

Диагностическое значение показателей ангиогенеза при раке почки

П.В. Глыбочко¹, Н.Б. Захарова², А.Н. Понукалин², Д.А. Дурнов², Н.К. Шахпазян²

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; ²Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского

Контакты: Денис Андреевич Дурнов dendurnov@mail.ru

Проведен анализ результатов исследования 130 пациентов с объемными образованиями почек, получавших лечение в ГКБ им. С.Р. Миротворцева. Выполнена оценка диагностической значимости метаболического онкомаркера TuM2Pк, матриксных металлопротеиназ (ММП) — ММП-9, ММП-3, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) и ангиогенных цитокинов — фактора некроза опухоли α, интерлейкинов (ИЛ) — ИЛ-8, ИЛ-12. Установлено, что наибольшее диагностическое значение при дифференциальной диагностике между опухолью почки и кистами почек, а также при стадировании опухолевого процесса по TNM имеет определение содержания в сыворотке крови ФРЭС.

Ключевые слова: рак почки, фактор роста эндотелия сосудов, онкомаркер TuM2Pк

Diagnostic value of angiogenesis rates in renal-cell carcinoma

P.V. Glybochko¹, N.B. Zacharova², A.N. Ponukalin², D.A. Durnov², N.K. Shachpazyan²

¹I.M. Sechenov First Moscow Medical University; ²Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovskiy

The results of research in 130 patients with space-occupying lesions of kidneys treated in MCH n.a. S.R. Mirotvorcev were analysed. The diagnostic significance of metabolic tumor marker TuM2Pк, matrix metalloproteinases MMP-9, MMP-3, vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic cytokines (TNF-α, IL-8, IL-12) was evaluated. It was determined that VEGF detection in blood serum has the most important diagnostic value in differential diagnosis between renal tumor and renal cyst and in TNM staging.

Key words: renal carcinoma, vascular endothelial growth factor, tumormarker TuM2Pк

Введение

Почечно-клеточный рак (ПКР) представляет в настоящее время одну из наиболее важных проблем онкоурологии в связи с ежегодно возрастающими показателями заболеваемости [1–3].

В России по темпам прироста рак почки (РП) занимает 1-е место (41,35%) в общей популяции, 2-е место (42,94%) после рака предстательной железы у мужчин. В 2008 г. в нашей стране диагностировано 17 653 больных РП, при этом показатель смертности от этого заболевания достиг 8370 [4].

Примерно у 25–33% больных к моменту установления диагноза выявляются отдаленные метастазы и у 30–40% возникает рецидив болезни после выполнения радикальной операции [5–7].

Уровень поздней диагностики РП в 3 раза выше, чем при других урологических новообразованиях. У многих пациентов РП обнаруживают случайно во время профилактического ультразвукового исследования (УЗИ), и это является неожиданностью как для больного, так и для врача [4, 8–10].

За последние годы производились попытки использования многих опухолевых маркеров при РП, таких как SCC, СА 125, СЕА, СА 19-9, СА 15-3, однако значимость ни одного из них не подтверждена в связи с низкой чувствительностью и специфичностью.

Наиболее значимым из онкомаркеров в настоящее время представляется метаболический онкомаркер TuM2Pк. Первые исследования данного маркера были проведены у больных РП. G.M. Oremek и соавт. [1, 11] опубликовали результаты, показавшие четкие различия между значениями TuM2Pк у больных РП и у пациентов с воспалительными заболеваниями почек. В последующем была показана высокая чувствительность данного онкомаркера при раке легкого, раке поджелудочной и молочной железы [2].

В 2006 г. А.В. Серегин и В.В. Мовсесян исследовали диагностическую значимость опухолевого маркера TuM2Pк при новообразованиях почки. Полученные результаты свидетельствуют о возможности и целесообразности применения TuM2Pк в диагностике ПКР. Его чувствительность составляет 80,1%, а специфичность — 85,2%. Также выявлена высокая специфичность в отношении пациентов с доброкачественными опухолями и кистами почек [12].

Цель исследования — проведение сравнительного анализа диагностической специфичности различных биомаркеров у больных РП.

Материалы и методы

В исследование были включены 75 первичных пациентов с РП (1-я группа), 25 больных с кистами по-

Таблица 1. Распределение обследованных лиц по полу и возрасту

Параметр	Практически здоровые лица	Больные с кистами почек	Больные РП стадии T1	Больные РП стадии T2	Больные РП стадии T3
Пол:					
мужской	18	11	14	13	16
женский	12	14	11	12	9
Возраст, лет:					
< 50	30	12	4	6	4
50–59	0	10	14	14	6
> 60	0	3	7	5	15

чек (2-я группа) и 30 доноров (3-я группа), всего 130 наблюдаемых.

Распределение обследованных пациентов по полу и возрасту представлено в табл. 1.

Всем больным с целью дифференциальной диагностики, а также с целью стадирования РП производились следующие исследования: УЗИ почек, обзорная и экскреторная урография — у всех, магнитно-резонансная томография (МРТ) — у 54% наблюдаемых, компьютерная томография (КТ) или мультиспиральная КТ почек как с контрастированием, так и без такового — у 46%.

Степень дифференцировки опухоли (Fuhrman grade) установлена у всех больных РП: G1 — у 22 (29,3%), G2 — у 29 (38,8%), G3 — у 19 (25,3%), G4 — у 5 (6,6%) пациентов.

Определение содержания исследуемых биомаркеров при РП проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа:

- в сыворотке крови — фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), матриксные металлопротеиназы (ММП): ММП-9, ММП-3;
- в плазме крови — TuM2Pк;
- во фракции мононуклеаров — интерлейкин (ИЛ): ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО-α.

Уровень TuM2Pк оценивали в плазме крови с помощью тест-системы ScheBo® TuM2Pк (ScheBo-Biotech, Германия). Результаты выражали в ед/мл.

Содержание ФНО-α, ИЛ-8 и ФРЭС в сыворотке крови определяли с помощью наборов реактивов фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск). Исследование уровня ИЛ-12, ММП-9 и ММП-3 в сыворотке крови производили наборами реактивов фирмы «Биосорс» (Biosource, Бельгия). Результаты выражали в пг/мл.

Для математического и статистического анализа полученных результатов использовались пакеты компьютерных программ Statistica v6.0 (StatSoft Inc.), SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc.), Microsoft Office Excel 2007.

Эффективность диагностики РП по анализу чувствительности и специфичности оценивалась с по-

мощью построения характеристической кривой (ROC-анализ) при разных точках разделения значений лабораторных показателей.

Для выявленных методом ROC-анализа эффективных диагностических показателей построены кривые зависимости чувствительности и специфичности от уровня точки отсечения. Для выделенных эффективных диагностических тестов предложены точки отсечения, соответствующие максимально возможной чувствительности и специфичности выявления РП.

Результаты

Результаты исследования изменения уровня онкомаркеров и показателей ангиогенеза у больных РП представлены в табл. 2, 3 и на рис. 1–6.

У больных РП стадии pT3 наблюдался значимый подъем уровня ангиогенных цитокинов ФРЭС, ИЛ-12 и ММП-9 по сравнению с ФНО-α, ИЛ-8 и ММП-3. Одновременно увеличивалось содержание TuM2Pк. У доноров и пациентов с кистами почек этот показатель находился в пределах нормы (15,2 и 15,6 ед/мл соответственно). В 1-й группе больных РП среднее значение этого маркера значительно превышало дискриминационный уровень и составило 47,6 ед/мл (при I стадии — 36,2 ед/мл, при II стадии — 35,5 ед/мл и при III стадии — 71,1 ед/мл).

Представленные данные свидетельствуют о высокой специфичности (70%) и чувствительности (80%) TuM2Pк при РП (см. рис. 1).

Среднее значение и доля TuM2Pк-положительных случаев у больных с разными стадиями опухолевого процесса увеличивается с повышением стадии. Так, при I стадии заболевания доля TuM2Pк-положительных случаев составляет 67%, при II — 77%, а при III — 91%.

У доноров и пациентов с кистами почек показатели ИЛ-12 также находились на уровне 19,08 и 35,5 пг/мл соответственно, тогда как в 1-й группе среднее значение этого маркера значительно превы-

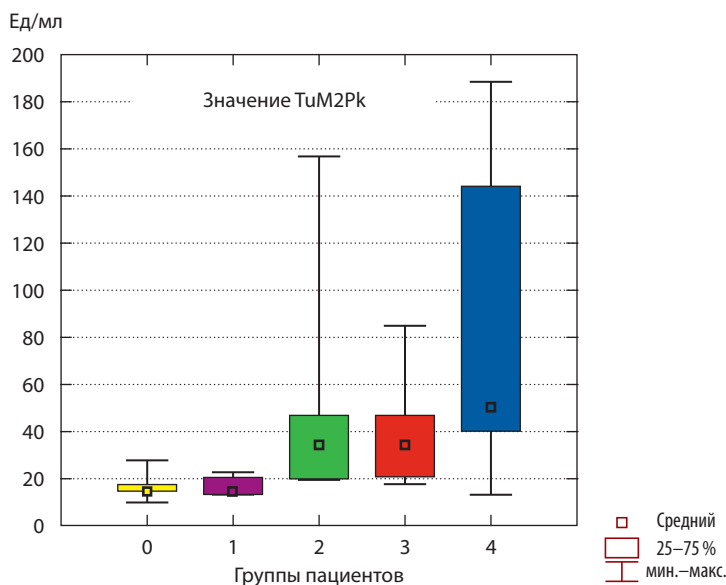


Рис. 1. Содержание метаболического онкомаркера TuM2Pk в плазме крови у больных с новообразованиями почек

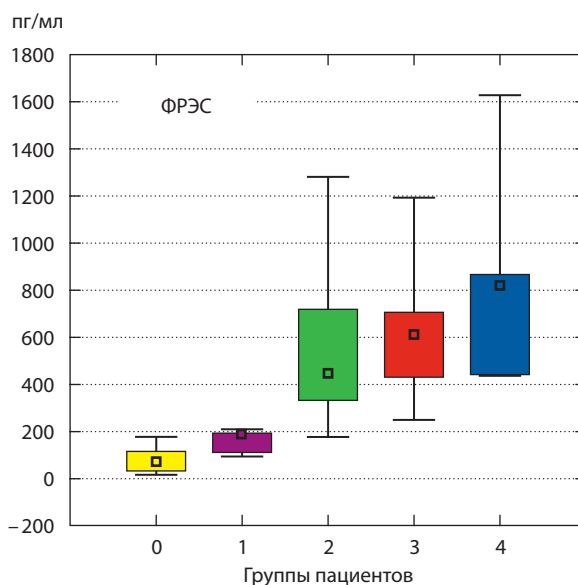


Рис. 3. Содержание ФРЭС в сыворотке крови у больных с новообразованиями почек

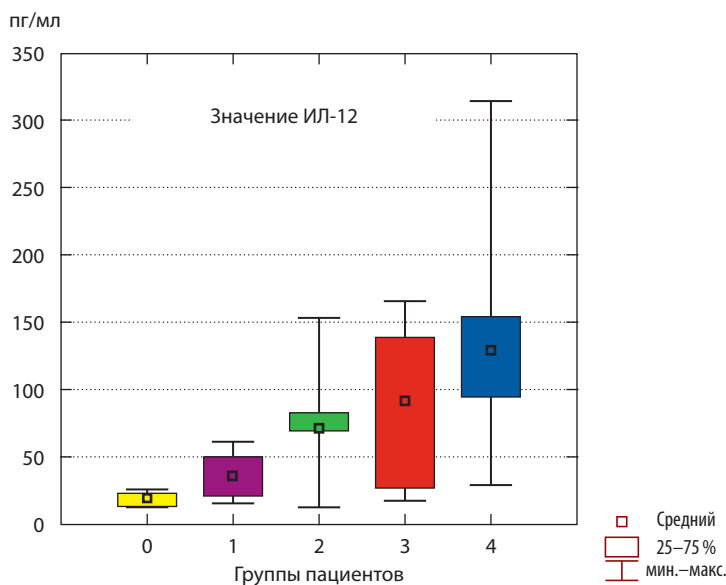


Рис. 2. Содержание антиангиогенного цитокина ИЛ-12 в сыворотке крови у больных с новообразованиями почек

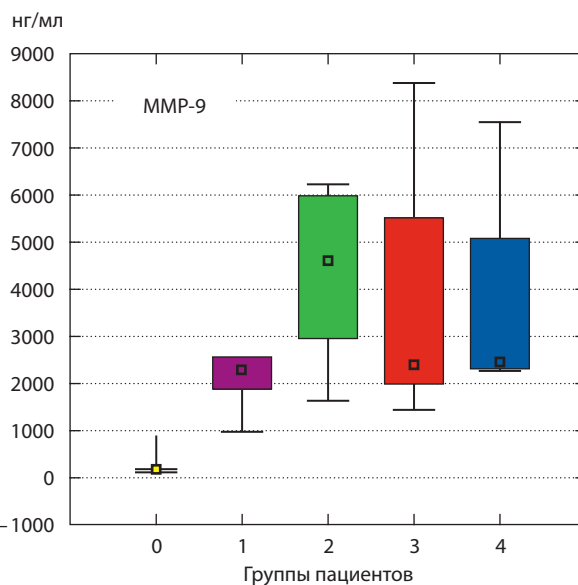


Рис. 4. Содержание MMP-9 в сыворотке крови у больных с новообразованиями почек

На рис. 1 — 4:

- Контрольная группа
- Пациенты с кистами почек
- Пациенты с РП T1
- Пациенты с РП T2
- Пациенты с РП T3

шало уровень — 77,8 пг/мл (при I стадии — 73,9 пг/мл, при II стадии — 87,2 пг/мл, при III стадии — 128,8 пг/мл; см. рис. 2).

Чувствительность маркера составила 79,6%, специфичность — 85,3%.

У всех пациентов с РП в сыворотке крови увеличивалось содержание ФРЭС. У доноров и пациентов с кистами почек его уровень находился на уровне 78,9 и 158,0 пг/мл соответственно, в 1-й группе среднее значение данного маркера значительно превышало

этот уровень и составило 649,3 пг/мл (при I стадии — 546,4 пг/мл при II стадии — 593,6 пг/мл, при III стадии — 810,8 пг/мл; см. рис. 3).

Чувствительность метода составила 91%, специфичность — 86%.

Среднее значение уровня MMP-9 у доноров составило 156 нг/мл, у пациентов с кистами оно не превышало 2083 нг/мл, при I стадии заболевания — 4360 нг/мл, при II стадии — 3697 нг/мл, при III стадии — 3671 нг/мл (см. рис. 4).

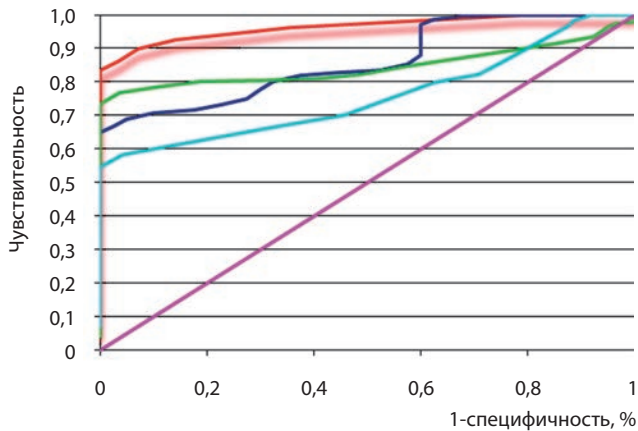


Рис. 5. Чувствительность и специфичность маркеров TuM2Pк, ИЛ-12, ФРЭС, ММР-9 у пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями почек (кисты к РП T1–2)

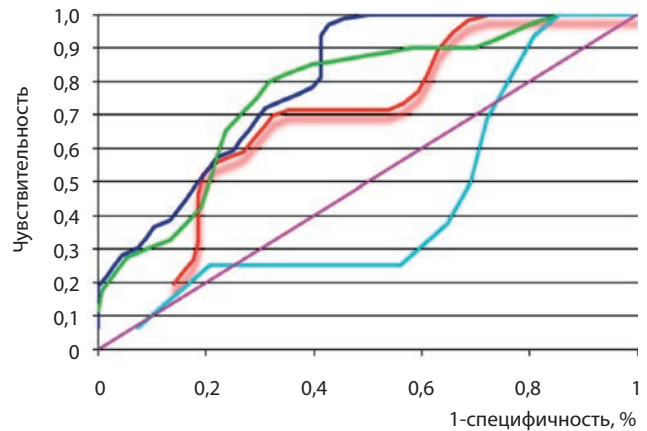


Рис. 6. Чувствительность и специфичность маркеров TuM2Pк, ИЛ-12, ФРЭС, ММР-9 у пациентов с РП (стадия T1–2 к T3)

На рис. 5, 6: — ТуM2Pк; — ИЛ-12; — ФРЭС; — ММР-9; — $x = y$.

Значимых изменений содержания ИЛ-8, ФНО- α и ММР-3 в сыворотке крови у больных всех 3 групп не выявлено.

Результаты позволяют заключить, что онкомаркеры TuM2Pк, ИЛ-12, ММР-9 и ФРЭС могут рассматриваться как показатели при определении стадии РП.

В табл. 2 приведены данные о чувствительности и специфичности значимых, на наш взгляд, маркеров, исходя из результатов исследования. Следует отметить, что при стадии pT1 чувствительность и специфичность показателей определялась по отношению к пациентам с кистами почек, а при стадиях pT2 и pT3 по отношению к таковым при стадии pT1.

В табл. 3 приведены результаты чувствительности и специфичности значимых, на наш взгляд, маркеров, исходя из результатов исследования. Оценка чувствительности и специфичности показателей определялась по отношению к донорам.

Однако не все из представленных маркеров имели одинаковую чувствительность при определении стадии опухолевого процесса (см. рис. 6).

Так, маркер ММР-9 продемонстрировал низкую диагностическую значимость при стадировании опухолевого процесса. Однако такие показатели, как TuM2Pк, ИЛ-12 и ФРЭС, по результатам ROC-анализа способны реагировать на степень инвазии опухолевого процесса (см. рис. 6).

Обсуждение

В настоящее время особенно активно исследуется неоангиогенез при онкологических заболеваниях, прежде всего при РП.

Гипотеза неоангиогенеза была высказана J. Folkman. В отсутствие кровоснабжения кислород и питательные вещества поступают в опухоль благодаря диф-

фузии и обычно новообразования имеют в диаметре не более 1–2 мм. В опухоли, не имеющей сосудов, темпы роста клеток равны темпам их гибели, поэтому опухоль остается в «спящем» состоянии до тех пор, пока в ней не начнется рост кровеносных сосудов из близлежащих капилляров — процесс, известный под названием ангиогенеза. Начало ангиогенеза («ангиогенное переключение») ведет к формированию нового кровоснабжения и способствует быстрому росту и метастазированию опухоли, благодаря чему она активизируется [13–16].

Опухоли передают свои сигналы о потребности в кровоснабжении путем секреции ростовых факторов, запускающих ангиогенез. Хотя в опухолевом ангиогенезе участвует много ростовых факторов, установлено, что ФРЭС — мультифункциональный цитокин, самый мощный доминирующий медиатор этого процесса [12,16].

После секреции опухолью ФРЭС связывается с рецепторами на близлежащих сосудистых эндотелиальных клетках, непосредственно стимулируя рост новых сосудов. ФРЭС также играет ключевую роль в поддержании функционирования недавно сформировавшихся кровеносных сосудов опухоли, которые сохраняют черты незрелости даже по мере своего роста [15,17].

Изучение молекулярных механизмов ангиогенеза привело к обнаружению про- и антиангиогенных факторов, динамический баланс которых обеспечивает формирование и развитие новых сосудов внутри опухоли. Основным активатором ангиогенеза считают ФРЭС, вызывающий пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Кроме того, ФРЭС активирует урокиназу и коллагеназу, в результате чего происходит лизис эндотелиального матрикса и повышается спо-

Таблица 2. Специфичность и чувствительность величин биомаркеров у пациентов с РП и кистами почек

Показатель	Значение показателей	Специфичность, %	Чувствительность, %
Пациенты с pT1			
TuM2Pк, ед/мл	31,6	79,8	70,3
ИЛ-12, пг/мл	55,7	85	80
ФРЭС, пг/мл	198	79,4	93,7
ММР-9, нг/мл	2554	83,3	88,8
Пациенты с pT2			
TuM2Pк, ед/мл	39,4	62,5	41,1
ИЛ-12, пг/мл	83,2	80	57
ФРЭС, пг/мл	455	56,25	74,7
ММР-9, нг/мл	43,25	44,5	55,5
Пациенты с pT3			
TuM2Pк, ед/мл	46,1	70	75
ИЛ-12, пг/мл	102,8	64	75
ФРЭС пг/мл	633	72,7	71,4
ММР-9, нг/мл	5213	75	25

Таблица 3. Специфичность и чувствительность величин биомаркеров у пациентов с РП и у практически здоровых лиц

Показатель	Значение показателей	Специфичность, %	Чувствительность, %
Пациенты с pT1			
TuM2Pк, ед/мл	26,3	85,7	62,5
ИЛ-12, пг/мл	24,6	80	92
ФРЭС, пг/мл	174	87,5	93,7
ММР-9, нг/мл	2245	88,8	90,9
Пациенты с pT2			
TuM2Pк, ед/мл	26,4	76,4	71,4
ИЛ-12, пг/мл	24,46	96,8	85,7
ФРЭС, пг/мл	268	96,3	90,1
ММР-9, нг/мл	2089	92,8	85,3
Пациенты с pT3			
TuM2Pк, ед/мл	40,28	96,8	94,7
ИЛ-12, пг/мл	27,1	96,8	97
ФРЭС пг/мл	437	98,8	90,1
ММР-9, нг/мл	5058	92,8	94,5

способность опухолевых клеток к инвазии и метастазированию. К. Sato и соавт. (1999) изучали содержание уровней ФРЭС у больных ПКР. Было установлено, что при уровне сывороточного ФРЭС > 100 пг/мл чувствительность маркера при РП составляла 80%, специфичность — 72,7%. Авторы предположили, что ФРЭС может служить маркером РП [13]. В работах М.Ф. Трапезниковой, П.В. Глыбина, Н.Е. Кушлинского и др. отмечено, что в опухолевой ткани при РП уровни ФРЭС более высокие по сравнению с неизменной тканью почки. При этом уровень ФРЭС в опухоли достоверно повышался при снижении степени дифференцировки клеток рака и увеличении показателя pT первичной опухоли [18].

В настоящее время наиболее эффективный метод лечения РП — хирургический. Однако при распространенных формах заболевания данный метод ограничен паллиативной нефрэктомией и удалением со-

литарных метастазов различных локализаций. Единственная возможность улучшить прогноз у пациентов с неоперабельным местно-распространенным и диссеминированным РП — это системное лечение.

В течение длительного времени в качестве стандартного подхода к лечению метастазирующего РП использовали иммунотерапию, дававшую эффект лишь у небольшого процента больных. Благодаря последним достижениям в области молекулярной биологии был выявлен ряд путей передачи сигнала в патогенезе развития и прогрессирования ПКР, возникла идея создания так называемых таргетных препаратов, специфически ингибирующих эти пути. В настоящее время для лечения распространенного РП применяют таргетные препараты 3 групп: 1) тирозинкиназные (мультикиназные) ингибиторы — сорафениб (Нексавар) и сунитиниб (Сутент); 2) ингибиторы mTOR — темсиrolimus (Торисел) и эверолимуc; 3) моноклональные

антитела — бевацизумаб (Авастин), применяемый в комбинации с интерфероном α -2a.

Однако до настоящего времени нет такого маркера, который бы служил надежным критерием в оценке эффективности лечения препаратом. Результаты исследований последних лет, направленные на изучение содержания ФРЭС, говорят о возможном его использовании в клинической практике как маркера опухолевого роста при РП.

Заключение

Установленные высокие уровни в сыворотке крови ключевого ангиогенного цитокина ИЛ-12, ФРЭС

и MMP-9 у больных РП подтверждают высокий ангиогенный потенциал РП и биологическую роль ангиогенеза в росте и развитии злокачественных новообразований.

TuM2Pк, ИЛ-12 и ФРЭС согласно результатам ROC-анализа способны реагировать на степень инвазии опухолевого процесса и могут рассматриваться как показатели, имеющие значение в определении стадии опухолевого процесса при РП.

Наиболее высокая чувствительность и специфичность ФРЭС при диагностике опухолевого процесса позволяет предложить использование данного показателя для определения стадии РП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
2. Skinner D.G., Colvin R.B., Vermilion C.D. et al. Diagnosis and anagement of renal cell carcinoma. *Cancer* 1971;28:1165–77.
3. Weyman P.J., McClennan B.L., Stanley R.J. et al. Comparison of CT and angiography in the evaluation of renal cell carcinoma. *Radiology* 1980; 137:417–24.
4. Злокачественные новообразования в России в 2008 году. Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2010.
5. Клиническая онкоурология. Под ред. Б.П. Матвеева. М.: Вердана, 2003. 716 с.
6. Cohen H.T., McGovern F.J. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2477–90.
7. Parton M., Gore M., Eisen T. Role of cytokine therapy in 2006 and beyond for metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5584–92.
8. Аляев Ю.Г., Крапивин А.А. Резекция почки при раке. М.: Медицина, 2001. 222 с.
9. Ахмедов Б.П. Метастатические опухоли. М.: Медицина, 1984. 46 с.
10. Чиссов В.И., Старинский В.В., Ременник Л.В. Основные показатели состояния онкологической помощи населению Российской Федерации в 1994 году. М., 1995. 163 с.
11. Oremek G.M., Teigelkamp S., Kramer W. et al. The pyruvate kinase isoenzyme Tumor M2 (TuM2Pк) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:2599–602.
12. Мовсесян В.В. Диагностическая значимость опухолевого маркера TuM2Pк при новообразованиях почки. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2006.
13. Sato K., Tsuchiya N., Sasaki R et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(8):874–9.
14. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 2000;5:11:3–10.
15. Motzer R.J., Michaelson M.D., Redman B.G. et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:16–24.
16. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401–10.
17. Oremek G.M., Bickeboller R., Seiffert U.B. et al. Aussagekraft des neuen Tumormarkers Tumor M2-Pk bei Patientend mit Hodentumor
12. Symposium für Experimentelle Urologie. Berlin, 1995.
18. Трапезникова М.Ф., Глыбин П.В., Туманян В.Г. и др. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 2-го типа в сыворотке крови, опухоли и паренхиме почки больных почечно-клеточным раком. *Урология* 2010;4:3–7.
19. Schneider J., Schulze G. *Anticancer Res* 2003;23:5089–94.
20. Paradis V., Lagha N.B., Zeimoura L. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 436(4):351–6.
21. Kerbel R., Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:727–39.