениях производили удаление парааортальной и аортокавальной клетчатки с лимфоузлами от ножек диафрагмы до уровня устья нижней брыжеечной артерии.

При наличии тромба в почечной и нижней полой вене на первом этапе операции производили выделение и перевязку почечной артерии. Вторым этапом циркулярно мобилизовали нижнюю полую вену в пределах тромботического поражения с перевязкой всех впадающих в нее коллатералей. Накладывали сосудистые турникеты выше и ниже границ тромба, а также на контралатеральную почечную вену; при внутривенном и наддиафрагмальном опухолевом венозном тромбозе дополнительно накладывали турникет на гепатодуоденальную связку. Производили мобилизацию пораженной почки с паранефральной клетчаткой в пределах фасции Герота. Пережимали ранее наложенные сосудистые турникеты, выполняли кавотомию и тромбэктомию. Удаляли почку с паранефрием и опухолевым тромбом. Дефект венозной стенки ушивали непрерывным швом. Выполняли расширенную лимфодиссекцию в пределах границ, описанных выше.

Все адреналэктомии выполнены синхронно с нефрэктомией. Больным с метастазом в ипсилатеральный надпочечник выполняли мобилизацию и удаление почки единым блоком с паранефральной клетчаткой и надпочечником. Пациентам с метастазом в контралатеральном надпочечнике производили адреналэктомию с противоположной стороны через отдельный доступ в забрюшинное пространство со стороны метастатического очага.

Одному пациенту через 6 недель после нефрэктомии произведена резекция контралатеральной почки.

Одному пациенту через 3 недели после нефрэктомии выполнена корпорэктомия L1 по поводу симптомного метастаза.

Одному больному через 4 недели после нефрэктомии произведена атипичная торакоскопическая резекция верхней доли левого легкого.

#### **2.2.2.2 Иммуногистохимическое исследование**

Для исследования использовали ретроспективно набранные операционные образцы опухолевой ткани. Во всех случаях выполнялось рутинное морфологическое исследование. Исследование выполнялось на базе лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе были использованы следующие антитела к рецепторам и ростовым факторам: anti-VEGFR1 (ab2350 Abcam, разведение 1 : 50), anti-VEGFR2 (A-3, Santa Cruz, разведение 1 : 100), anti-PDGFR $\alpha$  (C-20, SantaCruz, разведение 1 : 200), anti-PDGFR $\beta$  (P-20, SantaCruz, разведение 1 : 200), anti- FGFR1 (M2F12, SantaCruz, 1 : 200), anti-FGFR2 (C-8, SantaCruz, 1 : 200), anti-FGF-2 (G-2, SantaCruz, 1 : 200), anti-VEGF (VG-1, Dako, 1 : 100).

Микросрезы рака почки депарафинировали и регидратировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте. «Демаскировку» антигенов выполняли при нагревании срезов в течение 30 минут при 95°C цитратном (pH=6,0)

или Tris-буфере (pH=9.0) в соответствии с рекомендациями производителя антител, после чего охлаждали при комнатной температуре в течение 15 минут, промывали в дистиллированной воде 5 минут. Срезы обводили парафиновым карандашом Super PAP Pen (Invitrogen) и переносили в фосфатно-солевой буфер на 5 минут. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 5 минут в темноте с 3% перекисью водорода и промывали 5 минут в фосфатном буфере. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 минут с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина при комнатной температуре. После чего наносили первичные антитела к рецепторным тирозинкиназам или факторам роста VEGF, FGF-2 и инкубировали при +4°C в течение 16 часов, после чего срезы промывали в фосфатно-солевом буфере 2 раза по 5 минут. Для проявки антител использовали набор REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako). Срезы докрашивали гематоксилином Майера (Sigma), депарафинизировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте и заключали под покровное стекло при помощи Shandon Mount solution (Thermo). Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Nikon» Eclipse 50i при увеличении  $\times 10-40$ . Для каждого маркера определяли локализацию и интенсивность окрашивания. Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Для всех маркеров оценивалась интенсивности окрашивания (0 — отсутствие окрашивания, 1+ — слабая, 2+ — средняя и 3+ — сильная интенсивность окрашивания) и количество положительных клеток, выраженное в процентах (0–100%). Значение уровня экспрессии по иммуногистохимической шкале (H-score (HS)) рассчитывалось путем умножения процента окрашенных клеток на показатель интенсивности окрашивания [32]. В качестве отрицательного контроля использовали окрашивание срезов опухоли проявочными антителами без нанесения первичных антител. В качестве положительного контроля использовали срезы опухолей с установленной экспрессией биомаркеров и контрольные стекла.

### 2.2.2.3 Методы статистической обработки данных

Все данные пациентов внесены в базу данных, созданную на основе электронных таблиц Microsoft Excel с помощью специально разработанного кодификатора. Анализ данных осуществлялся с применением блока статистических программ SPSS Statistics 19.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию  $t$  Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения качественных параметров применялся точный критерий Фишера и  $\chi^2$  с учетом непараметрических данных и нормального распределения Пуассона. Различия признавали значимыми при  $p < 0,05$ .

Для оценки взаимосвязи признаков рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) и проводили оценку его значимости; корреляцию считали значимой при ее уровне, составляющем  $< 0,01$ .

Для оценки точности прогнозирования события в зависимости от значений анализируемых факторов строили ROC-кривые. По координатам ROC-кривых выделяли пороговое значение анализируемых факторов, наиболее значимое для составления прогноза.

Продолжительность жизни рассчитывали от даты хирургического вмешательства до последнего дня наблюдения или смерти, продолжительность жизни без рецидива - от даты радикального хирургического вмешательства до даты регистрации рецидива, продолжительность жизни без прогрессирования - от даты циторедуктивного хирургического вмешательства до даты регистрации прогрессирования рака почки. Выживаемость оценивали по методу Kaplan-Meier, различия выживаемости определяли с помощью log-rank теста. Для выявления прогностически значимых для выживаемости факторов использовали одно- и многофакторный регрессионный анализ Cox.

## 2.3 Результаты

### 2.3.1 Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки

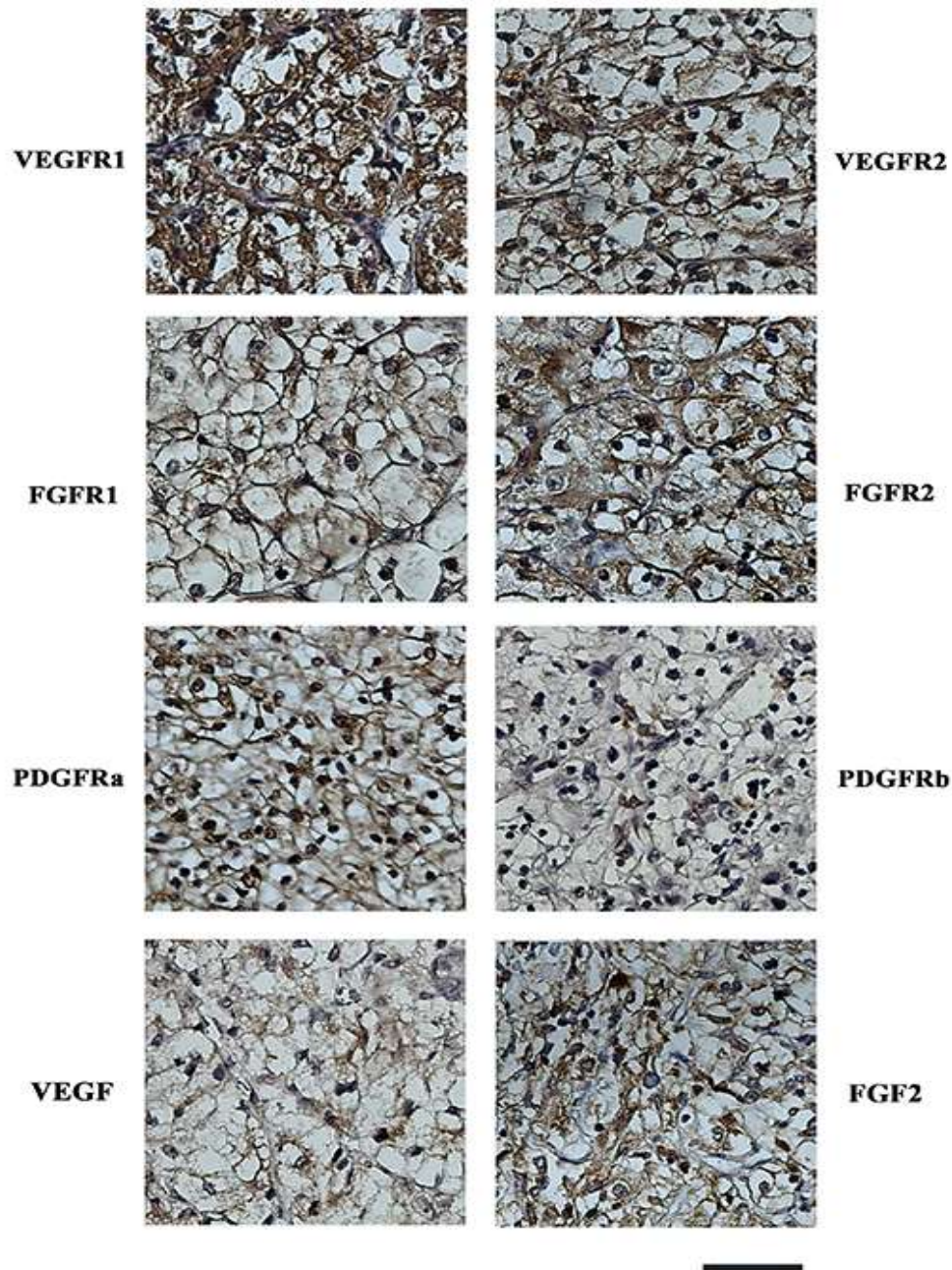
В цитоплазме и на мембране клеток первичной опухоли больных раком почки обнаружена экспрессия ростовых факторов, а также рецепторов тирозинкиназ. Частота экспрессии VEGFA составила 55,4% при среднем уровне экспрессии 32,4 HS, его рецептор первого типа продуцировался в 75,4% опухолей (97,2 HS), второго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

**Таблица 2** – Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки

Маркер в клетках опухоли почки (n=65)	Количество образцов с экспрессией, n (%)	Уровень экспрессии, средняя $\pm$ $\sigma$ , HS
VEGFA	36 (55,4)	32,4 $\pm$ 5,5
FGF2	39 (60,0)	44,2 $\pm$ 5,4
VEGFR-1	49 (75,4)	97,2 $\pm$ 10,2
VEGFR-2	36 (55,4)	39,2 $\pm$ 6,5
PDGFR $\alpha$	38 (58,5)	62,9 $\pm$ 8,4
PDGFR $\beta$	29 (44,6)	26,6 $\pm$ 5,3
FGFR-1	21 (32,3)	7,5 $\pm$ 2,2
FGFR-2	43 (66,2)	46,6 $\pm$ 6,3

Проведен анализ взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ 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 рецепторов VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$  и FGFR-2.

Уровни рецепторных тирозинкиназ также сильно прямо коррелировали между собой: VEGFR-1 – с VEGFR-2, PDGFR $\alpha$ , FGFR-2; VEGFR-2 – с VEGFR-1, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ; PDGFR $\alpha$  – с VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR $\beta$ , FGFR-2; PDGFR $\beta$  – со всеми изученными РТК; FGFR-1 - с PDGFR $\beta$  и FGFR-2; FGFR-2 – с VEGFR-1, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  и FGFR-2 ( $p < 0,05$  для всех) (Таблица 3).



**Рисунок 1** – Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки

**Таблица 3** – Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки

Уровень экспрессии	Корреляция Пирсона, 2-сторонняя значимость, p	Уровень экспрессии							
		VEGFA	FGF2	VEGFR-1	VEGFR-2	PDGFR $\alpha$	PDGFR $\beta$	FGFR-1	FGFR-2
VEGFA	Корреляция Пирсона	-	0,350**	0,199	-	0,013	0,064	0,257*	0,287*
	Знч.(2-сторон)		0,004	0,113	0,175	0,918	0,611	0,039	0,021
	N		65	65	65	65	65	65	65
FGF2	Корреляция Пирсона	0,350**	-	0,420**	0,296*	0,246*	0,099	0,035	0,390**
	Знч.(2-сторон)	0,004		0,001	0,017	0,048	0,433	0,784	0,001
	N	65		65	65	65	65	65	65
VEGFR-1	Корреляция Пирсона	0,199	0,420**	-	0,711**	0,618**	0,465**	0,185	0,347**
	Знч.(2-сторон)	0,113	0,001		0,000	0,000	0,000	0,140	0,005
	N	65	65		65	65	65	65	65
VEGFR-2	Корреляция Пирсона	-	0,296*	0,711**	-	0,484**	0,381**	-	0,193
	Знч.(2-сторон)	0,170	0,017	0,000		0,000	0,002	0,731	0,124
	N	65	65	65		65	65	65	65
PDGFR $\alpha$	Корреляция Пирсона	0,013	0,246*	0,618**	0,484**	-	0,521**	0,187	0,338**
	Знч.(2-сторон)	0,918	0,048	0,000	0,000		0,000	0,135	0,006
	N	65	65	65	65		65	65	65
PDGFR $\beta$	Корреляция Пирсона	0,064	0,099	0,465**	0,381**	0,521**	-	0,391**	0,583**
	Знч.(2-сторон)	0,611	0,433	0,000	0,002	0,000		0,001	0,000
	N	65	65	65	65	65		65	65
FGFR-1	Корреляция Пирсона	0,257*	0,035	0,185	-	0,187	0,391**	-	0,442**
	Знч.(2-сторон)	0,039	0,784	0,140	0,731	0,135	0,001		0,000
	N	65	65	65	65	65	65		65
FGFR-2	Корреляция Пирсона	0,287*	0,390**	0,347**	0,193	0,338**	0,583**	0,442**	-
	Знч.(2-сторон)	0,021	0,001	0,005	0,124	0,006	0,000	0,000	
	N	65	65	65	65	65	65	65	

\*\* . Корреляция значима на уровне 0,01. \* . Корреляция значима на уровне 0,05 (2-сторон.).

### **2.3.2. Взаимосвязь между экспрессией ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки**

Проведен анализ возможной взаимосвязи характеристик опухолевого процесса (количество пораженных почек, размер опухоли почки, гистологический вариант рака почки, степень анаплазии опухоли, категория pT, врастание опухоли в паранефрий, формирование опухолевого венозного тромбоза, протяженность тромба, инвазия опухоли в венозную стенку, категории pN и M, количество метастазов, наличие метастазов в лимфоузлы, легкие, кости, надпочечник, печень) с уровнями экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2, а также рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2; PDGFR  $\alpha, \beta$  и FGFR-1, -2. В таблицах 4 и 5 отражены только значимые корреляции.

Не выявлено значимых взаимосвязей между гистологическим вариантом рака почки и уровнями экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ ( $p > 0,05$  для всех).

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 $\alpha, \beta$  ( $p < 0,05$  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).



**Таблица 4** – Взаимосвязь характеристик первичной опухоли с экспрессией ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли у больных раком почки

Маркер	Корреляция Пирсона, 2-сторонняя значимость, N образцов	Степень анаплазии G	Категория pT	Размер опухоли почки	Инвазия паранефрия	Опухолевый тромбоз	Протяженность опухолевого тромбоза	Инвазия тромбом стенки вены
VEGFA	Корреляция Пирсона	0,045	0,135	-0,012	0,281*	-0,012	-0,091	-0,088
	Знч.(2-сторон)	0,719	0,284	0,922	0,024	0,925	0,471	0,491
	N	65	65	65	65	65	65	64
FGF2	Корреляция Пирсона	0,248*	0,109	0,104	0,354**	0,077	0,017	-0,029
	Знч.(2-сторон)	0,046	0,389	0,408	0,004	0,541	0,891	0,822
	N	65	65	65	65	65	65	64
VEGFR-1	Корреляция Пирсона	0,493**	0,338**	0,270*	0,250*	0,281*	0,178	0,132
	Знч.(2-сторон)	0,000	0,006	0,030	0,044	0,023	0,157	0,300
	N	65	65	65	65	65	65	64
VEGFR-2	Корреляция Пирсона	0,339**	0,314*	0,0254*	0,157	0,365**	0,174	0,175
	Знч.(2-сторон)	0,006	0,011	0,042	0,213	0,003	0,167	0,168
	N	65	65	65	65	65	65	64
PDGFR $\alpha$	Корреляция Пирсона	0,471**	0,127	0,219	0,219	0,143	0,114	0,143
	Знч.(2-сторон)	0,000	0,314	0,080	0,080	0,255	0,367	0,260
	N	65	65	65	65	65	65	64
PDGFR $\beta$	Корреляция Пирсона	0,286*	0,224	0,025	0,028	0,232	0,263*	0,242
	Знч.(2-сторон)	0,021	0,073	0,842	0,826	0,063	0,034	0,054
	N	65	65	65	65	65	65	64
FGFR-2	Корреляция Пирсона	0,161	0,220	0,132	0,245*	0,173	0,203	0,313*
	Знч.(2-сторон)	0,200	0,078	0,294	0,049	0,167	0,105	0,012
	N	65	65	65	65	65	65	64

\*\* . Корреляция значима на уровне 0.01 \* . Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторон.).

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  $\beta$ , опухолевая инвазия венозной стенки – FGFR-2 ( $p < 0,05$  для всех).

Гиперэкспрессия PDGFR $\alpha$  коррелировала с появлением регионарных, PDGFR $\beta$  – 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 $\beta$  и FGFR-1; в печени – с высокой экспрессией FGF2, VEGFR-1 и FGFR-2 ( $p < 0,05$  для всех) (Таблица 5).

### **2.3.3. Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли с прогнозом больных раком почки**

Медиана наблюдения за всеми больными составила  $19,9 \pm 2,9$  (1-133) месяца. Рецидивы рака почки развились у 17 (42,5%) из 40 радикально оперированных больных, в среднем, через 17,8 (1-100) месяца после хирургического лечения. Во всех случаях зарегистрировано появление отдаленных метастазов. Двум пациентам с солитарными метастазами в печени выполнена их эрадикация (резекция печени – 1, радиочастотная абляция – 1) с последующим динамическим наблюдением. Пятнадцати больным назначена антиангиогенная таргетная терапия. Максимальный ответ на лечение – стабилизация опухолевого процесса.

**Таблица 5** – Взаимосвязь диссеминации рака почки с экспрессией ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли

Маркер	Корреляция Пирсона, 2-сторонняя значимость, N образцов	Категория pN+	Категория M+	Количество метастазов	Метастазы в надпочечник	Метастазы в печень
VEGFA	Корреляция Пирсона	-0,144	0,220	-0,006	0,389**	-0,151
	Знч.(2-сторон)	0,252	0,079	0,967	0,008	0,322
	N	65	65	45	45	45
FGF2	Корреляция Пирсона	-0,045	0,231	0,000	0,171	0,358*
	Знч.(2-сторон)	0,721	0,064	0,998	0,262	0,016
	N	65	65	45	45	45
VEGFR-1	Корреляция Пирсона	0,138	0,002	0,110	-0,127	0,300*
	Знч.(2-сторон)	0,275	0,988	0,472	0,404	0,045
	N	65	65	45	45	45
VEGFR-2	Корреляция Пирсона	0,168	-0,100	0,384**	0,400**	0,146
	Знч.(2-сторон)	0,182	0,428	0,009	0,007	0,340
	N	65	65	45	45	45
PDGFR $\alpha$	Корреляция Пирсона	0,280*	-0,040	0,153	-0,273	0,204
	Знч.(2-сторон)	0,024	0,749	0,316	0,070	0,179
	N	65	65	45	45	45
PDGFR $\beta$	Корреляция Пирсона	0,132	0,305*	0,162	0,306*	0,274
	Знч.(2-сторон)	0,296	0,014	0,288	0,041	0,068
	N	65	65	45	45	45
FGFR-1	Корреляция Пирсона	0,110	-0,148	-0,062	0,385**	-0,134
	Знч.(2-сторон)	0,384	0,241	0,688	0,009	0,381
	N	65	65	45	45	45
FGFR-2	Корреляция Пирсона	0,087	0,048	0,092	-0,122	0,404**
	Знч.(2-сторон)	0,490	0,705	0,550	0,425	0,006
	N	65	65	45	45	45

\*\* . Корреляция значима на уровне 0.01. \* . Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторон.).

Из 65 пациентов 42 (64,6%) больных живы: 24 (36,9%) – без признаков болезни, 18 (27,7%) – с метастазами; 23 (35,4%) пациента умерли: 22 (33,8%) – от прогрессирования рака почки, 1 (1,5%) – от осложнений хирургического лечения (полиорганная недостаточность).

Двухлетняя ОВ и специфическая выживаемость (СВ) 65 пациентов составили 66,6% и 67,7%, медианы данных показателей равнялись  $43,8 \pm 7,7$  (95% confidence interval (CI), 28,7-58,9) и  $52,1 \pm 8,0$  (95% CI, 36,4-67,9) месяца соответственно. Медиана безрецидивной выживаемости (БРВ) 40 радикально оперированных пациентов достигла  $79,2 \pm 43,1$  (95% CI, 8,1-150,5) месяца (2-летняя – 59,3%), медиана беспрогрессивной выживаемости (БПВ) 25 больных после циторедуктивной операции –  $7,4 \pm 2,4$  (95% CI, 2,6-12,2) месяца (2-летняя – 10,4%).

Проведен анализ влияния на выживаемость варианта и степени анаплазии почечно-клеточного рака, стороны поражения почки, категории pT, опухолевой инвазии в паранефрий, наличия опухолевого венозного тромба, категорий pN и M, количества метастазов, радикальности хирургического лечения.

Учитывая тот факт, что за исключением одной смерти все летальные исходы в группе исследования были обусловлены прогрессированием рака почки, анализ факторов риска ОВ не проводился, и акцент был сделан на поиске признаков, влиявших на СВ.

В однофакторном анализе значимыми факторами риска СВ являлись: степень анаплазии G 3-4, одностороннее поражение почек, категория pT3-T4, опухолевый венозный тромбоз, множественные метастазы и нерадикальная операция ( $p < 0,05$  для всех) (Таблица 6).

**Таблица 6** – Клинико-морфологические факторы риска специфической выживаемости 65 больных раком почки

Клинико-морфологический фактор	Медиана $\pm$ $\sigma$ , месяцы	P
Вариант почечно-клеточного рака Светлоклеточный Несветлоклеточный	43,7 $\pm$ 10,4 Не достигнута	0,425
Степень анаплазии G G1-2 G3-4	79,3 $\pm$ 18,9 33,8 $\pm$ 12,0	0,002
Сторона поражения почек Одна Две	43,7 $\pm$ 9,2 Не достигнута	0,043
Категория pT pT1-T2 pT3-T4	Не достигнута 43,8 $\pm$ 11,6	0,018
Опухолевая инвазия паранефрия Нет Да	59,3 $\pm$ 28,9 43,8 $\pm$ 1,2	0,206
Опухолевый венозный тромбоз Нет Да	79,3 $\pm$ 0,0 33,8 $\pm$ 9,7	0,008
Категория pN pN0 pN+	52,1 $\pm$ 10,7 33,8 $\pm$ 13,7	0,177
Категория M M0 M1	Не достигнута 43,8 $\pm$ 10,9	0,299
Метастазы Солитарные Множественные	79,3 $\pm$ 41,6 42,7 $\pm$ 21,5	0,020
Радикальная операция Да Нет	79,3 $\pm$ 35,9 33,8 $\pm$ 15,1	0,010

В однофакторном анализе отмечена тенденция к снижению БРВ у больных раком почки с опухолевым венозным тромбозом ( $p=0,087$ ). Значимых факторов риска БРВ не выделено (Таблица 7).

**Таблица 7** – Клинико-морфологические факторы риска безрецидивной выживаемости 40 радикально оперированных больных раком почки.

Клинико-морфологический фактор	Медиана $\pm$ $\sigma$ , месяцы	P
Вариант почечно-клеточного рака Светлоклеточный Несветлоклеточный	79,3 $\pm$ 42,3 Не достигнута	0,944
Степень анаплазии G G1-2 G3-4	79,3 $\pm$ 43,6 Не достигнута	0,478
Сторона поражения почек Одна Две	79,3 $\pm$ 0,0 7,3 $\pm$ 0,0	0,687
Категория pT pT1-T2 pT3-T4	100,9 $\pm$ 0,0 79,3 $\pm$ 0,0	0,162
Опухолевая инвазия паранефрия Нет Да	Не достигнута 11,2 $\pm$ 25,9	0,138
Опухолевый венозный тромбоз Нет Да	79,3 $\pm$ 43,4 Не достигнута	0,087
Категория pN pN0 pN+	79,3 $\pm$ 3,3 Не достигнута	0,824
Категория M M0 M1	Не достигнута 79,3 $\pm$ 44,1	0,891
Метастазы Солитарные Множественные	79,3 $\pm$ 48,7 19,5 $\pm$ 0,0	0,502

В однофакторном анализе отмечена тенденция к снижению БПВ после циторедуктивной операции у больных раком почки G3-4 ( $p=0,073$ ). Значимых факторов риска БПВ не выделено (Таблица 8).

**Таблица 8** – Клинико-морфологические факторы риска беспрогрессивной выживаемости 25 нерадикально оперированных больных раком почки

Клинико-морфологический фактор	Медиана $\pm$ $\sigma$ , месяцы	P
Вариант почечно-клеточного рака Светлоклеточный Несветлоклеточный	14,6 $\pm$ 0,0 7,4 $\pm$ 0,0	0,977
Степень анаплазии G G1-2 G3-4	14,6 $\pm$ 5,2 6,3 $\pm$ 0,7	0,073
Сторона поражения почек Одна Две	7,4 $\pm$ 1,5 20,6 $\pm$ 0,0	0,418
Категория pT pT1-T2 pT3-T4	3,1 $\pm$ 0,0 7,4 $\pm$ 1,7	0,878
Опухолевая инвазия паранефрия Нет Да	14,6 $\pm$ 5,8 6,2 $\pm$ 0,6	0,310
Опухолевый венозный тромбоз Нет Да	3,1 $\pm$ 0,0 7,4 $\pm$ 1,8	0,878
Категория pN pN0 pN+	7,4 $\pm$ 1,3 10,5 $\pm$ 5,8	0,935
Метастазы Солитарные Множественные	16,7 $\pm$ 11,1 7,4 $\pm$ 1,1	0,661

Не выявлено значимой ценности уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках для предсказания рецидива рака почки после радикального хирургического лечения (Таблица 9) ( $p>0,05$  для всех).

**Таблица 9** – Ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках для предсказания рецидива рака почки после радикального хирургического лечения

Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стд. Ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
VEGFA	0,495	0,094	0,956	0,310	0,680
FGF2	0,597	0,091	0,298	0,419	0,775
VEGFR-1	0,540	0,093	0,672	0,358	0,721
VEGFR-2	0,555	0,094	0,556	0,370	0,740
PDGFRa	0,513	0,096	0,891	0,325	0,701
PDGFRb	0,526	0,094	0,784	0,342	0,709
FGFR-1	0,432	0,091	0,468	0,254	0,611
FGFR-2	0,518	0,094	0,848	0,334	0,702

Отмечена тенденция к значимому влиянию на риск прогрессирования рака почки после циторедуктивной нефрэктомии уровня экспрессии VEGFR ( $p=0,0821$ ) (Таблица 10). Значимой прогностической ценности уровней экспрессии других ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках не выявлено ( $p>0,05$  для всех).

**Таблица 10** – Ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках для предсказания прогрессирования рака почки после циторедуктивной нефрэктомии

Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стд. Ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
VEGFA	0,294	0,115	0,081	0,069	0,520
FGF2	0,417	0,116	0,480	0,189	0,645
VEGFR-1	0,406	0,103	0,423	0,203	0,608
VEGFR-2	0,469	0,109	0,795	0,257	0,682
PDGFRa	0,508	0,117	0,944	0,279	0,738



PDGFRb	0,394	0,114	0,370	0,172	0,617
FGFR-1	0,389	0,120	0,346	0,154	0,624
FGFR-2	0,486	0,108	0,906	0,275	0,697

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±1,2 vs. 48,8±0,0 месяца соответственно, p=0,054).

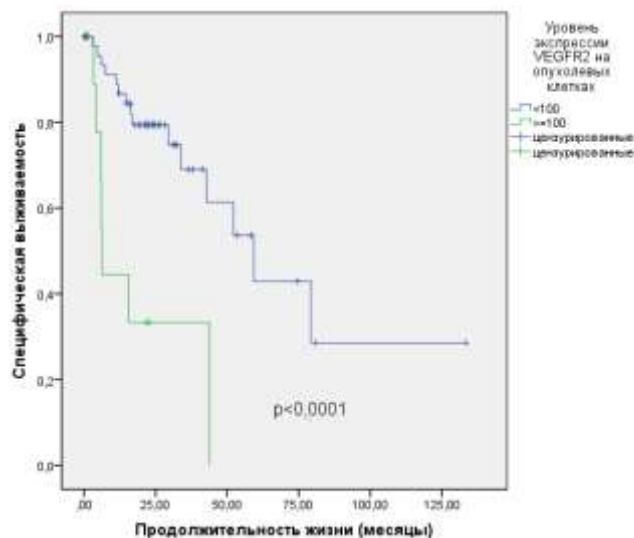
Выявлена тенденция к значимому влиянию на риск смерти от рака почки у оперированных больных уровней экспрессии VEGFR-2 (p=0,089) и FGFR-2 (p=0,092) в клетках первичной опухоли (Таблица 11). Значимой прогностической ценности уровней экспрессии ростовых факторов и других рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках не выявлено (p>0,05 для всех).

**Таблица 11** – Ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ на опухолевых клетках для предсказания смерти от рака почки после нефрэктомии.

Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стд. ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
VEGFA	0,458	0,072	0,579	0,316	0,599
FGF2	0,568	0,078	0,371	0,416	0,721
VEGFR-1	0,619	0,078	0,117	0,466	0,773
VEGFR-2	0,629	0,081	0,089	0,471	0,788
PDGFRa	0,597	0,076	0,202	0,449	0,745
PDGFRb	0,616	0,078	0,129	0,464	0,768
FGFR-1	0,406	0,071	0,220	0,267	0,546
FGFR-2	0,628	0,076	0,092	0,479	0,778

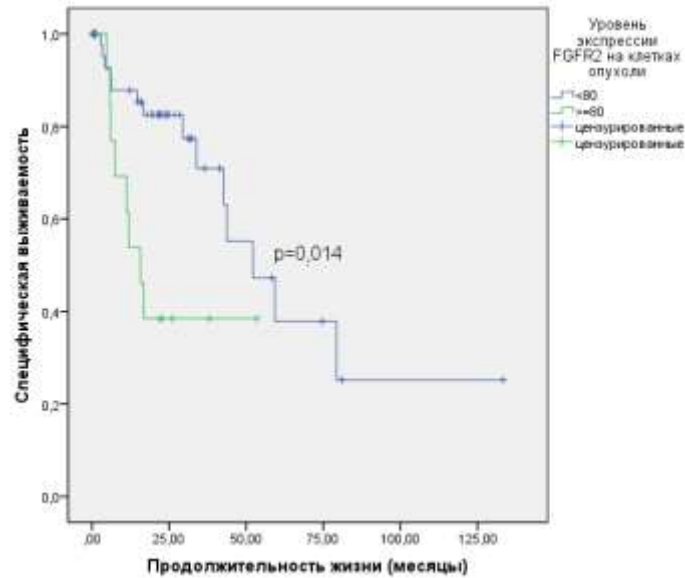
Выделено пограничное значение VEGFR-2, равное 100 HS. В однофакторном анализе выявлено достоверное снижение медианы СВ с 59,3±12,1 до 6,2±0,3 месяца

у больных с гиперэкспрессией VEGFR-2  $\geq 100$  HS по сравнению с пациентами, имевшими более низкую экспрессию данного маркера ( $p < 0,0001$ ) (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Специфическая выживаемость больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ после нефрэктомии в зависимости от уровня экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли

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  $\geq 80$  HS по сравнению с пациентами, имевшими более низкую экспрессию данного маркера ( $p = 0,014$ ) (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Специфическая выживаемость больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ после нефрэктомии в зависимости от уровня экспрессии FGFR-2

Проведен регрессионный анализ СВ, в который включены выделенные в однофакторном анализе факторы риска. Из анализа исключены категория pT в качестве фактора, определяющегося наличием опухолевого тромба, а также множественные метастазы в качестве фактора, определяющего нерадикальность хирургического лечения. 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);  $p=0,081$ ).

## 2.4 Дискуссия

Наиболее распространенным гистологическим вариантом рака почки является светлоклеточный ПКР, для которого характерна высокая частота инактивации гена VHL, приводящей к повышению продукции HIF и активации нижележащих сигнальных путей, включая VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR [15].

Планируя исследование сигнальных путей, вовлеченных в процессы митогенеза, ангио- и лимфангиогенеза при ПКР, мы приняли решение изучить

экспрессию ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ, непосредственно регулируемых HIF (то есть находящихся на одном уровне передачи сигнала), и, возможно, взаимосвязанных друг с другом. При этом были отобраны молекулы с наибольшей доказанной проангиогенной и пролиферативной активностью: VEGFA, FGF2, VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ; FGFR-1, -2.

Исследование производили на проспективно набравшемся операционном материале больных ПКР. В качестве метода оценки экспрессии было выбрано иммуногистохимическое исследование с полуколичественной оценкой продукции белка опухолевыми клетками, учитывающей как количество окрашенных клеток, так и степень окрашивания (HS). Данная методика является хорошо воспроизводимой, неплохо зарекомендовала себя в ранних работах [32] и в настоящее время широко используется другими исследователями [85, 86].

Ожидаемо, на поверхности и цитоплазме клеток первичной опухоли больных раком почки pT1a-T4N0/+M0/+ мы обнаружили экспрессию ростовых факторов VEGFA и FGF2, а также рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR $\beta$ , PDGFR $\alpha$ , FGFR-1 и FGFR-2. Частота и интенсивность продукции ростовых факторов была сопоставима. Клетки ПКР наиболее активно продуцировали ТКР VEGFR-1 и FGFR-2, продемонстрировали средний уровень экспрессии VEGFR-2, PDGFR $\alpha$ ; с наименьшей интенсивностью экспрессировались PDGFR $\beta$  и FGFR-1.

Частота экспрессии VEGFA составила 55,4% при среднем уровне экспрессии 32,4 HS, его рецептор первого типа продуцировался в 75,4% опухолей (97,2 HS), второго типа – несколько реже, в 55,4% препаратов (39,2 HS). Lkhagvadorj S. et al. (2014) выполнили иммуногистохимическое исследование экспрессии VEGFR-1 в 126 образцах ткани светлоклеточного ПКР, фиксированных в парафине. Экспрессия VEGFR-1 была обнаружена в 59 (46,8%) препаратах [83]. К сожалению, непосредственно сопоставить остальные данные с результатами других исследователей затруднительно, прежде всего, - в связи с применением различных антител и методик оценки уровня экспрессии (количественный,

полуколичественный, качественный) в работах разных авторов, а также использованием опухолевого материала с сильно варьирующей длительностью хранения. Так, Jacobsen J. указывает, что окрашивание VEGF в цитоплазме клеток ПКР не изменяется при хранении образцов опухоли в парафине в течение 2-20 лет, а мембранная экспрессия снижается, возможно, за счет различного распределения, связывающей способности и дегенерации изоформ VEGF [68]. Подготовка ткани опухоли к исследованию также может изменить структуру белка [95].

Мы отметили достоверную корреляцию гиперэкспрессии VEGF с некоторыми характеристиками опухолевого процесса, продемонстрировавшими неблагоприятное влияние на прогноз больных ПКР в больших сериях наблюдений [117], включая опухолевую инвазию паранефрия и метастазирование в надпочечник ( $p < 0,05$  для всех). Некоторыми авторами также отмечена взаимосвязь продукции VEGF опухолевыми клетками с рядом характеристик, ассоциированных с агрессивным течением ПКР. Так, Minardi D. et al. (2013, 2015) выявили корреляцию VEGF со стадией ПКР, степенью дифференцировки опухоли G3–4 и группой прогноза MSKCC [85, 86]. Tsuchiya N. (2001), напротив, не удалось обнаружить взаимосвязи экспрессии VEGF и клинико-морфологических характеристик 23 образцов ПКР [125].

Нам не удалось доказать влияние уровня экспрессии VEGF на выживаемость больных ПКР, так же, как и некоторым другим исследовательским группам [125; 85]. Однако мы отметили тенденцию к достоверному снижению БПВ пациентов с гипоэкспрессией  $VEGFA < 80$  HS по сравнению с  $VEGFA \geq 80$  HS (медиана  $6,7 \pm 1,2$  vs.  $48,8 \pm 0,0$  месяца соответственно,  $p = 0,054$ ). Исследовав 84 препарата светлоклеточного ПКР, Jacobsen J. et al. (2004) также продемонстрировал снижение медианы ОБ у пациентов с уровнем VEGF ниже медианы [95]. В крупной серии наблюдений Minardi D. (2015), напротив, медиана ОБ оказалась значимо выше при низкой экспрессии VEGF по сравнению с гиперэкспрессией данного маркера ( $p < 0,001$ ) [86].

Помимо недостаточного количества наблюдений, возможным объяснением обратной корреляции уровня VEGF и БПВ в нашей серии наблюдений может являться эффект «обкрадывания», когда опухоли с высокой экспрессией VEGFR связывают VEGF до того, как он может секретироваться для стимуляции неоваскуляризации. Косвенным подтверждением этому факту мы считаем отсутствие значимой корреляции уровня VEGF и VEGFR-1, -2. Надо отметить, что к сходным выводам пришли Kluger H. et al. (2008) [74].

Мы выявили сильную прямую корреляцию экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2 с высокой степенью анаплазии опухоли G3-4 и значительной распространенностью опухолевого процесса: категорией pT3-4, опухолевой инвазией паранефрия (только VEGFR-1), опухолевой венозной инвазией, развитием множественных метастазов (только VEGFR-2), метастазированием в надпочечники (только VEGFR-2) и печень (только VEGFR-1) ( $p < 0,05$  для всех). Необходимо отметить, что данные о прогностической значимости рецепторов VEGF, полученные разными авторами, существенно различаются. Lkhagvadorj S. et al. (2014) отметил, что более высокая экспрессия VEGFR-1 прямо коррелировала с низкой степенью анаплазии опухоли по Фурману и отсутствием инвазии тканей почечного синуса в 126 образцах ткани светлоклеточного ПКР [83]. В исследовании Jacobsen J. et al. (2004), включавшем данные 84 пациентов, была отмечена более высокая экспрессия VEGFR-2 при ранних стадиях ПКР [95]. Eronat O. et al. (2018) не обнаружили корреляции VEGFR-2 с размером, гистологическим вариантом и степенью анаплазии опухоли по Фурману, категорией pT, наличием регионарных и отдаленных метастазов у 48 больных ПКР [37]. Напротив, Kluger H. et al. (2008), изучив 334 образца ПКР, отметили, что экспрессия VEGFR прямо коррелирует со степенью анаплазии опухоли [74].

По нашим данным, в однофакторном анализе гиперэкспрессия VEGFR-2  $\geq 100$  NS ( $p < 0,0001$ ) являлась фактором риска СВ. Надо отметить, что другими признаками, показавшими негативное влияние на СВ, являлись общепризнанные факторы риска, включая степень анаплазии G 3-4, одностороннее поражение почек,

категория pT3-T4, опухолевый венозный тромбоз, множественные метастазы и нерадикальная операция. Тем не менее, в регрессионном анализе гиперэкспрессия VEGFR-2 имела тенденцию к независимому негативному влиянию на СВ (HR 2,4 (95%CI: 0,9-6,5); p=0,081) наряду со степенью анаплазии G3-4 и опухолевым венозным тромбозом. Lkhagvadorj S. et al. (2014) отметил, что более высокая экспрессия VEGFR-1 не влияла на ОБ 126 больных ПКП [83]. Напротив, в серии из 334 образцов Kluger H. (2008) высокая экспрессия VEGF и VEGFR в опухолевых клетках являлась независимым фактором риска ОБ [74].

Мы выявили окрашивание FGF2 в 60,0% образцов ПКП (44,2 HS) и отметили большую частоту и интенсивность экспрессии FGFR-2 (66,2%; 46,6 HS) по сравнению с FGFR-1 (32,3%; 7,5 HS). Horstmann M. et al. (2005) зарегистрировали окрашивание FGF2 в  $\geq 5\%$  клеток ПКП (n 259) в 37,7% препаратов из краевой 28,2% - из центральной зоны опухоли [61]. Tsimafeyev I. et al. (2011) отметили выраженную гиперэкспрессию FGFR-1 в клетках ПКП (n 100). Экспрессия FGFR-1 отмечена в 98% образцов первичных опухолей, окрашивание FGFR-2 регистрировалось гораздо реже, в 4% случаев [124]. В небольшой (n 36) серии Iacovelli R. et al. (2018) экспрессия FGFR-1 и FGFR-2 оказалась неожиданно низкой: окрашивание  $\geq 5\%$  опухолевых клеток имело место только в 16% и 30% случаев соответственно [64]. Сопоставить результаты разных исследований в связи с разными методами оценки уровней экспрессии не представляется возможным, однако очевидно, что клеткам ПКП свойственно высокое содержание FGF/FGFR.

Влияние FGF/FGFR на прогноз больных раком почки практически не изучено, однако складывается впечатление о негативном влиянии активации этой сигнальной оси на выживаемость. В нашей серии наблюдений гиперэкспрессия FGFR-2  $\geq 80$  HS оказывала неблагоприятное влияние на СВ (p=0,014), однако в регрессионном анализе прогностическая значимость данного маркера утрачивалась. В нескольких исследованиях отмечено негативное влияние повышенной экспрессии FGF/FGFR на прогноз больных ПКП. В работе Horstmann M. (2005) гиперэкспрессия FGF2 в крае

роста опухоли являлась независимым фактором риска ОВ наряду со степенью анаплазии G и категорией N+ [61]. Iacovelli R. (2018) отметил корреляцию низкой экспрессии FGFR-2 с увеличением БПВ на фоне таргетной антиангиогенной терапии [64]. Но Т. et al. (2015) отметили достоверное снижение БПВ больных диссеминированным ПКР, получавших третью линию терапии сорафенибом (n 40), имевших гиперэкспрессию FGFR-1 и FGFR-2 [57].

Мы обнаружили экспрессию PDGFR $\alpha$  в 58,5% и PDGFR $\beta$  - в 44,6% опухолей. В опубликованных работах, посвященных данному вопросу, получены сходные результаты. Sulzbacher I. et al. (2003) провели иммуногистохимическое исследование хирургических образцов ткани ПКР 112 пациентов и выявили экспрессию PDGFR- $\alpha$  в 87,5% случаев. В серии из 1423 препаратов ткани ПКР, изученных Song S. et al. (2014), цитоплазматическая гиперэкспрессия PDGFR- $\beta$  была выявлена в 32,8% образцов светлоклеточных опухолей [118]. Cumpănas A. et al. (2016) обнаружили экспрессию PDGFR $\beta$  в трети из 50 препаратов ПКР, при этом уровень экспрессии был низким во всех окрашенных образцах ткани [28].

Мы выявили достоверную корреляцию гиперэкспрессии PDGFR $\alpha$  и PDGFR $\beta$  с высокой степенью анаплазии опухоли G3-4 и значительной распространенностью опухолевого процесса: протяженностью опухолевого тромбоза (только PDGFR  $\beta$ ), категориями pN+ (только PDGFR $\alpha$ ) и M+ (только PDGFR $\beta$ ), в том числе – метастазами в надпочечники (PDGFR $\beta$ ). Аналогичные результаты получил Sulzbacher I. et al. (2003), в работе которого гиперэкспрессия PDGFR- $\alpha$  (окрашивание >38,8% из 500 клеток) коррелировала со степенью анаплазии опухоли G3-4 [121]. В другой работе, включившей образцы ткани 314 больных ПКР, авторы выявили, что периваскулярная гиперэкспрессия PDGFR- $\beta$  прямо коррелирует с высокой стадией и G3-4 степенью анаплазии опухоли [44]. Напротив, Tawfik O. et al. (2007), изучавший операционные препараты 62 радикально оперированных больных ПКР, показал, что экспрессия PDGFR- $\alpha$  не коррелирует с характеристиками опухоли [123].



Мы не выявили влияния экспрессии PDGFR на выживаемость наших пациентов. Ранее в работе Tawfik O. et al. (2007), направленной на определение прогностической значимости ряда молекулярных маркеров при ПКР, экспрессия PDGFR- $\alpha$  являлась независимым фактором риска ОБ наряду с костными метастазами [123]. Frödin M. (2017), изучивший образцы ткани 314 больных ПКР, выявил, что гиперэкспрессия PDGFR- $\beta$  ассоциирована с достоверным снижением ОБ [44]. По данным Sulzbacher I. et al. (2003), в однофакторном анализе гиперэкспрессия PDGFR- $\alpha$  оказалась ассоциирована со снижением БРВ 112 больных ПКР, но теряла свою значимость в многофакторном анализе [121]. Гиперэкспрессия PDGFR- $\alpha$  являлась независимым фактором риска БПВ в исследовании Kusuda Y. (2013) [Kusuda].

На наш взгляд, наиболее интересным результатом, полученным в нашем исследовании, является обнаружение сильной перекрестной взаимосвязи между экспрессией звеньев разных цепей передачи сигнала. Мы отметили выраженную прямую корреляцию уровней продукции VEGFA и FGF2. Кроме того, мы продемонстрировали взаимосвязь экспрессии ростового фактора VEGFA с рецепторами FGFR и ростового фактора FGF2 с рецепторами VEGFR и PDGFR. Уровни экспрессии рецепторных тирозинкиназ VEGFR/FGFR/PDGFR также сильно коррелировали между собой, при этом наблюдалась практически полная перекрестная взаимосвязь между всеми цепями передачи сигнала.

Возможными выводами из полученных результатов могут быть следующие. Во-первых, взаимосвязь между экспрессией ангиогенных ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ может свидетельствовать об их координированном вкладе в сложный и многоэтапный процесс прогрессирования ПКР. Эта гипотеза подтверждается данными предшествующих исследований. Так, показано, FGF/FGFR приводит к пролиферации опухолевых клеток, деградации межклеточного матрикса и высвобождению ростовых факторов, а также способствует размножению и миграции клеток эндотелия; VEGF/VEGFR играет важную роль в неоангиогенезе и

ангиоинвазии на уровне эндотелиальных клеток; PDGF/ PDGFR обеспечивает стимуляцию раковых клеток, контроль опухолевого интерстициального давления и привлекает перициты к формирующимся сосудам [53 20 126].

Во-вторых, коэкспрессия ростовых факторов и неспецифичных для них РТК, возможно, является подтверждением проангиогенного кроссигналинга при раке почки. В 2007 году Ball S. et al. показали, что VEGFA стимулирует экспрессию PDGFR $\alpha$  и - $\beta$  и, кроме того, связывается с обоими типами рецепторов, что делает VEGFA потенциальным регулятором для привлечения как эндотелиальных, так и периваскулярных клеток [14]. В клеточных линиях доказана перекрестная связь между передачей проангиогенных сигналов FGF и VEGF [20]. На экспериментальной модели глиомы было продемонстрировано, что PDGF усиливает ангиогенез, стимулируя экспрессию VEGF в опухоль-специфических эндотелиальных клетках и привлекая перициты [52].

В-третьих, вероятно, только индивидуально сбалансированное сочетание активации HIF-зависимых сигнальных путей способно поддерживать жизнедеятельность опухоли, и именно поэтому ни одно исследование не смогло выделить дискретных молекул-предикторов прогноза течения заболевания и продолжительности жизни у больных ПКР.

Интересно, что в нашей серии наблюдений экспрессия VEGFA не коррелировала с VEGFR, а продукция FGF2 не была взаимосвязана с FGFR-1. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено своеобразным «обкрадыванием», когда чрезмерное количество рецепторных тирозинкиназ специфично и быстро связывает ростовые факторы до окрашивания.

## 2.5 Заключение

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 рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1 (97,2 HS),

VEGFR-2 (39,2 HS), PDGFR $\beta$  (26,6 HS), PDGFR $\alpha$  (62,9 HS), FGFR-1 (7,5 HS) и FGFR-2 (46,6 HS). Экспрессия всех изученных ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ прямо взаимосвязана друг с другом. Отмечена достоверная корреляция гиперэкспрессии изучаемых маркеров с высокой степенью анаплазии опухоли G3-4 (FGF2, VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ ) 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  $\beta$ ), опухолевой инвазией венозной стенки (FGFR-2), категориями pN+ (PDGFR $\alpha$ ) и M+ (PDGFR $\beta$ ), развитием множественных метастазов (VEGFR2), метастазированием в надпочечники (VEGF, VEGFR-2, PDGFR $\beta$  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 $\geq 100$  HS ( $p < 0,0001$ ) и FGFR-2 $\geq 80$  HS ( $p = 0,014$ ). В регрессионном анализе гиперэкспрессия VEGFR-2 (HR 2,4 (95% CI: 0,9-6,5);  $p = 0,081$ ) имела тенденцию к независимому влиянию на специфическую выживаемость 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);  $p = 0,082$ ).

## **ГЛАВА 3. ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И ОПУХОЛЕВОГО ТРОМБА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ**

### **3.1 Актуальность проблемы**

Специфической особенностью ПКР является способность к инвазии в венозную систему почки и распространению опухоли в крупные вены с формированием опухолевого венозного тромбоза почечной (ПВ), нижней полой (НПВ) вен и правых камер сердца. По данным разных авторов, частота венозной инвазии достигает 4-10%, при этом от 2% до 16% опухолевых тромбов достигает правого предсердия [81; 128]. Светлоклеточный вариант почечно-клеточного рака ассоциирован с наиболее высоким риском опухолевой венозной инвазии, реже всего тромбозы наблюдаются при хромофобном и папиллярном раке почки [100]. Опухолевые тромбы чаще всего являются флотирующими и фиксированы к стенке НПВ только в области устья ПВ [3; 73]. Однако у 23% пациентов имеется истинное врастание опухоли в стенку НПВ [100]. Несмотря на огромное количество исследований, посвященных всему спектру вопросов диагностики и лечения рака почки с опухолевым венозным тромбозом, в доступной нам литературе мы не обнаружили работ, посвященных экспрессии HIF-зависимых проангиогенных факторов в клетках опухолевого тромба.

Целью данного раздела нашего исследования являлось изучение экспрессии и прогностической значимости ростовых факторов VEGFA и FGF2 и рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ; FGFR-1, -2 в клетках парных образцов первичной опухоли и опухолевого тромба у больных ПКР.

### **3.2 Материал и методы**

#### **3.2.1 Характеристика больных раком почки**

В исследование включено 25 больных раком почки pT3a-T4N0-1M0-1, осложненным опухолевым венозным тромбозом, подвергнутых нефрэктомии,

тромбэктомии. Медиана возраста пациентов составила 62,0 (35-74) года, соотношение мужчин и женщин равнялось 2,6:1. У 24 (96,0%) пациентов имело место одностороннее, у 1 (4,0%) – двухстороннее опухолевое поражение почек. Медиана диаметра опухоли, распространявшейся в венозный просвет, составила 12,0 (4,5-26,0) см. У всех пациентов имелся опухолевый венозный тромбоз (поддиафрагмальный – 18 (72,0%), наддиафрагмальный – 7 (28,0%)). Отдаленные метастазы на момент хирургического вмешательства были диагностированы у 15 (60,0%) пациентов. Солитарные метастазы имели место в 3 (12,0%) наблюдениях, метастатическое поражение одного органа выявлено в 12 (48,0%) случаях. У большинства больных метастазы локализовались в легких (12 (48,0%)); у 3 (12,0%) пациентов имелись метастазы в надпочечнике, у 2 (8,0%) – в костях и у 2 (8,0%) – в печени.

Всем пациентам выполнена нефрэктомия, тромбэктомия, расширенная забрюшинная лимфодиссекция. Удаление отдаленных метастазов произведено в 5 случаях (адреналэктомия – 3 (12,0%), резекция печени – 1 (4,0%), резекция легкого – 1 (4,0%)). Удаление всех определяемых опухолевых очагов удалось осуществить в 12 (48,0%) наблюдениях, 13 (52,0%) операций носили циторедуктивный характер.

Гистологическое исследование выявило светлоклеточный вариант почечно-клеточного рака во всех удаленных образцах. Степень анаплазии опухоли G2 верифицирована в 7 (28,0%), G3 – в 13 (52,0%), G4 – в 25 (20,0%) препаратов. Вростание опухоли в паранефрий выявлено в 14 (56,0%), истинная инвазия тромба в венозную стенку – в 2 (8,0%) операционных образцах. Опухолевый тромб и удаленные метастазы имели строение, аналогичное первичной опухоли во всех случаях. Категория pT расценена как pT3a у 4 (16,0%), pT3b – у 13 (52,0%), pT3c – у 7 (28,0%), pT4 – у 1 (4,0%) пациента. Метастазы в регионарные лимфоузлы верифицированы у 9 (36,0%) больных, при этом поражение более одного лимфоузла имело место в 6 (24,0%) случаях.

Из 13 пациентов, подвергнутых циторедуктивной операции, системное лекарственное лечение проводилось 10 (76,9%) (цитокиновая терапия – 2 (15,4%), антиангиогенная таргетная терапия – 8 (61,5%)). Больные, которым была выполнена радикальная нефрэктомия, тромбэктомия, забрюшинная лимфодиссекция, находились под динамическим наблюдением и противоопухолевой терапии не получали (Таблица 12).

**Таблица 12** – Характеристика и лечение 25 больных раком почки с опухолевым венозным тромбозом.

Характеристика	Пациенты (n 25)	
	Количество	%
Возраст, медиана $\pm$ $\sigma$ (min-max), годы	62,0 $\pm$ 2,1 (35-74)	
Пол		
Мужской	18	72,0
Женский	7	28,0
Сторона поражения почки		
Правая	16	64,0
Левая	8	32,0
Обе	1	4,0
Размер опухоли почки, медиана (min-max)	12,0 $\pm$ 4,5 (4,5-26,0)	
Категория pT		
pT3a	4	16,0
pT3b	13	52,0
pT3c	7	28,0
pT4	1	4,0
Опухолевый венозный тромбоз		
Подпеченочный	15	60,0
Внутрипеченочный	3	12,0
Наддиафрагмальный	7	28,0
Категория pN1	9	36,0
Категория M1	15	60,0
Количество метастазов		
1	3	12,0
>1	12	48,0
Количество локализаций метастазов		
1	12	48,0
>1	3	12,0

Локализация метастазов		
легкие	12	48,0
кости	2	8,0
надпочечник	3	12,0
печень	2	8,0
Светлоклеточный вариант почечно-клеточного рака	25	100,0
Степень анаплазии G		
G2	7	28,0
G3	13	52,0
G4	25	20,0
Нефрэктомия		
Радикальная	12	48,0
Циторедуктивная	13	52,0
Удаление отдаленных метастазов		
Адреналэктомия	3	12,0
Резекция печени	1	4,0
Резекция легкого	1	4,0
Системная терапия после циторедуктивной операции*	10	76,9
Цитокины	2	15,4
Анти-VEGF таргетная терапия	8	61,5

\*рассчитано для 13 пациентов

### 3.2.2 Методология исследования

Особенности хирургического лечения больных ПКР с опухолевым венозным тромбозом описаны в разделе 2.2.2.1, методика иммуногистохимического исследования – в разделе 2.2.2.2, методы статистической обработки данных - в разделе 2.2.2.3.

## 3.3 Результаты

### 3.3.1 Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого венозного тромба у больных раком почки

В цитоплазме и на мембране клеток опухолевого тромба так же, как и клеток первичной опухоли у больных раком почки экспрессировались VEGFA, FGF2, а

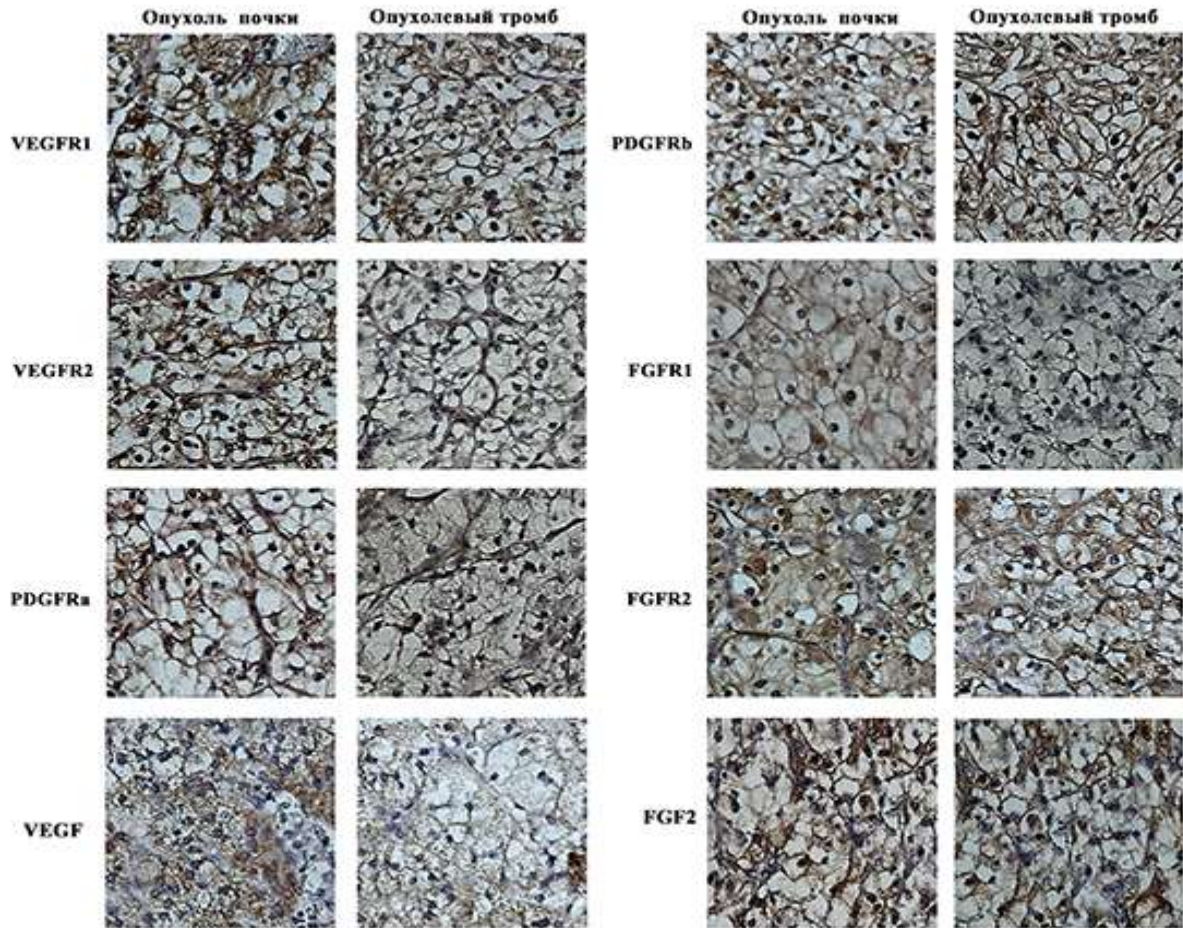
также VEGF-1, -2; PDGFR $\alpha,\beta$ ; FGFR-1, -2. Уровни экспрессии перечисленных маркеров приведены в таблице 13.

Выявлено, что клетки опухолевого тромба характеризуются тенденцией к более низкой экспрессии ростовых факторов VEGFA ( $p=0,060$ ) и FGF2 ( $p=0,046$ ), достоверно более низкой экспрессией рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR $\alpha$  ( $p<0,05$  для всех), тенденцией к более низкой экспрессии FGFR-1 ( $p=0,077$ ) и FGFR-2 ( $p=0,090$ ) по сравнению с клетками первичной опухоли почки (Таблица 13, Рисунок 4).

**Таблица 13** – Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого венозного тромба у больных раком почки

Экспрессия, средняя $\pm$ $\sigma$ , HS	Клетки опухоли почки	Клетки опухолевого тромба	Значимость 2-сторонняя
VEGFA	21,2 $\pm$ 5,0	9,2 $\pm$ 3,6	0,060
FGF2	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 $\alpha$	98,8 $\pm$ 12,9	52,4 $\pm$ 9,8	0,006
PDGFR $\beta$	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 $\pm$ 9,4	30,8 $\pm$ 8,2	0,090





**Рисунок 4** – Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого венозного тромба у больных раком почки

### **3.3.2 Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ с характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки с опухолевым венозным тромбозом**

Проведен корреляционный анализ возможной взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках опухоли и опухолевого тромба с характеристиками опухолевого процесса (размер первичной опухоли, протяженность, уровень опухолевого венозного тромба, врастание опухоли почки в паранефрий, категории pT, pN, M, степень анаплазии опухоли). Степень анаплазии G

прямо коррелировала с уровнем экспрессии VEGFR-1 ( $p=0,035$ ) и уровнем 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 внутрисосудистой опухоли. Других значимых взаимосвязей не выявлено ( $p>0,05$  для всех). В таблице 14 отражены только значимые корреляции.

**Таблица 14** – Корреляция степени анаплазии G, инвазии опухолевого тромба в венозную стенку и экспрессии рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба

Уровень экспрессии	Корреляция Пирсона, 2-сторонняя значимость, p	Степень анаплазии G	Врастание тромба в стенку вены
VEGFR-1 в клетках первичной опухоли	Корреляция Пирсона	0,423*	0,200
	Знч.(2-сторон)	0,035	0,337
	N	25	25
FGFR-1 в клетках первичной опухоли	Корреляция Пирсона	0,455*	-0,109
	Знч.(2-сторон)	0,022	0,604
	N	25	25
VEGFR-1 в клетках опухолевого тромба	Корреляция Пирсона	0,306	0,454*
	Знч.(2-сторон)	0,137	0,023
	N	25	25
FGFR-2 в клетках опухолевого тромба	Корреляция Пирсона	0,123	0,544**
	Знч.(2-сторон)	0,557	0,005
	N	25	25

\*\* . Корреляция значима на уровне 0.01 (2-сторон.). \* . Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторон.).

### **3.3.3. Влияние уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба на прогноз больных раком почки**

Медиана наблюдения за всеми 25 больными составила  $16,4 \pm 3,4$  (0,3-74,5) месяца.

Рецидивы развились у 5 (41,7%) из 12 радикально оперированных больных, в среднем, через 6 (1-11) месяцев после хирургического вмешательства. Во всех случаях отмечено появление отдаленных метастазов, что послужило показанием к назначению системной антиангиогенной терапии (в сочетании с нерадикальной онкоортопедической операцией - у одного пациента с метастазами в кости).

Четырнадцать (56,0%) из 25 больных живы (7 (28,0%) – без признаков болезни, 7 (28,0%) – с метастазами), 11 (44,0%) пациентов умерли от прогрессирования рака почки.

Медиана ОВ всех пациентов составила  $43,7 \pm 23,1$  (95% CI, 0,1-89,1) месяца (1-летняя – 57,9%), СВ -  $43,7 \pm 23,1$  (95% CI, 0,1-89,1) месяца (1-летняя – 57,9%), медиана БРВ радикально оперированных пациентов –  $11,2 \pm 2,8$  (95% CI, 5,7-16,7) месяца (1-летняя – 39,3%). Медиана БПВ нерадикально оперированных больных на фоне первой линии терапии равнялась 10,3 (95% CI, 5,5-15,3) месяца (1-летняя – 27,3%).

Несмотря на ухудшение показателей ОВ у пациентов с общепризнанными факторами риска, в однофакторном анализе разница результатов между подгруппами пациентов в небольшой когорте исследования не достигла статистической значимости. Отмечено недостоверное снижение ОВ больных с высокой категорией pT (медиана для пациентов с категорией pT3 - 43,7 месяца, pT4 - 5,8 месяца,  $p=0,098$ ), категорией pN+ (медиана для пациентов с категорией pN0 – 43,7 месяца, pN+ - 15,7 месяца,  $p=0,899$ ) и категорией M+ (медиана для пациентов с категорией M0 не достигнута, M+ – 15,7 месяца,  $p=0,302$ ). Степень анаплазии G4

имела строгую тенденцию к негативному влиянию на ОВ (медиана для пациентов с опухолями G2-3 – 43,7 месяца, G4 – 4,7 месяца,  $p=0,054$ ). Медиана ОВ радикально оперированных больных была недостоверно выше, чем у пациентов, подвергнутых циторедуктивным операциям (не достигнута vs. 15,7 месяца,  $p=0,288$ ). В связи с отсутствием смертей, не обусловленных прогрессированием рака почки, отдельный анализ факторов риска СВ не проводился. В однофакторном анализе не выявлено факторов риска БРВ радикально оперированных пациентов. В однофакторном анализе не выявлено факторов риска БПВ нерадикально оперированных пациентов.

Определена ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках опухоли почки и опухолевого тромба в прогнозировании развития рецидивов рака почки после радикального хирургического лечения, прогрессирования опухолевого процесса после циторедуктивных операций и смерти от прогрессирования рака почки.

Ни один из изученных маркеров не являлся предиктором рецидива рака почки после радикальной нефрэктомии, тромбэктомии (Таблица 15).

Отмечена тенденция к достоверному влиянию уровня экспрессии VEGFR-1 в клетках первичной опухоли ( $p=0,064$ ) на развитие прогрессирования после циторедуктивной нефрэктомии, тромбэктомии (Таблица 16). В группе исследования уровень экспрессии VEGFA в клетках опухолевого тромба имел значимую ценность в качестве предиктора прогрессирования у оперированных больных с метастазами ( $p=0,019$ ). В связи с малым числом наблюдений в подгруппе выделить пограничные значения данных маркеров не удалось.

**Таблица 15** – Ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба для прогнозирования рецидива рака почки после радикального хирургического лечения

Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
Уровень экспрессии в клетках первичной опухоли					
VEGFA	0,405	0,184	0,649	0,045	0,765
FGF2	0,452	0,181	0,820	0,097	0,808
VEGFR-1	0,667	0,272	0,425	0,133	1,000
VEGFR-2	0,762	0,208	0,210	0,355	1,000
PDGFR $\alpha$	0,524	0,229	0,909	0,074	0,973
PDGFR $\beta$	0,405	0,237	0,649	0,000	0,869
FGFR-1	0,357	0,183	0,494	0,000	0,716
FGFR-2	0,357	0,228	0,494	0,000	0,804
Уровень экспрессии в клетках опухолевого тромба					
VEGFA	0,214	0,147	0,171	0,000	0,502
FGF2	0,619	0,212	0,569	0,204	1,000
VEGFR-1	0,476	0,189	0,909	0,105	0,847
VEGFR-2	0,429	0,187	0,732	0,062	0,795
PDGFR $\alpha$	0,333	0,232	0,425	0,000	0,787
PDGFR $\beta$	0,143	0,122	0,087	0,000	0,382
FGFR-1	0,500	0,209	10,000	0,091	0,909
FGFR-2	0,262	0,165	0,254	0,000	0,586

**Таблица 16** – Ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба для прогнозирования прогрессирования рака почки после циторедуктивного хирургического лечения

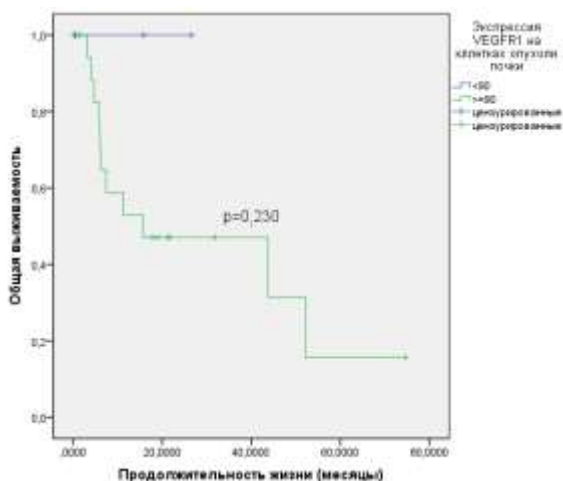
Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
Уровень экспрессии в клетках опухоли почки					
VEGFA	0,293	0,148	0,157	0,003	0,583
FGF2	0,586	0,152	0,558	0,289	0,883
VEGFR-1	0,771	0,115	0,064	0,546	0,997
VEGFR-2	0,729	0,123	0,118	0,488	0,969
PDGFR $\alpha$	0,693	0,151	0,188	0,396	0,989
PDGFR $\beta$	0,393	0,142	0,464	0,115	0,670
FGFR-1	0,443	0,148	0,696	0,152	0,733
FGFR-2	0,514	0,144	0,922	0,233	0,796
Уровень экспрессии в клетках опухолевого тромба					
VEGFA	0,157	0,114	0,019	0,000	0,381
FGF2	0,536	0,148	0,807	0,245	0,827
VEGFR-1	0,607	0,146	0,464	0,321	0,893
VEGFR-2	0,607	0,142	0,464	0,328	0,886
PDGFR $\alpha$	0,450	0,144	0,733	0,168	0,732
PDGFR $\beta$	0,421	0,144	0,591	0,139	0,704
FGFR-1	0,500	0,146	10,000	0,213	0,787
FGFR-2	0,514	0,146	0,922	0,229	0,799

Отмечено значимое влияние на риск смерти от прогрессирования рака почки уровней экспрессии VEGFR-1, -2 в клетках первичной опухоли, а также уровня VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба ( $p < 0,05$  для всех). Выявлена строгая тенденция к влиянию уровня экспрессии VEGFA в клетках опухолевого тромба на риск смерти от рака почки ( $p = 0,059$ ) (Таблица 17).

**Таблица 17** – Ценность уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба для прогнозирования смерти от прогрессирования рака почки после хирургического лечения

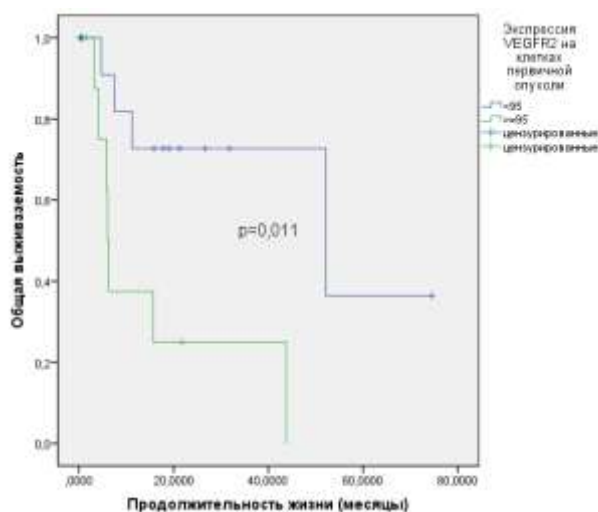
Тестовая переменная	Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
Уровень экспрессии в клетках опухоли почки					
VEGFA	0,399	0,115	0,396	0,174	0,624
FGF2	0,623	0,118	0,298	0,391	0,856
VEGFR-1	0,808	0,086	0,009	0,640	0,977
VEGFR-2	0,815	0,086	0,008	0,647	0,983
PDGFR $\alpha$	0,679	0,110	0,132	0,463	0,894
PDGFR $\beta$	0,597	0,121	0,412	0,360	0,835
FGFR-1	0,435	0,116	0,584	0,207	0,663
FGFR-2	0,682	0,117	0,125	0,453	0,911
Уровень экспрессии в клетках опухолевого тромба					
VEGFA	0,276	0,102	0,059	0,076	0,476
FGF2	0,575	0,117	0,529	0,346	0,804
VEGFR-1	0,695	0,114	0,101	0,472	0,918
VEGFR-2	0,744	0,103	0,040	0,542	0,945
PDGFR $\alpha$	0,448	0,123	0,661	0,207	0,689
PDGFR $\beta$	0,526	0,122	0,827	0,288	0,764
FGFR-1	0,500	0,119	1,000	0,268	0,732
FGFR-2	0,669	0,112	0,155	0,449	0,889

По координатам ROC-кривой выделено пограничное значение уровня экспрессии VEGFR-1 в клетках первичной опухоли. Медиана ОБ больных с экспрессией VEGFR-1 в клетках первичной опухоли  $\geq 90$  HS составила 15,6 месяца, пациентов с экспрессией  $< 90$  HS – не достигнута; разница результатов между группами статистически незначима ( $p=0,230$ ) (Рисунок 5).



**Рисунок 5** – Общая выживаемость оперированных больных раком почки в зависимости от экспрессии VEGFR-1 в клетках опухоли почки

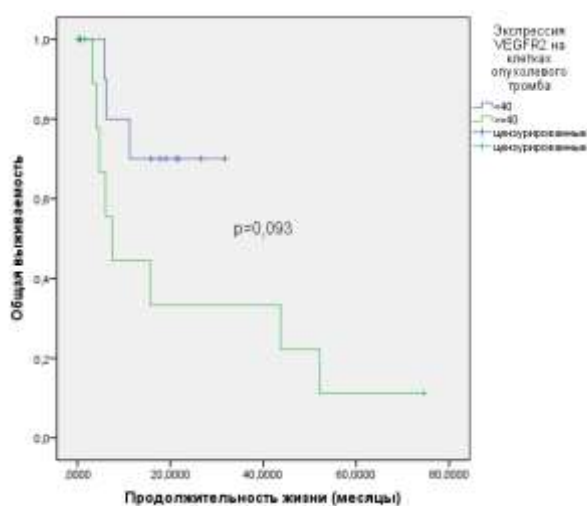
По координатам ROC-кривой выделено пограничное значение уровня экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли. Медиана ОБ больных с экспрессией VEGFR-2 в клетках первичной опухоли  $\ge 95$  HS составила 6,0 месяцев, пациентов с экспрессией  $< 95$  HS – 52,1 месяца; разница результатов между группами достоверна ( $p=0,011$ ) (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Общая выживаемость оперированных больных раком почки в зависимости от экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли

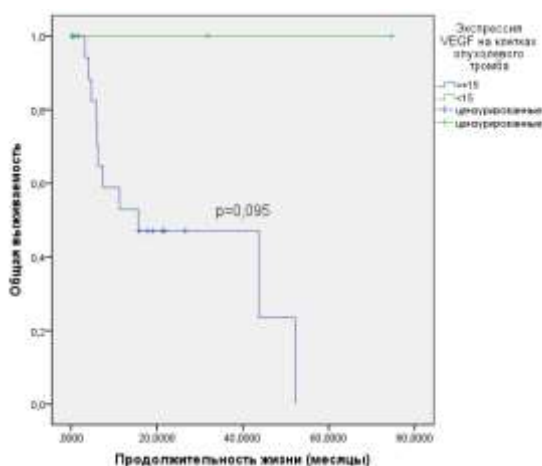


По координатам ROC-кривой выделено пограничное значение уровня экспрессии VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба. Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба  $\geq 40$  HS составила 7,4 месяца, пациентов с экспрессией  $< 40$  HS – не достигнута; имеется тенденция к значимому различию результатов между группами ( $p=0,093$ ) (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Общая выживаемость оперированных больных раком почки в зависимости от экспрессии VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба

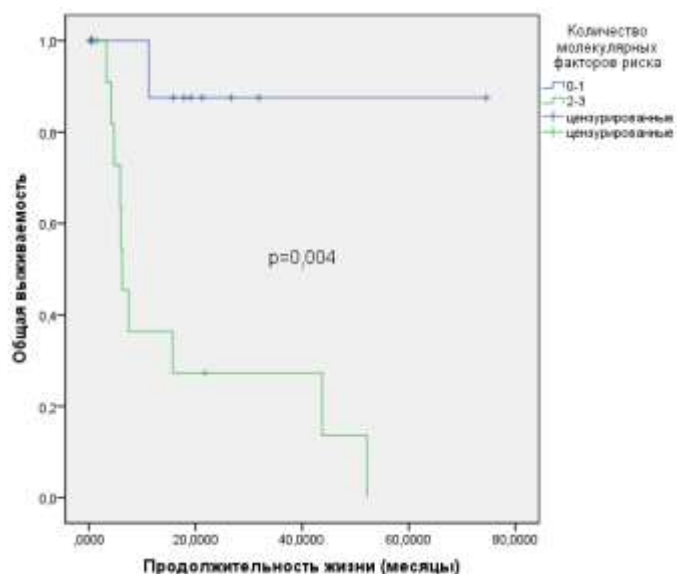
По координатам ROC-кривой выделено пограничное значение уровня экспрессии VEGFA в клетках опухолевого тромба. Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFA в клетках опухолевого тромба  $< 15$  HS составила 15,7 месяца, пациентов с экспрессией  $\geq 15$  HS – не достигнута; имеется тенденция к значимому различию результатов между группами ( $p=0,095$ ) (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Общая выживаемость оперированных больных раком почки в зависимости от экспрессии VEGFA в клетках опухолевого тромба

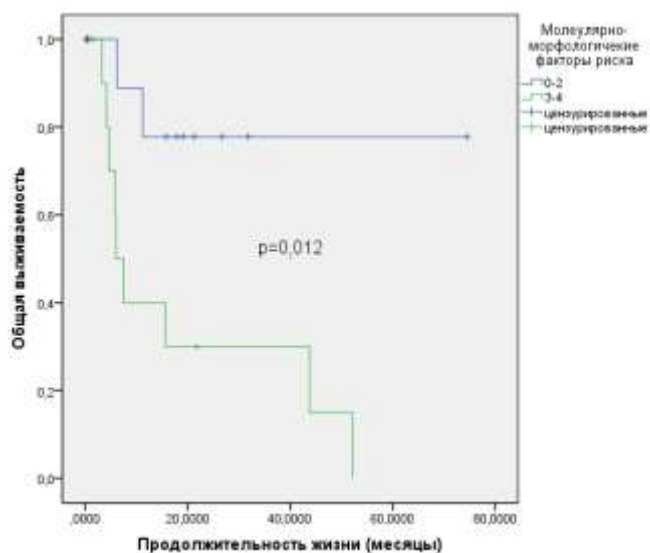
Выполнена попытка моделирования прогноза оперированных больных раком почки с опухолевым венозным тромбозом на основании полученных результатов. В связи с малой выборкой мы сочли целесообразным использование факторов, продемонстрировавших тенденцию к влиянию на ОВ.

Количество молекулярных факторов риска ОВ (экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли  $\geq 95$  HS, экспрессии VEGFR-2  $\geq 40$  HS и VEGFA  $< 15$  HS в клетках опухолевого тромба) имело влияние на ОВ: однолетняя выживаемость пациентов с 2-3 факторами риска составила 27,3% (медиана – 6,2 месяца), 0-1 фактором риска – 87,5% (медиана не достигнута) ( $p=0,004$ ) (Рисунок 9). Наличие обоих факторов повышало риск смерти от рака почки в 3,4 раза (95% CI: 1,2-9,5),  $p=0,021$ ); предсказательная точность модели – 88,3% ( $p=0,001$ ).



**Рисунок 9** – Общая выживаемость оперированных больных раком почки в зависимости от количества молекулярных факторов риска (экспрессии VEGFR-1 в клетках первичной опухоли  $\geq 95$  HS, экспрессии VEGFR-2  $\geq 40$  HS и VEGFA  $< 15$  HS в клетках опухолевого тромба)

Введение в модель единственного клиничко-морфологического фактора риска ОВ, имевшего тенденцию к негативному влиянию на выживаемость (степень анаплазии G3-4), незначительно снижало точность модели до 83,8% (p=0,004): пациенты с 0-2 факторами риска имели достоверно более высокую 1-летнюю ОВ по сравнению с больными, имевшими 3-4 фактора риска (77,8% и 30,0% соответственно; медиана не достигнута и 6,0 месяца соответственно, p=0,012) (Рисунок 10). Наличие 3-4 факторов повышало риск смерти от рака почки в 1,8 раза (95% CI: 1,1-3,1; p=0,026).



**Рисунок 10** – Общая выживаемость оперированных больных раком почки в зависимости от количества факторов риска (степени анаплазии опухоли G3-4, экспрессии VEGFR-1 в клетках первичной опухоли  $\geq 95$  HS, экспрессии VEGFR-2  $\geq 40$  HS и VEGFA  $< 15$  HS в клетках опухолевого тромба)

### 3.4 Дискуссия

Насколько мы можем судить, в нашем исследовании впервые продемонстрировано, что клетки опухолевого тромба так же, как и клетки первичной опухоли экспрессируют HIF-зависимые факторы роста и тирозинкиназных рецепторов VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGFR у больных ПКР. Однако клетки, формирующие опухолевый тромб, характеризуются меньшим уровнем экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2, а также тирозинкиназ VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , FGFR-1, -2 по сравнению с клетками первичной опухоли почки. Возможным объяснением этому факту служит значительное количество механических факторов, позволяющих распространяться опухоли по венозному просвету с большей легкостью по сравнению с ростом первичной опухоли почки, включая жидкостную плотность среды, направление тока крови, соответствующее вектору роста внутрисосудистой опухоли, отрицательное давление в НПВ,

создаваемое в фазу сердечной диастолы. Кроме того, растворимые формы VEGF и FGF, концентрация которых повышена в сыворотке крови [98; 96; 61 45; 34; 105; 116] могут акцептироваться тирозинкиназами клеток опухолевого тромба, что может снижать потребность в самостоятельной продукции ростовых факторов. Еще одним источником ростовых факторов и тирозинкиназ для опухолевого тромба является опухоль почки. Это подтверждается нашими данными, приведенными в главе 2: опухолевая венозная инвазия ассоциирована с гиперэкспрессией VEGFR-1 и -2, а протяженность опухолевого тромбоза – с гиперпродукцией PDGFR  $\beta$ .

Как было продемонстрировано в главе 2 нашего исследования, экспрессия HIF-зависимых ростовых факторов и тирозинкиназ в клетках первичной опухоли ассоциирована с прогностически неблагоприятными клинико-морфологическими признаками опухолевого процесса. Эта тенденция сохраняется и в подгруппе больных ПКР с опухолевым венозным тромбозом. Так, степень анаплазии G прямо коррелировала с уровнем экспрессии VEGFR-1 и FGFR-1 в клетках опухоли. Но особый интерес вызывает тот факт, что повышенная продукция FGFR-2 в клетках опухоли почки оказалась ассоциирована с повышением риска врастания тромба в венозную стенку. Это свойство внутрисосудистой опухоли также зависело и от характеристик клеток, формирующих тромботические массы: гиперэкспрессия VEGFR-1 и FGFR-2 в клетках тромба коррелировала с инвазией опухоли в стенку вены.

Несмотря на ухудшение показателей ОВ у пациентов с общепризнанными факторами риска, в однофакторном анализе разница результатов между подгруппами пациентов в небольшой когорте нашего исследования не достигла статистической значимости. Только степень анаплазии G4 имела строгую тенденцию к негативному влиянию на ОВ.

Тем не менее, нам удалось выявить влияние экспрессии ростовых факторов и тирозинкиназ на прогноз больных раком почки с опухолевым тромбозом. В однофакторном анализе выявлено неблагоприятное влияние на ОВ пациентов,

подвергнутых нефрэктомии, тромбэктомии, гиперэкспрессии VEGFR-2 $\geq$ 90 HS в клетках первичной опухоли, а также тенденция к снижению ОВ при гиперэкспрессии VEGFR-2  $\geq$ 40 HS и экспрессии VEGFA <15 HS в клетках опухолевого тромба.

Наибольшую прогностическую значимость имела гиперэкспрессия VEGFR-2 в клетках первичной опухоли. Интересно, что во всей популяции пациентов, включая больных, не имевших опухолевой инвазии, независимым фактором риска также являлась повышенная продукция VEGFR-2. Гиперэкспрессия VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба была ассоциирована со снижением ОВ, что перекликается с результатами одно- и многофакторного анализа выживаемости общей популяции пациентов.

Так же, как и во всей когорте больных, включенных в исследование, гипозэкспрессия VEGFA коррелировала с ухудшением прогноза. Мы полагаем, что это может быть обусловлено быстрым связыванием ростовых факторов чрезмерным количеством специфичных рецепторных тирозинкиназных. Косвенным свидетельством этой гипотезе служит наиболее выраженное ухудшение прогноза при повышенной коэкспрессии VEGFR-2 и гипозэкспрессии VEGFA. Однолетняя выживаемость пациентов с 2-3 факторами риска составила 27,3%, 0-1 фактором риска – 87,5% (p=0,004).

### 3.5 Заключение

Таким образом, клетки почечно-клеточного рака, формирующие опухолевый тромб, характеризуются меньшим уровнем экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2, а также тирозинкиназ VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , 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-2

$\geq 95$  HS в клетках первичной опухоли, а также тенденция к снижению ОВ при гиперэкспрессии VEGFR-2  $\geq 40$  HS и экспрессии VEGFA  $< 15$  HS в клетках опухолевого тромба. Однолетняя выживаемость пациентов с  $\geq 2$  факторами риска составила 27,3%,  $< 2$  факторов риска – 87,5% ( $p=0,004$ ).

## **ГЛАВА 4. ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНАЗ В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ В НАДПОЧЕЧНИКАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ**

### **4.1 Актуальность проблемы**

Диссеминация ПКР имеется у 30% пациентов на момент установки диагноза, еще у 50% больных после радикального хирургического лечения развиваются метастазы. Для рака почки характерно развитие множественных метастатических отсевов, при этом чаще всего поражаются нерегионарные лимфоузлы, легкие, кости, печень и надпочечники. Диссеминация опухолевого процесса является важнейшей составляющей прогрессирования ПКР и клинически является летальным событием туморогенеза, резко ухудшающим прогноз пациентов [2].

Для повышения эффективности поиска терапевтических мишеней и прогностических факторов при ПКР производились попытки выявления различий между первичной опухолью и метастазами. Последние исследования были сфокусированы на выделении специфических мутаций, индуцирующих распространение и рост опухолевых клеток в анатомических областях, отдаленных от первичной опухоли. Gerlinger M. (2012), сравнивший спектр генетических альтераций в 60 парных препаратах опухоли почки и метастаза ПКР, отметил наличие идентичных мутации только в 22% образцов. Автор обнаружил различные классы альтераций в генах VHL, PBRM1, SETD2 and BAP1 [46]. Однако в наибольшем к настоящему времени исследовании генома больных ПКР с помощью таргетных панелей секвенирования нового поколения было продемонстрировано, что первичные опухоли и метастазы рака почки имеют равномерное распределение геномных изменений. В непарных образцах ткани 349 первичных опухолей и 229 метастазов наиболее распространенными мутациями были альтерации VHL (66,8%), PBRM1 (41,87%) и SETD2 (24,7%). TP53 чаще мутировал в метастазах по сравнению с первичными опухолями (14,85% и 8,9% соответственно;  $p=0,031$ ), других различий



выявлено не было. В парных образцах первичных опухолей и метастазов различий частоты мутаций и мутационной нагрузки не наблюдалось [30].

Высокая частота мутаций VHL, выявленная в метастазах ПКР, подтверждает гипотезу о сохранении высокой значимости VHL/HIF-зависимых сигнальных путей при диссеминации опухолевого процесса. В доступной нам литературе мы не обнаружили исследований, направленных на оценку экспрессии HIF-зависимых белков в метастазах рака почки.

Целью данного раздела нашего исследования являлось изучение экспрессии и прогностической значимости ростовых факторов VEGFA и FGF2 и рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2, -3; PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ; FGFR-1, -2 в клетках парных образцов первичной опухоли и метастазов у больных ПКР.

## **4.2 Материал и методы**

### **4.2.1 Характеристика больных раком почки**

В исследование включен 21 больной раком почки pT1b-T4N0/+M0/+, подвергнутый нефрадреналэктомии. Медиана возраста - 57,0 (43-79) лет, соотношение мужчин и женщин - 2,5:1. У всех пациентов диагностирован рак почки. У большинства больных имели место односторонние опухоли почек (19 (90,5%)), однако у 2 (9,5%) пациентов было выявлено двухстороннее поражение. Медиана диаметра наибольшей опухоли почечной паренхимы составила 8 (3-17) см. У всех пациентов диагностированы метастазы в надпочечниках (ипсилатеральном - 16 (76,2%), контралатеральном - 2 (9,5%), двухсторонние - 3 (14,3%)). В 12 (57,1%) случаях отмечена опухолевая венозная инвазия. У 6 (28,6%) больных на момент операции имелись другие отдаленные метастазы (в легких - 4 (19,0%), в костях - 2 (9,5%)). Солитарные метастатические очаги диагностированы в 15 (71,4%), множественные - в 6 (28,6%) наблюдениях. Метастатическое поражение более чем одного органа имело место у 6 (28,6%) пациентов. (Таблица 18).

**Таблица 18** – Характеристика и лечение 21 больного раком почки с метастазами в надпочечниках

Характеристика	Пациенты (n 21)	
	Количество	%
Возраст, медиана $\pm \sigma$ (min-max),годы	57,0 $\pm$ 1,9 (43-79)	
Пол		
Мужской	15	71,4
Женский	6	28,6
Сторона поражения почки		
Правая	12	57,1
Левая	7	33,3
Обе	2	9,5
Размер опухоли почки, медиана (min-max)	8,0 $\pm$ 0,8 (3,0-17,0)	
Категория pT		
pT1b	1	4,8
pT2a	5	23,8
pT3a	5	23,8
pT3b	8	38,1
pT3c	1	4,8
pT4	1	4,8
Опухолевый венозный тромбоз	12	57,1
Категория pN1	2	9,5
Количество метастазов		
1	15	71,4
>1	6	28,6
Количество локализаций метастазов		
1	16	71,4
>1	6	28,6
Локализация метастазов		
надпочечник	21	100,0
легкие	4	19,0
кости	2	9,5
Вариант почечно-клеточного рака		
Светлоклеточный	20	95,2
Папиллярный, 1 тип	1	4,8
Степень анаплазии G		
G2	9	42,9
G3	10	47,6
G4	2	9,5

Нефрэктомия		
Радикальная	15	71,4
Циторедуктивная	6	28,6
Удаление других опухолевых очагов		
Резекция второй почки	1	4,8
Адреналэктомия	21	100,0
Удаление костного метастаза	1	4,8
Анти-VEGF таргетная терапия после циторедуктивной операции*	6	100,0

\*рассчитано для 6 нерадикально оперированных пациентов

Всем больным выполнена нефрэктомия, адреналэктомия с расширенной забрюшинной лимфодиссекцией. Ипсилатеральный надпочечник с опухолью удален в 16 (76,2%), контралатеральный – в 2 (9,5%), двухсторонняя адреналэктомия произведена в 2 (9,5%) случаях. В 12 (57,1%) случаях объем операции также включал тромбэктомию. В 2 (9,5%) наблюдениях также удалялись опухолевые очаги других локализаций: резекция контралатеральной почки – 1 (1,5%), удаление костного метастаза – 1 (1,5%). Хирургическое лечение было радикальным в 15 (71,4%) наблюдениях и имело циторедуктивный характер в 6 (28,6%) случаях.

Гистологически во всех удаленных образцах первичной опухоли верифицирован почечно-клеточный рак, при этом в 20 (95,2%) случаях выявлен светлоклеточный вариант опухоли. В 1 (4,8%) препарате верифицирован папиллярный рак 1 типа. Степень анаплазии G расценена как G2 у 9 (42,9%), G3 – у 10 (47,6%), G4 – у 2 (9,5%) пациентов. Категория pT1-T2 имела место в 6 (28,6%), pT3-T4 – в 15 (71,4%) наблюдениях. Опухолевая инвазия паранефральной клетчатки выявлена в 9 (42,9%) препаратах. Во всех образцах, полученных во время тромбэктомии, тромботические массы имели строение, аналогичное опухоли почки. Метастазы в удаленных забрюшинных лимфоузлах диагностированы в 2 (9,5%) наблюдениях, при этом у обоих больных имело место поражение более одного

лимфоузла. 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. После циторедуктивных операций все 6 больных получали антиангиогенную таргетную терапию.

#### **4.2.2 Методология исследования**

Особенности хирургического лечения больных ПКР с метастазами в надпочечники описаны в разделе 2.2.2.1, методика иммуногистохимического исследования – в разделе 2.2.2.2, методы статистической обработки данных - в разделе 2.2.2.3.

### **4.3 Результаты**

#### **4.3.1 Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках у больных раком почки**

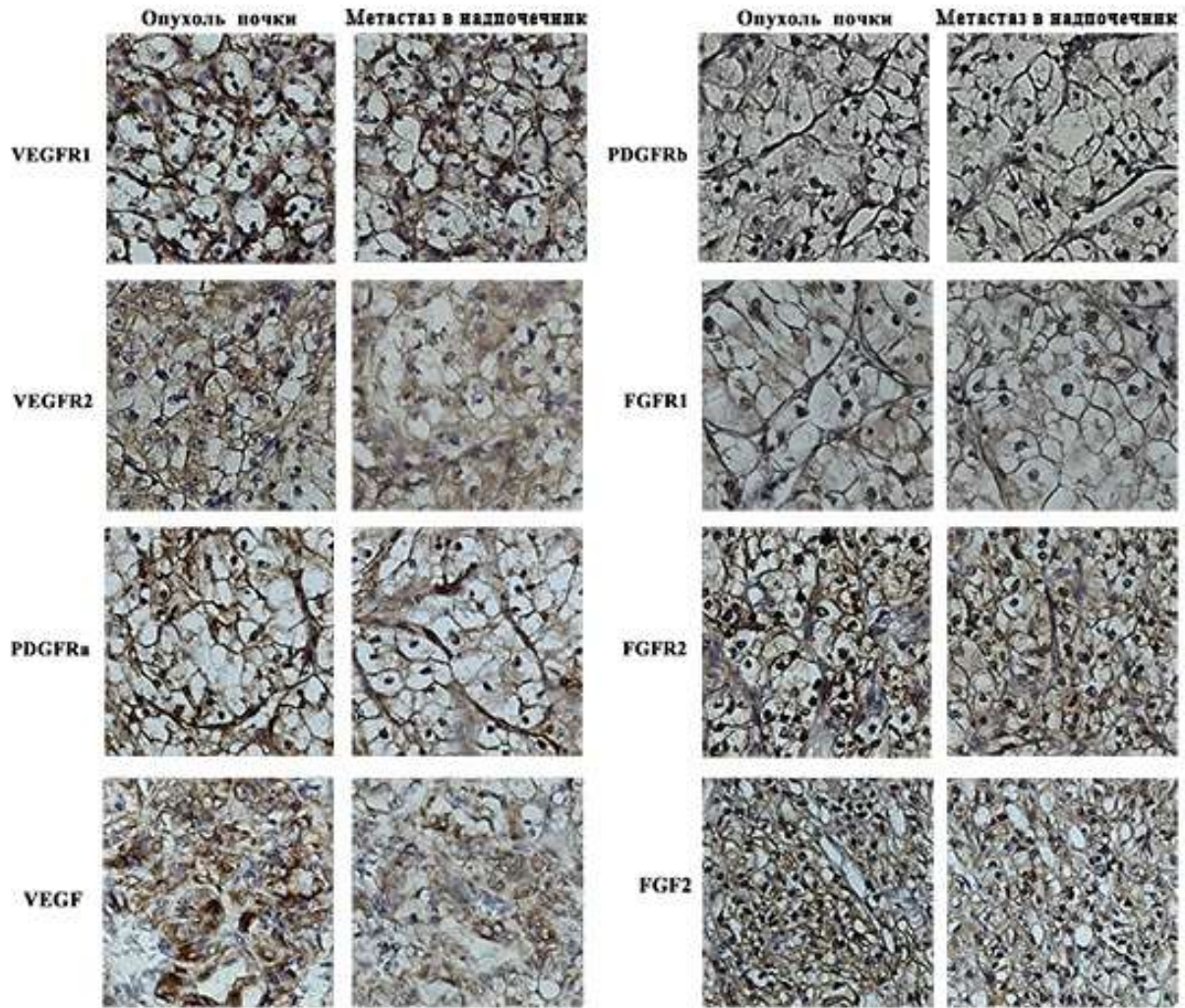
В цитоплазме и на мембране клеток метастазов рака почки экспрессировались ростовые факторы VEGFA и FGF2, а также рецепторных тирозинкиназ VEGFR-1, -2, -3; PDGFR $\alpha,\beta$ ; FGFR1,2 (таблица 19). Однако уровень экспрессии ростовых факторов VEGFA и FGF2 оказался значимо ниже в клетках метастатических очагов, чем в клетках первичной опухоли ( $p < 0,05$  для всех). Также обращает на себя внимание более низкая экспрессия рецепторных тирозинкиназ в метастатических узлах, чем в опухоли почки; разница результатов достигла статистической значимости для VEGFR-1 ( $p = 0,001$ ) и имела тенденцию к достоверности для VEGFR-3 (0,064); для остальных рецепторов различия не являлись значимыми ( $p > 0,05$ ) (Таблица 19).

**Таблица 19** –Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов у больных раком почки

Экспрессия, средняя $\pm$ $\sigma$ , HS	Клетки опухоли почки	Клетки метастаза в надпочечник	Значимость 2-сторонняя
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 $\alpha$	48,1 $\pm$ 12,8	17,1 $\pm$ 5,4	0,032
PDGFR $\beta$	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

#### **4.3.2 Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках с характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки**

Проведен корреляционный анализ возможной взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках опухоли и метастаза с характеристиками опухолевого процесса (размер первичной опухоли, протяженность, уровень опухолевого венозного тромба, врастание опухоли почки в паранефрий, категории pT, pN, наличие метастазов за пределами надпочечника, степень анаплазии опухоли) (Рисунок 11).



**Рисунок 11** – Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов у больных раком почки

Отмечено, что низкая степень дифференцировки и значительная распространенность рака почки ассоциированы с гиперэкспрессией ряда изучавшихся маркеров. Так, категория pT коррелировала с уровнем экспрессии PDGFR $\alpha$  в клетках первичной опухоли ( $p=0,035$ ), врастание опухоли в паранефрий - с уровнем экспрессии FGF2 в клетках метастаза ( $p<0,0001$ , Таблица 20).

**Таблица 20** – Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках с характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки

Уровень экспрессии	Корреляция Пирсона, 2-сторонняя значимость, количество образцов N	Категория pT	Инвазия опухоли почки в паранефрий	Степень анаплазии G	Количество локализаций метастазов
PDGFR $\alpha$ в клетках опухоли почки	Корреляция Пирсона	0,463*	-0,026	0,290	-0,145
	Знч.(2-сторон)	0,035	0,911	0,202	0,532
	N	21	21	21	21
FGF2 в клетках метастаза	Корреляция Пирсона	-0,249	0,737**	0,455*	-0,149
	Знч.(2-сторон)	0,275	0,000	0,038	0,520
	N	21	21	21	21
VEGFR-2 в клетках метастаза	Корреляция Пирсона	-0,038	0,097	-0,173	0,502*
	Знч.(2-сторон)	0,871	0,676	0,454	0,020
	N	21	21	21	21

\*\* . Корреляция значима на уровне 0.01 (2-сторон.). \* . Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторон.).

Степень анаплазии опухоли коррелировала с уровнем экспрессии FGF-2 в клетках метастаза ( $p=0,038$ ), категория pT - с уровнем экспрессии PDGFR $\alpha$  в клетках первичной опухоли ( $p=0,035$ ), врастание опухоли в паранефрий - с уровнем экспрессии FGF2 в клетках метастаза ( $p<0,0001$ ).

Наличие метастатических очагов за пределами надпочечников было прямо взаимосвязано с уровнем экспрессии VEGFR-2 в клетках метастаза ( $p=0,020$ ). Других значимых взаимосвязей не выявлено ( $p>0,05$  для всех).

### **4.3.3 Взаимосвязь экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастазов в надпочечниках с прогнозом больных раком почки**

Медиана наблюдения за всеми больными составила  $22,0 \pm 0,4$  (1-133) месяца.

Рецидивы рака почки развились у 8 (38,1%) из 15 радикально оперированных пациентов, в среднем, через 13,8 (1-100) месяца после хирургического лечения. Во всех случаях зарегистрировано появление отдаленных метастазов. Двум пациентам с солитарными метастазами в печени выполнена их эрадикация (резекция печени – 1, радиочастотная абляция – 1) с последующим динамическим наблюдением. Шести больным назначена антиангиогенная таргетная терапия. Максимальный ответ на лечение – стабилизация опухолевого процесса.

Из 21 пациента 15 (71,4%) больных живы: 8 (38,1%) – без признаков болезни, 7 (33,3%) – с метастазами; 6 (28,6%) пациентов умерли: 5 (23,8%) – от прогрессирования рака почки, 1 (4,8%) – от осложнений хирургического лечения.

Двухлетняя общая и специфическая выживаемость 21 пациента составили 80,5% и 84,7%, медианы данных показателей равнялись  $79,2 \pm 19,7$  (95% CI, 40,7-117,8) и  $79,3 \pm 19,6$  (95% CI, 40,7-117,8) месяца соответственно. Медиана безрецидивной выживаемости 15 радикально оперированных пациентов достигла  $79,3 \pm 48,9$  (95% CI, 0,1-175,2) месяца (2-летняя - 66,7%), медиана беспрогрессивной выживаемости 6 больных, получавших первую линию противоопухолевой терапии после циторедуктивной операции, –  $20,6 \pm 13,9$  (95% CI, 0,1-47,8) месяца (2-летняя – 30,0%).

Проведен анализ влияния на выживаемость степени анаплазии опухоли, категории pT, опухолевой инвазии в паранефрий, наличия опухолевого венозного тромба, категории pN, количества локализаций метастазов, радикальности хирургического лечения. Значимого влияния указанных факторов на выживаемость в малой выборке пациентов не выявлено.



Проведен поиск взаимосвязи рецидива рака почки после радикальной операции и смерти от рака почки после хирургического лечения с уровнями экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и метастаза. Обнаружена прямая взаимосвязь смерти от прогрессирования и экспрессии VEGFR-2 в клетках метастаза ( $r=0,502$ ;  $p=0,020$ ). Небольшое количество наблюдений не позволило выделить пограничное значение уровня экспрессии данного маркера. Никаких других значимых корреляций не отмечено.

#### 4.4 Дискуссия

Рак почки характеризуется высокой склонностью к лимфогенному и гематогенному метастазированию, при этом солитарные метастазы выявляются редко, приблизительно в 10% наблюдений. В большинстве случаев диссеминация опухолевого процесса является показанием к системной противоопухолевой терапии. Удаление метастатических очагов выполняется тщательно отобранным пациентам с солитарными метастазами или больным с симптомными метастатическими очагами в костях и центральной нервной системе. Как правило, нефрэктомия и удаление метастазов производится поэтапно, нередко – в разных клиниках. Однако пациентам с метастазами в надпочечниках чаще всего выполняется симультанная эрадикация первичной опухоли и гематогенного отсева [2]. Поэтому мы выбрали в качестве объектов для нашего исследования больных ПКР с метастазами в надпочечники.

Нам удалось продемонстрировать, что клетки метастазов рака почки экспрессируют ростовые факторы VEGFA и FGF2, а также рецепторных тирозинкиназ VEGFR -1, -2, -3; PDGFR $\alpha,\beta$ ; FGFR-1, -2. По нашим данным, клетки метастатических очагов имеют меньший уровень экспрессии VEGFA и FGF2, а также VEGFR-1 и VEGFR-3 по сравнению с первичной опухолью почки. Интересно, что в работе Tsimafeyev I. et al. (2011), изучавших экспрессию FGFR1, также

отмечена меньшая частота окрашивания клеток метастазов в лимфоузлах по сравнению с первичной опухолью (98% и 82,5% соответственно) [124].

Не исключено, что различия активации HIF-зависимых сигнальных путей являются причиной более высокой частоты объективных ответов на антиангиогенную терапию со стороны метастазов, чем первичных опухолей. Возможно, избыточное количество мишеней в клетках опухоли почки не может быть связано ТКИ, в то время, как переносимые дозы антиангиогенных препаратов способны блокировать меньшее количество РТК в клетках метастазов и индуцировать уменьшение опухолевых очагов [25, 27, 38, 39, 41, 48, 63, 87-89, 106-108, 119].

Так же, как и во всей популяции пациентов, включенных в наше исследование, у больных ПКР с метастазами в надпочечниках гиперэкспрессия ростовых факторов и их рецепторов опухолевыми клетками оказалась ассоциирована с неблагоприятным течением опухолевого процесса: повышенная продукция PDGFR $\alpha$  в клетках опухоли почки коррелировала с категорией pT.

Интересно, что гиперэкспрессия FGF2 в клетках метастаза оказалась взаимосвязана с опухолевой инвазией паранефрия и степенью анаплазии G первичной опухоли. Одним объяснением этому факту может служить сохранение метастазом специфических свойств клеток первичной опухоли; другим, более интересным, - обратная активирующая связь метастаза с первичной опухолью путем экспрессии ростовых факторов и их секреции во внеклеточное пространство. Возможно, эту гипотезу могут подтвердить ранние исследования, показавшие, что сывороточная концентрация FGF2 прямо коррелировала со стадией ПКР и наличием отдаленных метастазов [45; 34; 105; 116].

Мы выявили, что гиперэкспрессия VEGFR-2 в клетках метастаза коррелировала с метастатическим поражением более одного органа. Более того, уровень экспрессии VEGFR-2 в клетках метастаза оказался прямо взаимосвязан со смертью от прогрессирования рака почки. На наш взгляд, этот результат может

оказаться очень важным, поскольку позволяет предположить влияние оси VEGFA/VEGFR-2 на дальнейшее распространение опухолевых клеток за счет ангиогенеза в метастазе, а не только первичной опухоли у больных ПКР.

#### 4.5 Заключение

Таким образом, клетки метастазов рака почки экспрессируют ростовые факторы VEGFA и FGF2, а также рецепторных тирозинкиназ VEGFR -1, -2, -3; PDGFR $\alpha,\beta$ ; 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. Гиперэкспрессия ростовых факторов и их рецепторов опухолевыми клетками ассоциирована с неблагоприятным течением опухолевого процесса. Гиперэкспрессия PDGFR $\alpha$  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. Уровень экспрессии VEGFR-2 в клетках метастаза прямо взаимосвязан со смертью от прогрессирования рака почки ( $r=0,502$ ;  $p=0,020$ ).

## **ГЛАВА 5. ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ НА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТАХ И ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ**

### **5.1 Актуальность проблемы**

Рак почки – иммуногенная опухоль, что подтверждается случаями спонтанных регрессий метастазов после циторедуктивных нефрэктомий и умеренной эффективностью цитокинов, продемонстрированной при диссеминированном ПКР. Еще одним доказательством значительного вклада иммунной системы в подавление опухоли является высокое содержание опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в ткани рака почки. Несколькими исследовательскими группами производилось иммунофенотипирование опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов при ПКР. При этом было продемонстрировано, что в первичной опухоли доминируют цитотоксические Т-лимфоциты: экспрессия CD3+ выявлена на 66,9-69,7%, CD8+ – на 34,6-42,6% клеток. Т-регуляторные клетки (CD25+ и CD4+) были представлены в меньшей степени [76; 78].

Несмотря на экспрессию маркеров активации опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами, врожденные и опухоль-индуцированные адаптивные функциональные нарушения иммунных клеток приводят к невозможности подавления ПКР иммунной системой. Иммунотерапия ингибиторами PD(L)-1 позволяет преодолеть иммуносупрессивное действие опухоли и обеспечить длительную выживаемость без прогрессирования у большинства пациентов [90]. Тем не менее, частота полных ответов остается неудовлетворительной, что указывает на то, что эффективность иммунотерапии ограничена опухоль-специфическими факторами и/или иммуносупрессивными клетками [90]. Одним из возможных решений проблемы резистентности к иммунотерапии ПКР с доказанной клинической эффективностью является введение в схему лечения ТКИ [108]. Предположительно одним из механизмов антиангиогенной иммуномодуляции

является изменение соотношения клеток-супрессоров и цитотоксических лимфоцитов в опухоли [29; 51]. В таком случае, что же является непосредственной мишенью ТКИ? Большинство опубликованных работ было сфокусировано на определении экспрессии VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR в опухолевых, реже – в эндотелиальных клетках [86, 61, 28]. В доступной нам литературе мы не обнаружили исследований, изучавших экспрессию HIF-зависимых молекул на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль.

Согласно данным, полученным при иммунофенотипировании периферических лейкоцитов, в крови больных ПКР преобладают те же субпопуляции лимфоцитов, что и в опухоли (CD3+/CD8+) [76; 78]. Лейкоциты периферической крови теоретически также могут быть вовлечены в процессы взаимодействия иммунной системы и проангиогенных HIF-зависимых сигналов при раке почки. Насколько нам известно, подобная гипотеза не рассматривалась другими исследовательскими группами.

Принимая во внимание факты, приведенные выше, мы считаем, что изучение экспрессии молекул HIF-зависимых сигнальных путей на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, и периферических лимфоцитах (всех субпопуляций, а также CD3+, CD8+) представляет собой значительный интерес и может внести вклад в понимание процессов взаимодействия проангиогенного сигнала и опухоль-индуцированного подавления иммунного ответа.

## **5.2 Материал и методы**

### **5.2.1 Характеристика больных раком почки и здоровых добровольцев**

В исследование включены 19 больных раком почки pT1-T3N0/N+M0/M+, подвергнутых нефрэктомии, и 10 здоровых добровольцев. Медиана возраста 19 пациентов составила 59,0 (33-75) лет, соотношение мужчин и женщин – 1,1:1. Большинство (17 (89,5%)) больных имели опухоль одной почки, у 2 (10,5%) больных были диагностированы двухсторонние опухоли. Медиана размеров наибольшей

опухоли почечной паренхимы составила 7,8 (2,5-19,0) см. В 13 (44,8%) наблюдениях имелся опухолевый венозный тромбоз. У 9 (47,4%) пациентов до операции выявлены отдаленные метастазы, в том числе – солитарные в 4 (21,1%) случаях. У 2 (21,1%) больных метастазы локализовались более чем в одном органе. Метастатическое поражение легких имело место в 6 (31,6%), надпочечников – в 4 (21,1%), костей – в 1 (5,3%) наблюдении.

Всем пациентам выполнена нефрэктомия с расширенной лимфодиссекцией. В 13 (44,8%) наблюдениях произведена тромбэктомия. Пяти (26,4%) больным удалены метастатические очаги: в 4 (21,1%) случаях выполнена адреналэктомия по поводу метастаза в надпочечнике, в 1 (5,3%) – удаление костного метастаза. Особенности хирургического лечения больных ПКР описаны в разделе 2.2.2.1. Полное удаление всех определяемых опухолевых очагов удалось осуществить в 13 (68,4%) случаях, у 6 (31,6%) пациентов операция имела циторедуктивный характер.

Гистологическое исследование во всех случаях подтвердило наличие почечно-клеточного рака. В 15 (78,9%) образцах верифицирован светлоклеточный, в 4 (21,1%) – несветлоклеточный вариант опухоли. Степень анаплазии G1-2 имела место в 13 (68,4%), G3-4 – в 6 (71,6%) препаратах. У 2 (10,5%) пациентов опухоль прорастала в паранефральную клетчатку. Во всех 13 образцах ткань удаленного тромба была представлена разрастаниями почечно-клеточного рака, аналогичного первичной опухоли. Опухолевые очаги в удаленных надпочечниках и резецированной костной ткани имели строение метастазов рака почки.

Все пациенты, подвергнутые радикальному хирургическому лечению, находились под динамическим наблюдением. После циторедуктивной нефрэктомии все 6 больных получали противоопухолевое лечение: цитокины – 1 (5,3%), анти-VEGF таргетную терапию – 5 (26,3%) (Таблица 21).

**Таблица 21** – Характеристика и лечение 19 больных раком почки

Характеристика	Пациенты (n 19)	
	Количество	%
Возраст, медиана $\pm$ $\sigma$ (min-max), годы	59,0 $\pm$ 10,4 (33-75)	
Пол		
Мужской	10	52,6
Женский	9	47,4
Сторона поражения почки		
Правая	7	36,9
Левая	10	52,6
Обе	2	10,5
Размер опухоли почки, медиана (min-max)	7,8 $\pm$ 4,9 (2,5-19,0)	
Категория pT		
pT1	4	21,1
pT2	2	10,5
pT3	13	68,4
Опухолевый венозный тромбоз	13	44,8
Категория pN1	3	10,3
Категория M1	9	47,4
Количество метастазов		
1	4	21,1
>1	5	26,3
Количество локализаций метастазов		
1	7	26,3
>1	2	21,1
Локализация метастазов		
легкие	6	31,6
кости	1	5,3
надпочечник	4	21,1
Вариант почечно-клеточного рака		
Светлоклеточный	15	78,9
Хромофобный	1	5,3
Папиллярный 1 тип	1	5,3
Папиллярный 2 тип	2	10,5
Степень анаплазии G		
G1	3	15,8
G2	10	52,6
G3	4	21,1
G4	2	10,5

Нефрэктомия		
Радикальная	13	68,4
Циторедуктивная	6	31,6
Удаление метастазов		
Адреналэктомия	4	21,1
Удаление костного метастаза	1	5,3
Вид системной терапии после циторедуктивной операции*		
Цитокины	1	5,3
Анти-VEGF таргетная терапия	5	26,3

\* у 6 пациентов, подвергнутых циторедуктивной нефрэктомии

В исследование включено 10 здоровых доноров женского пола. Медиана возраста –  $40,4 \pm 7,4$  (23-65) года.

## 5.2.2 Методология исследования

### 5.2.2.1 Изоляция лимфоцитов

Для получения TIL производили забор нескольких участков свежего опухолевого операционного материала (2-4 участка для каждого из образцов) в стерильных условиях в специальную пробирку, содержащую питательную среду с антибиотиком. Для сохранения жизнеспособности, функциональной активности и фенотипа TIL был использован протокол механической и щадящей ферментативной диссоциации опухолевой ткани до одноклеточной суспензии клеток, с применением коллагеназы I типа (StemCell, Канада) в концентрации 200 ед/мл. После механического измельчения и добавления фермента пробирку помещали в CO<sub>2</sub> - инкубатор при 37°C на 40 минут, далее образец пропускали через клеточный фильтр 70 мкм и отмывали несколько раз в фосфатно-солевом буфере.

Изоляцию опухоль-ассоциированных лимфоцитов проводили путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077 г/мл). Суспензию клеток аккуратно наслаивали на фиколл в соотношении 1:3 и центрифугировали при



1025g в течение 25 минут при 20°C с медленным ускорением и остановкой. После чего собирали интерфазное кольцо и проводили отмывку клеток при 650g, в течение 10 мин при 20°C. Образцы крови собирали в пробирки с покрытием EDTA (BD Biosciences) 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 опухоль-инфильтрирующие лимфоциты были подготовлены для проточной цитометрии.

#### **5.2.2.2 Проточная цитометрия**

Изолированные периферические и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты изучались непосредственно после выделения. Клетки инкубировали в течение 15 мин при 4°C с нормальными мышиными иммуноглобулинами (mIgG) (6 мкг мкг/10<sup>6</sup> клеток) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), затем инкубировали 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-PDGFRa, клон 16.A1, PE анти-PDGFRb, клон 18.A2 (все Sony Biotech), PE анти-VEGFR-1, клон D - 2, PE анти-FGFR-2, клон C-8 (Invitrogen)). Клетки получали на проточном цитометре 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. Медианную интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали путем вычитания флуоресценции изотипа из флуоресценции окраски.

### 5.2.2.3 Другие использованные методы

Для иммуногистохимического исследования клеток ПКР использовались парные образцы ткани опухоли почки, использованной для выделения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Методика иммуногистохимического исследования описана в разделе 2.2.2.2

Методы статистической обработки данных освещены в разделе 2.2.2.3.

## 5.3 Результаты

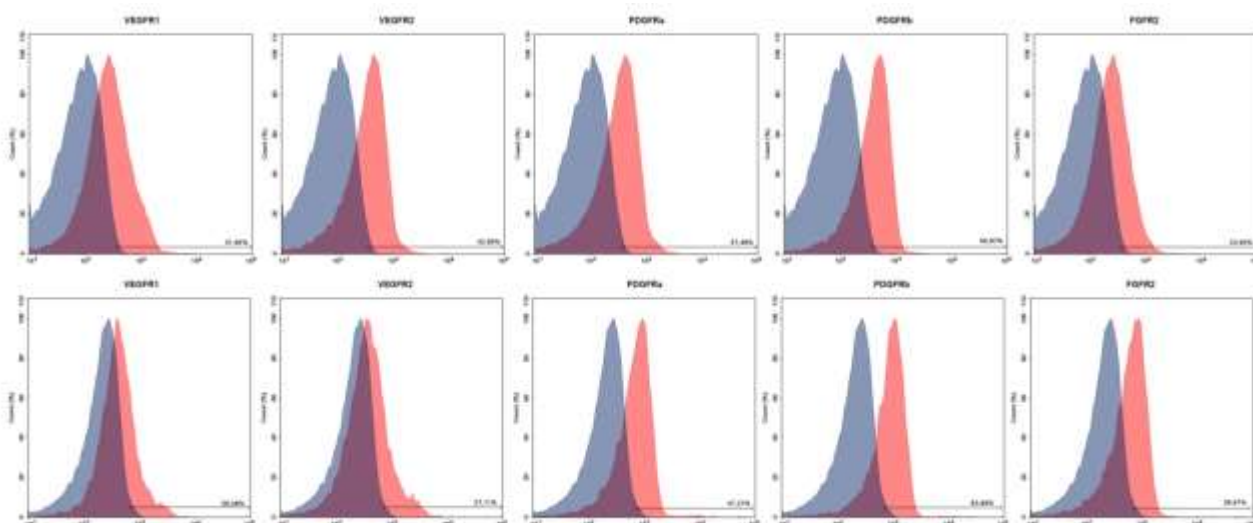
### 5.3.1 Экспрессия рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови

Изучалась экспрессия рецепторов VEGFR -1 и -2, PDGFR $\alpha$  и - $\beta$ , FGFR-2 на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах CD45+, CD3+ и CD3+CD8+. Все типы клеток экспрессировали вышеперечисленные рецепторных тирозинкиназ; зарегистрированные уровни экспрессии перечислены в таблице 22 и рисунке 12.

**Таблица 22** – Экспрессия ростовых факторов, рецепторных тирозинкиназ на CD45+, CD3+ и CD3+CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, у больных светлоклеточным ПКР

Экспрессия РТК, средняя $\pm$ $\sigma$	CD45+*	CD3+**	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 $\alpha$	40,5 $\pm$ 2,8	42,3 $\pm$ 3,7	46,2 $\pm$ 4,9
PDGFR $\beta$	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



**Рисунок 12** – Экспрессия рецепторных тирозинкиназ: (А) на CD45+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, у больных светлоклеточным ПКР, (Б) на CD45+ лимфоцитах периферической крови у больных почечно-клеточным раком до нефрэктомии

Значимых различий экспрессии ТКР на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах разных субпопуляций не выявлено.

Производилась оценка экспрессии рецепторов VEGFR-1, -2, PDGF $\alpha$  и  $\beta$ , FGFR-2 на лимфоцитах периферической крови CD45+ у больных раком почки до и через 180 дней после нефрэктомии, а также у здоровых добровольцев (Таблица 23). Все изучавшиеся рецепторы экспрессировались на периферических CD45+ лимфоцитах в обеих когортах исследования. Уровни экспрессии приведены в таблице.

**Таблица 23** – Экспрессия рецепторных тирозинкиназ на CD45+ лимфоцитах периферической крови у больных почечно-клеточным раком до, через 180 суток после нефрэктомии и у здоровых доноров

Экспрессия на CD45+, средняя $\pm$ $\sigma$	Здоровые добровольцы (n 10)	Больные раком почки до операции (n 19)	Больные раком почки после нефрэктомии (n 19)	Больные раком почки после радикальной нефрэктомии (n 13)	Больные раком почки после циторедуктивной нефрэктомии (n 6)
VEGFR-1	78,1 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	28,8 $\pm$ 2,7	43,4 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	43,4 $\pm$ 8,9 <sup>a</sup>	39,3 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
VEGFR-2	79,6 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>	27,1 $\pm$ 2,2	57,8 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>	58,0 $\pm$ 9,4 <sup>a</sup>	57,3 $\pm$ 14,3 <sup>a</sup>
PDGFR $\alpha$	80,1 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	44,9 $\pm$ 3,7	49,1 $\pm$ 10,1	51,3 $\pm$ 12,1	44,7 $\pm$ 21,7
PDGFR $\beta$	75,5 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	62,6 $\pm$ 3,8	47,4 $\pm$ 9,8	47,0 $\pm$ 11,5	48,3 $\pm$ 21,8
FGFR-2	72,1 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	41,4 $\pm$ 6,3	35,1 $\pm$ 2,8	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.

Отмечена достоверно более высокая экспрессия рецепторных тирозинкиназ, включая VEGFR-1 и -2, PDGFR  $\alpha$  и  $\beta$ , FGFR-2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови здоровых доноров по сравнению с больными раком почки, которым не удалена первичная опухоль ( $p < 0,05$  для всех).

Выявлена достоверно более высокая экспрессия VEGFR-1 и -2 типов на CD45+ лимфоцитах периферической крови пациентов через 180 дней после удаления первичной опухоли (независимо от наличия неудаленных отдаленных метастазов) по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$  для всех). Других достоверных изменений статуса экспрессии изучавшихся рецепторов не зарегистрировано.

При исследовании динамики экспрессии рецепторных тирозинкиназ на CD3+ и CD3+CD8+ лимфоцитах периферической крови больных раком почки до и через 180 суток после нефрэктомии отмечено достоверное увеличение уровня VEGFR-2 ( $p = 0,003$  для всех) в послеоперационном периоде (Таблицы 24 и 25).

**Таблица 24** – Экспрессия рецепторных тирозинкиназ на CD3+ лимфоцитах периферической крови у 19 больных почечно-клеточным раком до и через 180 суток после нефрэктомии

Экспрессия на CD3+, средняя $\pm \sigma$	Больные раком почки до операции	Больные раком почки после нефрэктомии	2-сторонняя значимость
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 $\alpha$	52,9 $\pm$ 5,3	52,9 $\pm$ 10,2	0,997
PDGFR $\beta$	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

**Таблица 25** – Экспрессия рецепторных тирозинкиназ на CD3+CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных почечно-клеточным раком до и через 180 суток после нефрэктомии

Экспрессия на CD8+, средняя $\pm \sigma$	Больные раком почки до операции	Больные раком почки после нефрэктомии	2-сторонняя значимость
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 $\alpha$	49,9 $\pm$ 4,9	52,8 $\pm$ 11,1	0,801
PDGFR $\beta$	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

### **5.3.2 Поиск взаимосвязи между экспрессией рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови и характеристиками опухолевого процесса у больных раком почки**

Проведен корреляционный анализ, направленный на выявление статистически значимых взаимосвязей экспрессии VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha$ , $\beta$ ; FGFR-2 на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (CD45+, CD3+, CD8+) и лимфоцитах периферической крови (CD45+, CD3+, CD8+) с характеристиками рака почки

(категории T, N, M, степень анаплазии G, инвазия паранефральной клетчатки и наличие опухолевого венозного тромбоза).

Значимых корреляций уровней экспрессии изучавшихся рецепторных тирозинкиназ на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, с характеристиками первичной опухоли у больных раком почки не выявлено.

Отмечена обратная корреляция уровней экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до лечения с категорией T, а также наличием опухолевого венозного тромбоза ( $p < 0,05$  для всех) (Таблица 26). Других значимых корреляций не выявлено.

**Таблица 26** – Корреляция экспрессии рецепторных тирозинкиназ на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови до операции с характеристиками первичной опухоли у больных почечно-клеточным раком

Уровень экспрессии маркеров на лимфоцитах периферической крови	Корреляция Пирсона, 2-сторонняя значимость и число образцов N	Категория T	Опухолевый тромб
VEGFR-1 CD45+	Корреляция Пирсона	-0,551*	-0,706**
	Знч.(2-сторон)	0,014	0,001
	N	19	19
VEGFR-2 CD45+	Корреляция Пирсона	-0,503*	-0,619**
	Знч.(2-сторон)	0,028	0,005
	N	19	19
VEGFR-1 CD3+	Корреляция Пирсона	-0,931**	-0,957**
	Знч.(2-сторон)	0,000	0,000
	N	11	11
VEGFR-2 CD3+	Корреляция Пирсона	-0,791**	-0,760**
	Знч.(2-сторон)	0,004	0,007
	N	11	11
VEGFR-1 CD3+CD8+	Корреляция Пирсона	-0,901**	-0,947**
	Знч.(2-сторон)	0,000	0,000
	N	11	11
VEGFR-2 CD3+CD8+	Корреляция Пирсона	-0,749**	-0,841**
	Знч.(2-сторон)	0,008	0,001
	N	11	11

\*\* . Корреляция значима на уровне 0.01. \* . Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторон.).

### **5.3.3 Поиск взаимосвязи между экспрессией рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови и прогнозом больных раком почки**

Медиана наблюдения за 19 больными раком почки составила  $24,0 \pm 1,9$  месяца. Рецидивы рака почки зарегистрированы у 4 (25,0%) из 16 радикально оперированных больных, в среднем, через 8 (1-19) месяцев после хирургического лечения: отдаленные метастазы развились в 3 и опухоли в ранее резецированной почке за пределами зоны операции – в 1 случае. Всем больным с отдаленными метастазами назначена таргетная антиангиогенная терапия (максимальный ответ на лечение – стабилизация во всех случаях), пациентка с мультифокальным ростом рака почки находится под динамическим наблюдением.

Из 19 пациентов 13 (68,4%) живы (9 (47,4%) – без признаков болезни, 4 (21,1%) – с метастазами), 6 (31,5%) умерли от прогрессирования рака почки.

Медиана общей, специфической выживаемости всех пациентов и составила  $33,8 \pm 12,3$  (95% CI, 9,7-57,9) и  $33,8 \pm 12,3$  (95% CI, 9,7-57,9) месяца; медиана безрецидивной выживаемости радикально оперированных больных не достигнута (1-летняя – 83,3%, 2-летняя – 66,7%); медиана беспрогрессивной выживаемости нерадикально оперированных больных равнялась 11 (95% CI, 0,1-29,1) месяцев (1-летняя – 33,3%).

Проведен однофакторный и многофакторный анализ влияния категорий T, N, M, степени анаплазии G и радикальности хирургического лечения на выживаемость пациентов. Единственным значимым фактором риска общей выживаемости являлось неполное удаление всех опухолевых очагов (HR 10,9, 95% CI: 1,3-95,7;  $p=0,030$ ). Значимых факторов риска безрецидивной выживаемости радикально оперированных пациентов и беспрогрессивной выживаемости больных, подвергнутых циторедуктивным операциям, не выявлено.

Проведен поиск взаимосвязи между уровнями экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и лимфоцитах периферической крови с прогрессированием рака почки после хирургического лечения и смертью от рака почки. Отмечена прямая корреляция уровня экспрессии VEGFR-1 на CD3+ и CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, а также FGFR-2 в CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, с развитием прогрессирования рака почки после радикального хирургического лечения ( $p < 0,05$ , Таблица 27). В связи с малым количеством наблюдений выделить пограничные значения данных маркеров не удалось. Других значимых корреляций не выявлено (в таблице приведены только значимые корреляции).

**Таблица 27** – Корреляция экспрессии рецепторных тирозинкиназ на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, с прогрессированием рака почки у больных, подвергнутых хирургическому лечению

Уровень экспрессии на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль	Корреляция Пирсона, значимость, количество наблюдений N	Прогрессирование
Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты CD3+		
VEGFR-1	Корреляция Пирсона	0,959 <sup>**</sup>
	Знч.(2-сторон)	0,001
	N	7
Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты CD3+CD8+		
VEGFR-1	Корреляция Пирсона	0,821 <sup>*</sup>
	Знч.(2-сторон)	0,024
	N	7
FGFR-2	Корреляция Пирсона	0,867 <sup>*</sup>
	Знч.(2-сторон)	0,012
	N	7

\*\* . Корреляция значима на уровне 0.01. \* . Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторон.).



## 5.4 Дискуссия

Мы провели комплексное изучение экспрессии HIF-зависимых рецепторных тирозинкиназ на лимфоцитах периферической крови и лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, у больных ПКР. Объектом исследования выбраны все лимфоциты, то есть клетки, продуцирующие CD45, а также наиболее часто выявляемые в первичной опухоли и периферической крови пациентов, страдающих раком почки, субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующие CD3 и CD8 [76; 78].

По нашим данным, как лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (CD45+, CD3+, CD3+CD8+), так и периферические лимфоциты (CD45+, CD3+, CD3+CD8+) больных ПКР экспрессируют VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha,\beta$ ; FGFR-2.

Мы продемонстрировали, что уровень экспрессии VEGFR-1 на CD3+ и CD3+CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах, а также FGFR-2 на CD3+CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах, прямо коррелировал с развитием прогрессирования рака почки после радикального хирургического лечения ( $p < 0,05$ ).

Негативное влияние гиперэкспрессии HIF-зависимых РТК на прогноз может свидетельствовать об опухоль-индуцированной инициации продукции рецепторов ростовых факторов на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах, приводящей к подавлению противоопухолевой активности клеточного иммунитета. Косвенным доказательством этой версии служит многообещающая эффективность иммуно-таргетных комбинаций при диссеминированном раке почки [108; 87].

Весьма неожиданные и многообещающие результаты были получены при изучении лимфоцитов периферической крови у больных ПКР. Отмечена достоверно более низкая экспрессия VEGFR-1, -2; PDGFR $\alpha,\beta$ ; 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). Более 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, а также наличием опухолевого венозного тромбоза). 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 CD8+ лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$  для всех).

Таким образом, складывается впечатление, что развитие рака почки ассоциировано с координированным повышением экспрессии РТК на клетках опухоли/опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах и выраженным подавлением продукции РТК на периферических лимфоцитах. При этом степень выраженности разнонаправленных изменений экспрессии HIF-зависимых рецепторных тирозинкиназ в опухоли и крови прямо коррелирует с распространенностью опухолевого процесса. Удаление первичной опухоли приводит к нормализации экспрессии РТК на периферических лимфоцитах. Интересно, что еще в 1995 г. Fujimoto K. et al. показали, что у больных ПКР повышается уровень растворимого сывороточного FGF2, который полностью нормализуется через 2 суток после нефрэктомии [45]. Полученные нами данные открывают перспективу разработки маркера, который мог бы использоваться для диагностики и наблюдения за больными ПКР.

### 5.5. Заключение

Таким образом, CD45+ лимфоциты, CD3+ и CD3+CD8+ Т-лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, а также аналогичные субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных раком почки экспрессируют VEGFR-1, -2; PDGF $\alpha,\beta$ ; FGFR-2. Отмечена прямая корреляция уровня экспрессии VEGFR-1 на CD3+ и CD3+CD8+ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, а также FGFR-2 на CD3+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 $\alpha,\beta$ ; 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). Более низкая экспрессия VEGFR-1 и VEGFR-2 на CD45+, CD3+, CD3+CD8+ Т-лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до лечения коррелировала большей местной распространенностью первичной опухоли (высокой категорией T, а также наличием опухолевого венозного тромбоза). 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 CD8+ лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$  для всех).

## 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  $\alpha,\beta$ ; 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 паранефрия (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 $\alpha,\beta$ ; FGFR-2.

Уровень экспрессии VEGFR-2 и PDGFR $\beta$  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 $\alpha,\beta$ ; 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 СОКРАЩЕНИЙ**

ECM (extracellular matrix) – внеклеточный матрикс

EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

FGF (fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов

FGFR (fibroblast growth factor receptor) – рецептор фактор роста фибробластов

HIF (hypoxia-inducible factor) – гипоксия-индуцированный фактор

HMW (high molecular weigh) – высокая молекулярная масса

HR – hazard-ratio

HS – histo-score

HSPG (heparan sulfate proteoglycan) – гепаран-сульфат-протеогликан

Ig – иммуноглобулин

IGF-1R (insulin-like growth factor 1) – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1

LMW (low molecular weight) низкая молекулярная масса

PDGF (platelet-derived growth factor) – фактор роста тромбоцитарного происхождения

PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) – рецептор фактор роста тромбоцитарного происхождения

PLC (phospholipase C) – фосфолипаза C

PTX3 – пентраксин 3

STAT (signal transducer and activator of transcription) – сигнальный преобразователь и активатор транскрипции

TSP-1 (thrombospondin-1) – тромбоспондин-1

VEGF (vascular endothelial growth factor) сосудистый эндотелиальный фактор роста

VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) – рецептор сосудистый эндотелиальный фактор роста

VHL (von Hippel—Lindau) ген вон Гиппеля-Линдау

БПВ – беспрогрессивная выживаемость

ОВ – общая выживаемость

ПКР – почечно-клеточный рак

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТК – рецепторная тирозинкиназа

СВ – специфическая выживаемость

ТКИ – тирозинкиназные ингибиторы

ЧОО – частоты объективных ответов

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. 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.
2. Матвеев, В.Б. Рак почки / В.Б. Матвеев, М.И. Волкова // РМЖ. – 2007. – Т. 14 – С. 1094-1099.
3. Abel, E.J. Perioperative Outcomes Following Surgical Resection of Renal Cell Carcinoma with Inferior Vena Cava Thrombus Extending Above the Hepatic Veins: A Contemporary Multicenter Experience / E.J. Abel, R.H. Thompson, V. Margulis // Eur. Urol. – 2014. – Vol. 66. – P. 584-592.
4. Achen, M.G. The angiogenic and lymphangiogenic factor vascular endothelial growth factor-D exhibits a paracrine mode of action in cancer / M.G. Achen, R.A. Williams, M.E. Baldwin, P. Lai P et al. // Growth Factors. – 2002. – Vol. 20 (2). – P. 99-107.
5. Adair, T.H. Angiogenesis / T.H. Adair, J.P. Montani. – San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. – Chapter 1, Overview of Angiogenesis. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238>
6. Adair, T.H. Angiogenesis / T.H. Adair, J.P. Montani. – San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. – Chapter 4, Regulation: Mechanical Factors. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53240>
7. Adair, T.H. Angiogenesis / T.H. Adair, J.P. Montani. – San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. – Chapter 3, Regulation: Metabolic Factors. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53243/>
8. Ahmad, I. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis / I. Ahmad, T. Iwata, H.Y. Leung // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 4. – P. 850-860.



9. Aizawa, S. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression / S. Aizawa, M. Arakaki, K. Yuasa et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 23139-23149.
10. Akl, M.R. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies / M.R. Akl, P. Nagpal, N.M. Ayoub et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7(28). – P. 44735-44762.
11. Amin, C. Preoperative tyrosine kinase inhibition as an adjunct to debulking nephrectomy / C. Amin, E. Wallen, R.S. Pruthi et al. // *Urology.* – 2008. – Vol. 72. – P. 864-868.
12. Ammad, A.F. Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape / A.F. Ammad, Z.H. Siddik // *Cell Biochem. Funct.* – 2015. – Vol. 33(5). – P. 257-265.
13. Baldan, V. Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma / V. Baldan, R. Griffiths, R.E. Hawkins et al. // *Br. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 112. – P. 1510-1518.
14. Ball, S.G. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors / S.G. Ball, C.A. Shuttleworth, C.M. Kielty // *J. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 177. – P. 489-500.
15. Behbahani, T.E. Tyrosine kinase expression profile in clear cell renal cell carcinoma / T.E. Behbahani, C. Thierse, C. Baumann et al. // *World J. Urol.* – 2012. – Vol. 30(4). – P. 559-565.
16. Behbod, F. Transcriptional profiling of mammary gland side population cells / F. Behbod, W. Xian, C.A. Shaw et al. // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 1065-1074.
17. Bierer, S. Lymphangiogenesis in kidney cancer: Expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in clear cell and papillary renal cell carcinoma / S. Bierer, E. Herrmann, T. Köpke et al. // *Oncol. Rep.* – 2008. – Vol. 20. – P. 721-725.

18. Bottos, A. Oncogenes and angiogenesis: a way to personalize anti-angiogenic therapy? / A. Bottos, A. Bardelli // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – Vol. 70(21). – P. 4131–4140. DOI: 10.1007/s00018-013-1331-3
19. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma // *Nature*. – 2013. – Vol. 499, N (7456). – P. 43-49.
20. Casanovas, O. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors / O. Casanovas, D.J. Hicklin, G. Bergers et al. // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 8. – P. 299-309.
21. Cavallaro, U. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression / U. Cavallaro, G. Christofori // *J. Neurooncol.* – 2000. – Vol. 50(1). – P. 63-70.
22. Cha, J.Y. Aberrant receptor internalization and enhanced FRS2-dependent signaling contribute to the transforming activity of the fibroblast growth factor receptor 2 IIIb C3 isoform / J.Y. Cha, S. Maddileti, N. Mitin et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 6227-6240.
23. Chenkui, M. Effects of VEGF and VEGFR polymorphisms on the outcome of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib: a systematic review and meta-analysis / M. Chenkui, J. Cao, Y. Wang et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8(40). – P. 68854-68862.
24. Choi, T.H. *In vivo* and *in vitro* demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane / T.H. Choi, S.C. Tseng // *Cornea*. – 2001. – Vol. 20. – P. 197-204.
25. Choueiri, T.K. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial / T.K. Choueiri, B. Escudier, T. Powles et al. // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol. 17. – P. 917-927.
26. Choueiri, T.K. Cabozantinib versus sunitinib as initial targeted therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma of poor or intermediate risk: the alliance

A031203 CABOSUN trial / T.K. Choueiri, S. Halabi, B.L. Sanford et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 591-597.

27. Clarke, W.E. Coordination of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) trafficking to nuclei of reactive astrocytes around cerebral lesions in adult rats / W.E. Clarke, M. Berry, C. Smith et al. // *Mol. Cell Neurosci.* 2001. – Vol. 17. – P. 17-30.

28. Cumpănas, A.A. The Involvement of PDGF-B/PDGFR $\beta$  Axis in the Resistance to Antiangiogenic and Antivascular Therapy in Renal Cancer / A.A. Cumpănas, A.M. Cimpean, O. Ferician et al. // *Anticancer Res.* – 2016. – Vol. 36(5). – P. 2291-2295.

29. Dai F. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges / F. Dai, J. Kloepper, Z. Amoozgar, D.G. Duda, R.K.Jain // *Nature Reviews Clinical Oncology.* – 2018. – Vol. 15(5). – P.325-340.

30. de Velasco, Guillermo. Targeted genomic landscape of metastases compared to primary tumours in clear cell metastatic renal cell carcinoma / G. de Velasco, S.A. Wankowicz, R. Madison et al. // *Br. J. Cancer.* – 2018. – Vol. 118. – P. 1238-1242.

31. Dell'Era, P. Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis / P. Dell'Era, M. Mohammadi, M. Presta // *Mol. Biol. Cell.* – 1999. – Vol. 10. – P. 23-33.

32. Detre, S. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas / S. Detre, G. Sacconi Jotti, M. Dowsett // *J. Clin. Pathol.* – 1995. – Vol. 48. – P. 876-878.

33. Dudley, A.C. Tumor endothelial cells / A.C. Dudley // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – Vol. 2(3). – P. a006536. DOI: 10.1101/cshperspect.a006536

34. Duensing, S. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with progressive lung metastases in advanced renal cell carcinoma patients / S. Duensing, J. Grosse, J. Atzpodien // *Anticancer Res.* – 1995. – Vol. 15. – P. 2331-2333.

35. Dunham-Ems, S.M. Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) nuclear

dynamics reveal a novel mechanism in transcription control / S.M. Dunham-Ems, Y.W. Lee, E.K. Stachowiak et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20. – P. 2401-2412.

36. Edgren, M. Serum concentrations of VEGF and b-FGF in renal cell, prostate and urinary bladder carcinomas / M. Edgren, B. Lennernas, A. Larsson et al. // *Anticancer Res.* – 1999. – Vol. 19. – P. 869-873.

37. Eronat, O. The expression level of vascular endothelial growth factor receptor-2, vascular endothelial growth factor receptor-3, and insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3 in renal cell carcinoma: Can these markers indicate poor prognosis in immunohistochemical examination? / O. Eronat, K. Olcay, O. Aykut et al. // *CCIJ.* – 2018. – Vol. 7 (1). – P. 14-22.

38. Escudier, B. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma / B. Escudier, T. Eisen, W.M. Stadler et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 356. – P. 125-134.

39. Escudier, B. AVOREN Trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial / B. Escudier, A. Pluzanska, P. Koralewski et al. // *Lancet.* – 2007. – Vol. 370, N (9605). – P. 2103-2111.

40. Eswarakumar, V. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors / V. Eswarakumar, I. Lax, J. Schlessinger // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2005. – Vol. 16. – P. 139-149.

41. Figlin, R.A. Overall survival with sunitinib versus interferon alfa as first-line treatment in metastatic renal-cell carcinoma. ASCO Annual Meeting Proceedings 2008 / R.A. Figlin, T.E. Hutson, P. Tomczac et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, Suppl. – P. 5024.

42. Florkiewicz, R.Z. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway / R.Z. Florkiewicz, R.A. Majack, R.D. Buechler et al. // *J. Cell Physiol.* – 1995. – Vol. 162. – P. 388-399.

43. Florkiewicz, R.Z. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons / R.Z. Florkiewicz, A. Sommer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 3978-3981.
44. Frödin, M. Perivascular PDGFR- $\beta$  is an independent marker for prognosis in renal cell carcinoma / M. Frödin, A. Mezheyeuski, S. Corvigno et al. // Br. J. Cancer. – 2017. – Vol. 116(2). – P. 195-201. doi: 10.1038/bjc.2016.407.
45. Fujimoto, K. Basic fibroblast growth factor as a candidate tumor marker for renal cell carcinoma / K. Fujimoto, Y. Ichimori, H. Yamaguchi et al. // Jpn. J. Cancer Res. – 1995. – Vol. 86. – P. 182-186.
46. Gerlinger, M. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing / M. Gerlinger, A.J. Rowan, S. Horswell et al. // N. Engl. J. Med. – 2012. – Vol. 366(10). – P. 883-892.
47. Gleave, M. Acceleration of human prostate cancer growth *in vivo* by factors produced by prostate and bone fibroblasts / M. Gleave, J.T. Hsieh, C.A. Gao et al. // Cancer Res. – 1991. – Vol. 51. – P. 3753-3761.
48. Gore, M.E. Safety and efficacy of sunitinib for metastatic renal-cell carcinoma: an expanded-access trial / M.E. Gore, C. Szczylik, C. Porta et al. // Lancet Oncol. – 2009. – Vol. 10. – P. 757.
49. Groothuis, A. Mechanical stimulation of the pro-angiogenic capacity of human fracture haematoma: involvement of VEGF mechano-regulation / A. Groothuis, G.N. Duda, C.J. Wilson et al. // Bone. – 2010. – Vol. 47(2). – P. 438-444.
50. Gualandris, A. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases / A. Gualandris, M. Rusnati, M. Belleri et al. // Cell Growth Differ. – 1996. – Vol. 7. – P. 147-160.
51. Guislain, L. Cancer Immunology & Immunotherapy 2008: From Discovery to Development to Drug. Cancer Immun. – 2008. – Vol. 8(Suppl 2). – P.1-27.

52. Guo, P. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment / P. Guo, B. Hu, W. Gu et al. // *Am. J. Pathol.* – 2003. – Vol. 162. – P. 1083-1093.

53. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144(5). – P. 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013

54. Heath, V.L. Anticancer strategies involving the vasculature / V.L. Heath, R. Bicknell // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 6(7). – P. 395-404. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.52

55. Heng, D.Y. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factortargeted agents: results from a large, multicenter study / D.Y. Heng, W. Xie, M.M. Regan et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 5794-5799.

56. Hermanson, M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: Expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops / M. Hermanson, K. Funa, M. Hartman et al. // *Cancer Res.* 1992. – Vol. 52. – P. 3213-3219.

57. Ho, T.H. The impact of FGFR1 and FRS2 $\alpha$  expression on sorafenib treatment in metastatic renal cell carcinoma / T.H. Ho, X. Liu, Y. Huang et al. // *BMC Cancer.* – 2015. – Vol. 15. – P. 304.

58. Hoeben, A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben, B. Landuyt, M.S. Highley et al. // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – Vol. 56(4). – P. 549-580. DOI: 10.1124/pr.56.4.3

59. Holden, S.N. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer / S.N. Holden, W.F. Novotny, G.D. Frantz et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 217-227.

60. Holmes, K. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signaling and therapeutic inhibition / K. Holmes, O.L. Robert, A.M. Thomas et al. // *Cell Signal.* – 2007. – Vol. 10. – P. 2003-2012. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.05.013.
61. Horstmann, M. Correlation of bFGF expression in renal cell cancer with clinical and histopathological features by tissue microarray analysis and measurement of serum levels / M. Horstmann, A.S. Merseburger, E. von der Heyde et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 131(11). – P. 715-722.
62. Hsieh, J.J. Renal cell carcinoma / J.J. Hsieh, M.P. Purdue, S. Signoretti et al. // *Nat. Rev. Dis. Primers.* – 2017. – Vol. 3. – P. 17009.
63. Hutson, T.E. A phase Ib clinical trial of the multitargeted kinase inhibitor lenvatinib (E7080) in combination with everolimus for treatment of metastatic renal cell carcinoma (RCC) / T.E. Hutson, J.M. Larkin, A. Gold et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31, Suppl. 6. – P. 358.
64. Iacovelli, R. Relationship and Predictive Role of the Dual Expression of FGFR and IL-8 in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Targeted Agents / R. Iacovelli, M. De Tursi, C. Mosillo et al. // *Anticancer Res.* – 2018. – Vol. 38 (5). – P. 3105-3110.
65. Ibrahimi, O.A. Proline to arginine mutations in FGF receptors 1 and 3 result in Pfeiffer and Muenke craniosynostosis syndromes through enhancement of FGF binding affinity / O.A. Ibrahimi, F. Zhang, A.V. Eliseenkova et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2004. – Vol. 13. – P. 69-78.
66. Ibrahimi, O.A. Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly / O.A. Ibrahimi, F. Zhang, S.C. Hrstka et al. // *Biochemistry (Mosc).* – 2004. – Vol. 43. – P. 4724-4730.
67. Iwasaki, J. FIP1L1 presence in FIP1L1-RARA or FIP1L1-PDGFR $\alpha$  differentially contributes to the pathogenesis of distinct types of leukemia / J. Iwasaki, T. Kondo, S. Darmanin et al. // *Ann. Hematol.* – 2014. – Vol. 93(9). – P. 1473-1481.

68. Jacobsen, J. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma / J. Jacobsen, K. Grankvist, T. Rasmuson et al. // *BJU Int.* – 2004. – Vol. 93. – P. 297-302.
69. Javerzat, S. The role of fibroblast growth factors in vascular development / S. Javerzat, P. Auguste, A. Bikfalvi // *Trends Mol. Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 483-489.
70. Jonasch, E. Phase II presurgical feasibility study of bevacizumab in untreated patients with metastatic renal cell carcinoma / E. Jonasch, C. Wood, S. Matin et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 4076-4081.
71. Jubb, A.M. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer / A.M. Jubb, H.I. Hurwitz, W. Bai et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 217-227.
72. Karajannis, M.A. Activation of FGFR1beta signaling pathway promotes survival, migration and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells / M.A. Karajannis, L. Vincent, R. Drenth et al. // *Leukemia.* – 2006. – Vol. 20. – P. 979-986.
73. Kirkali, Z. A Critical Analysis of Surgery for Kidney Cancer with Vena Cava Invasion / Z. Kirkali, H. Van Poppel // *Eur. Urol.* – Vol. 52. – P. 658-662.
74. Kluger, H. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells / H. Kluger, S. Siddiqui, C. Angeletti et al. // *Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 88. – P. 962-972. doi:10.1038/labinvest.2008.65.
75. Kopan, R. Notch signaling / R. Kopan // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2016. – Vol. 8(7). DOI: 10.1101/cshperspect.a011213
76. Kopecký, O. Phenotype analysis of tumour-infiltrating lymphocytes and lymphocytes in peripheral blood in patients with renal carcinoma / O. Kopecký, S. Lukesová, V. Vroblová et al. // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2007. – Vol. 50(3). – P. 207-212.



77. Korc, M. The role of fibroblast growth factors in tumor growth / M. Korc, R.E. Friesel // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2009. – Vol. 9. – P. 639.
78. Kowalczyk, D. Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma / D. Kowalczyk, W. Skorupski, Z. Kwias et al. // *Br. J. Urol.* – 1997. – Vol. 80(4). – P. 543-547.
79. Krock, B.L. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil / B.L. Krock, N. Skuli, M.C. Simon // *Genes & Cancer*. – 2011. – Vol. 2(12). – P. 1117-1133. DOI: 10.1177/1947601911423654.
80. Kusuda, Y. Prognostic prediction in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sorafenib based on expression levels of potential molecular markers in radical nephrectomy specimens / Y. Kusuda, H. Miyake, H.M. Behnsawy et al. // *Urol. Oncol.* – 2013. – Vol. 31(1). – P. 42-50. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.09.008.
81. Lawindy, S.M. Important surgical considerations in the management of renal cell carcinoma (RCC) with inferior vena cava (IVC) tumour thrombus / S.M. Lawindy, T. Kurian, T. Kim et al. // *BJU Int.* – 2012. Vol. 110(7). – P. 926-939.
82. Leendders, W.P.J. Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. / W.P.J. Leendders, B. Kusters, R.M.W. de Waal // *Endothelium: J Endothelial. Cell Research*. – 2002. – Vol. 9(2). – P. 83-87.
83. Lkhagvadorj, S. Expression Relates to Fuhrman Nuclear Grade of Clear Cell Renal Cell Carcinoma / S. Lkhagvadorj, S.O. Sung, L. Mi-Ra et al. // *J. Lifestyle Med.* – 2014. – Vol. 4(1). – P. 64-70.
84. Makanya, A.N. Intussuseptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling / A.N. Makanya, R. Hushchuk, V.G. Djnov // *Angiogenesis*. – 2009. – Vol. 12(2). – P. 113-123. DOI: 10.1007/s10456-009-9129-5
85. Minardi, D. Tumor VEGF expression correlates with tumor stage and identifies prognostically different groups in patients with clear cell renal cell carcinoma / D. Minardi, M. Santoni, G. Lucarini et al. // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. – 2015. – Vol. 33, Issue 3. – P. 113.e1-113.e7.

86. Minardi, D. M. VEGF Expression and Response to Sunitinib in Patients with Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma / D. Minardi, G. Lucarini, M. Santoni et al. // *Anticancer Res.* November. – 2013. – Vol. 33, N 11. – P. 5017-5022.
87. Motzer, R.J. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma / R.J. Motzer, K. Penkov, J. Haanen et al. // *N. Eng. J. Med.* – 2019. – Vol. 380(12). – P. 1103-1115.
88. Motzer, R.J. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma / R.J. Motzer, T.E. Hutson, D. Cella et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369(8). – P. 722-731.
89. Motzer, R.J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma / R.J. Motzer, M. Mazumdar, J. Bacik et al. // *J. Clin. Oncol.* 1999. – Vol. 17. – P. 2530-2540.
90. Murphy, K.A. Exploiting natural anti-tumor immunity for metastatic renal cell carcinoma / K.A. Murphy, B.R. James, Y. Guan et al. // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2015. – Vol. 11(7). – P. 1612-1620.
91. Nagy, J.A. Heterogeneity of the tumor vasculature / J.A. Nagy, S.H. Chang, S.C. Shih et al. // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2010. – Vol. 36(3). – P. 321-331. doi: 10.1055/s-0030-1253454
92. Neufeld, G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors / G. Neufeld, T.G. Cohen, Z. Poltorak et al. // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13(1). – P. 9-22. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
93. Nishida, N. Angiogenesis in cancer / N. Nishida, H. Yano, T. Nishida et al. // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2006. – Vol. 2(3). – P. 213-219.
94. Onno, K. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* / K. Onno, M.F.B. Gebbink, E.E. Voest // *Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 1654(1). – P. 23-37. DOI: 10.1016/j.bbcan.2003.09.004
95. Ortega, N. Signal relays in the VEGF system / N. Ortega, H. Hutchings, J. Plouet // *Front Biosci.* – 1999. – Vol. 4. – P. D141-152.

96. Paule, B. Soluble isoforms of vascular endothelial growth factor are predictors of response to sunitinib in metastatic renal cell carcinomas / B. Paule, L. Bastien, E. Deslandes et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 19. – Vol. 5(5). – e10715. doi: 10.1371/journal.pone.0010715
97. Porta, C. Changes in circulating pro-angiogenic cytokines, other than VEGF, before progression to sunitinib therapy in advanced renal cell carcinoma patients / C. Porta, C. Paglino, I. Imarisio et al. // *Oncol*. – 2013. – Vol. 84(2). – P. 115-122.
98. Porta, C. Predictive value of baseline serum vascular endothelial growth factor and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in advanced kidney cancer patients receiving sunitinib / C. Porta, C. Paglino, M. De Amici et al. // *Kidney Int*. – 2010. – Vol. 77(9). – P. 809-815. doi: 10.1038/ki.2009.552.
99. Powers, C. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling / C. Powers, S. McLeskey, A. Wellstein // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2000. – Vol. 7. – P. 165-197.
100. Rabbani, F. Renal vein or inferior vena caval extension in patients with renal cortical tumors: impact of tumor histology / F. Rabbani, P. Hakimian, V. Reuter et al. // *J. Urol*. – 2004. – Vol. 172(3). – P. 1057-1061.
101. Rahimi, N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Frontiers in Bioscience?* / N. Rahimi // *Front Biosci*. – 2006. – Vol. 11. – P. 818-829.
102. Raica, M. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy / M. Raica, A.M. Cimpean // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2010. – Vol. 3(3). – P. 572-599.
103. Rak, J. Oncogenes as indicators of tumor angiogenesis / J. Rak, J. Filmus, G. Finkenzeller et al. // *Cancer Metastasis Rev*. – 1995. – Vol.14 (4). – P. 263-277. DOI: 10.1007/BF00690598

104. Rak, J. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth / J. Rak, J.L. Yu, G. Klement et al. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* – 2000. – Vol. 5(1). – P. 24-33. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00012.x
105. Rasmuson, T. Impact of serum basic fibroblast growth factor on prognosis in human renal cellcarcinoma / T. Rasmuson, K. Grankvist, J. Jacobsen et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 37(17). – P. 2199-2203.
106. Rini, B.I. Phase III AXIS trial for second-line metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Effect of prior first-line treatment duration and axitinib dose titration on axitinib efficacy / B.I. Rini, B.J. Escudier, M.D. Michaelson et al. // *J. Clin. Oncol.* –2012. – Vol. 30, Suppl. 5. – P. 354.
107. Rini, B.I. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206 / B.I. Rini, S. Halabi, J.E. Rosenberg et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2137-2143.
108. Rini, B.I. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma / B.I. Rini, E.R. Plimack, V. Stus et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2019. – Vol. 380. – P. 1116-1127.
109. Rini, B.I. Pembrolizumab (pembro) plus axitinib (axi) versus sunitinib as first-line therapy for metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Outcomes in the combined IMDC intermediate/poor risk and sarcomatoid subgroups of the phase 3 KEYNOTE-426 study. // B.I. Rini, E.R. Plimack, V. Stus et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 37(15), suppl. – abstr. 4500. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.4500
110. Rodemann, H.P. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. *In vitro* growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis / H.P. Rodemann, G.A. Muller // *Am. J. Kidney Dis.* – 1991. – Vol. 17. – P. 684-686.
111. Savagner, P. Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells /

P. Savagner, A.M. Valles, J. Jouanneau et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 1994. – Vol. 5. – P. 851-862.

112. Schodel, J. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer / J. Schodel, S. Grampp, E.R. Maher et al. // *Eur. Urol.* – 2016. – Vol. 69(4). – P. 646-657.

113. Shen, C. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma / C. Shen, W.J. Kaelin // *Semin. Cancer Biol.* – 2013. – Vol. 23(1). – P. 18-25.

114. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies / M. Shibuya // *Genes & Cancer.* – 2011. – Vol. 2(12). – P. 1097-1105. DOI: 10.1177/1947601911423031

115. Shuch, B. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity / B. Shuch, A. Amin, A.J. Armstrong et al. // *Eur. Urol.* – 2015. – Vol. 67(1). – P. 85-97.

116. Slaton, J.W. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma / J.W. Slaton, K. Inoue, P. Perrotte et al. // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 158. – P. 735-743.

117. Sobin, L.H. TNM classification of malignant tumours / L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. – Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2009.

118. Song, S.H. VEGF/VEGFR2 and PDGF-B/PDGFR- $\beta$  expression in non-metastatic renal cell carcinoma: a retrospective study in 1,091 consecutive patients / S.H. Song, I.G. Jeong, D. You et al. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2014. – Vol. 7. – P. 7681-7689.

119. Sternberg, C.N. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial / C.N. Sternberg, I.D. Davis, J. Mardiak et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 1061-1068.

120. Stutfeld, E. Structure and function of VEGF receptors / E. Stutfeld, K. Ballmer-Hofer // *IUBMB Life.* – 2009. – Vol. 61. – P. 915-922. DOI: 10.1002/iub.234

121. Sulzbacher, I. Expression of platelet-derived growth factor- $\alpha\alpha$  receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma / I. Sulzbacher, P. Birner, M. Traxler et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2003. – Vol. 120. – P. 107-112.
122. Tanghetti, E. Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF2): recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts / E. Tanghetti, R. Ria, P. Dell'Era et al. // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 3889-3897.
123. Tawfik, O.W. Prognostic significance of CD44, platelet-derived growth factor receptor alpha, and cyclooxygenase 2 expression in renal cell carcinoma / O.W. Tawfik, B. Kramer, B. Shideler et al. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2007. – Vol. 131(2). – P. 261-267.
124. Tsimafeyev, I. Overexpression of fibroblast growth factor receptors FGFR1 and FGFR2 in renal cell carcinoma / I. Tsimafeyev, L. Demidov, E. Stepanova et al. // *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 2011. – Vol. 45(3). – P. 190-195.
125. Tsuchiya, N. Quantitative analysis of gene expressions of vascular endothelial growth factor-related factors and their receptors in renal cell carcinoma / N. Tsuchiya, K. Sato, T. Akao et al. // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 195. – P. 101-113.
126. Tudoran, O.M. PDGF beta targeting in cervical cancer cells suggest a fine-tuning of compensatory signalling pathways to sustain tumourigenic stimulation / O.M. Tudoran, O. Soritau, L. Balacescu et al. // *J. Cell Mol. Med.* – 2015. – Vol. 19(2). – P. 371-82. doi: 10.1111/jcmm.12449.
127. Turner, N. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer / N. Turner, R. Grose // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol.10. – P. 116-129.
128. Wagner, B. Prognostic value of renal vein (RV) and inferior vena cava (IVC) involvement in renal cell carcinoma (RCC) / B. Wagner, J.J. Patard, A. Méjean et al. // *Eur. Urol.* – 2007. – Vol. 6, Suppl. – P. 159.
129. Wang, W. Effect of platelet-derived growth factor-B on renal cell carcinoma growth and progression / W. Wang, L. Qi, M. Tan et al. // *Urol. Oncol.* – 2015. – Vol. 33(4). – P. 168.e17-27. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.12.015.

130. Welts, J.C. Fibroblast growth factor 2 regulates endothelial cell sensitivity to sunitinib / J.C. Welts, M. Gourlaouen, T. Powles, et al. // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30(10). – P. 1183-1193.

131. Yonemura, Y. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer / Y. Yonemura, Y. Endo, K. Tabata et al. // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 10(5). – P. 316-327. DOI: 10.1007/s10147-005-0508-7

132. Yu, P.J. Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age / P.J. Yu, G. Ferrari, A.C. Galloway et al. // *J. Cell. Biochem.* – 2007. – Vol. 100. – P. 1100-1108.

133. Zhang, F. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis / F. Zhang, Z. Tang, X. Hou, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106(15). – P. 6152-6157.

134. Zhang, X. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family / X. Zhang, O.A. Ibrahimi, S.K. Olsen et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 15694-15700.