

Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба у больных почечно-клеточным раком

М.И. Волкова¹, А.С. Ольшанская¹, И.В. Тимофеев², Н.Л. Вашакмадзе¹, Ю.А. Хоченкова¹,
Э.Ш. Соломко¹, С.А. Ашуба¹, Д.А. Хоченков^{1,3}, В.Б. Матвеев¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²АНО «Бюро по изучению рака почки»; Россия, 109147 Москва, переулок Маяковского, 2;

³ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет»; Россия, 445020 Тольятти, Белорусская ул., 14

Контакты: Мария Игоревна Волкова mivolkova@rambler.ru

Цель исследования – провести изучение экспрессии и прогностической значимости фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), фактора роста фибробластов 2 (FGF-2) и их рецепторов VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2, а также рецепторов фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGFR-α, PDGFR-β) в клетках парных образцов первичной опухоли и опухолевого тромба у больных почечно-клеточным раком (ПКР).

Материалы и методы. Экспрессию VEGF-A, FGF-2, VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR-α, -β изучали в парных операционных образцах опухоли почки и опухолевого тромба 25 больных светлоклеточным ПКР pT3a–T4N0–1M0–1, осложненным опухолевым венозным тромбозом, при помощи иммуногистохимического окрашивания с полуколичественной оценкой. Провели анализ корреляции выявленных уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ с характеристиками опухолевого процесса и оценку их влияния на исход ПКР.

Результаты. В цитоплазме и на мембране клеток первичной опухоли и опухолевого тромба у больных ПКР экспрессировались VEGF-A, FGF-2, а также VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR-α, -β. Клетки опухолевого тромба характеризовались более низкой экспрессией VEGFR-1, -2, PDGFR-α ($p < 0,05$ для всех) и тенденцией к более низкой экспрессии VEGF-A ($p = 0,060$), FGF-2 ($p = 0,046$), FGFR-1 ($p = 0,077$) и FGFR-2 ($p = 0,090$) по сравнению с клетками первичной опухоли почки. Была выявлена прямая корреляция между степенью дифференцировки G и уровнями экспрессии VEGFR-1 ($p = 0,035$) и FGFR-1 ($p = 0,022$) в клетках первичной опухоли, а также между инвазией опухолевого тромба в венозную стенку и уровнями экспрессии VEGFR-1 ($p = 0,023$) и FGFR-2 ($p = 0,005$) на клетках тромба. Было отмечено неблагоприятное влияние на общую выживаемость (ОВ) больных ПКР гиперэкспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли ($p = 0,011$), а также тенденция к снижению ОВ при гиперэкспрессии VEGFR-2 ($p = 0,093$) и гипоекспрессии VEGF-A ($p = 0,095$) в клетках опухолевого тромба. Однолетняя ОВ пациентов с ≥ 2 выделенными факторами риска – 27,3 %, < 2 факторами риска – 87,5 % ($p = 0,004$).

Заключение. Клетки опухолевого тромба у больных ПКР экспрессируют VEGF-A, FGF-2, VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR-α, -β менее активно, чем клетки первичной опухоли. Гиперэкспрессия ростовых факторов и тирозинкиназ коррелирует со степенью дифференцировки G и инвазией венозной стенки. Гиперэкспрессия VEGFR-2 в первичной опухоли и тромбе в сочетании с гипоекспрессией VEGF-A в тромбе ассоциирована со снижением ОВ.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, опухолевый венозный тромбоз, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), рецепторы VEGFR-1, -2, FGFR-1, -2, рецепторы фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGFR-α, PDGFR-β)

Для цитирования: Волкова М.И., Ольшанская А.С., Тимофеев И.В. и др. Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого тромба у больных почечно-клеточным раком. Онкоурология 2020;16(1):17–26.

DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-1-17-26



Expression of growth factors and tyrosine kinase receptors in the primary tumor and tumor thrombus cells in patients with renal cell carcinoma

M.I. Volkova¹, A.S. Olshanskaya¹, I.V. Tsimafejev², N.L. Vashakmadze¹, Yu.A. Khochenkova¹, E.Sh. Solomko¹,
S.A. Ashuba¹, D.A. Khochenkov^{1,3}, V.B. Matveev¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Kidney Cancer Research Bureau; 2 Pereulok Mayakovskogo, Moscow 109147, Russia;

³Togliatti State University; 14 Belorusskaya St., Togliatti 445020, Russia

Objective: to assess the expression and prognostic value of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), fibroblast growth factor 2 (FGF-2) and their receptors VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2, as well as platelet-derived growth factor receptors (PDGFR- α , PDGFR- β) in paired samples of primary tumors and tumor thrombi in renal cell carcinoma (RCC).

Materials and methods. Expression of VEGF-A, FGF-2, VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR- α , - β was studied in paired surgical samples of primary tumors and tumor thrombi in 25 patients with clear cell RCC pT3a–T4N0–1M0–1 and tumor venous thrombosis by immunohistochemical assay using the appropriate Abcam/Santa Cruz Biotech antibodies from the immunohistochemical staining kit Invitrogen. Expression levels were evaluated by a semi-quantitative method (H-score). The analysis of the correlation between expression levels of VEGF-A, FGF-2, VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR- α , - β and RCC characteristics, as well as evaluation of their influence on the outcome of RCC were performed.

Results. VEGF-A, FGF-2, as well as VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR- α , - β were expressed in the cytoplasm and on the membrane of the primary tumor and tumor thrombus cells in RCC patients. Tumor thrombus cells were characterized by lower expression of VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR- α ($p < 0.05$ for all) and tendency to lower expression of VEGF-A ($p = 0.060$), FGF-2 ($p = 0.046$), FGFR-1 ($p = 0.077$) and FGFR-2 ($p = 0.090$) compared with primary tumor cells. RCC Furman grade correlated with the expression levels of VEGFR-1 ($p = 0.035$) and FGFR-1 ($p = 0.022$) in the primary tumor cells, tumor invasion into venous wall correlated with the expression levels of VEGFR-1 ($p = 0.023$) and FGFR-2 ($p = 0.005$) on the thrombus cells. VEGFR-2 overexpression in the primary tumor cells was associated with significant decrease of overall survival (OS) rate ($p = 0.011$). There was a tendency to OS deterioration in cases with overexpression of VEGFR-2 ($p = 0.093$) and VEGF-A ($p = 0.095$) in the tumor thrombus cells. One-year OS in patients with ≥ 2 identified risk factors was 27.3 %, < 2 risk factors – 87.5 % ($p = 0.004$).

Conclusion. Tumor thrombus cells in RCC patients expressed VEGF-A, FGF-2, VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR- α , - β less active than the cells of the primary tumor. Overexpression of growth factors and tyrosine kinases correlated with RCC Furman grade and tumor venous wall invasion. Overexpression of VEGFR-2 in both primary tumor and thrombus cells in combination with hypoeexpression of VEGF-A in the thrombus negatively influenced on OS.

Key words: renal cell carcinoma, tumor venous thrombosis, vascular endothelial growth factor (VEGF-A), fibroblast growth factor 2 (FGF-2), VEGFR-1, -2 receptors, FGFR-1, -2, platelet-derived growth factor receptors (PDGFR- α , PDGFR- β)

For citation: Volkova M.I., Olshanskaya A.S., Tsimafeyu I.V. et al. Expression of growth factors and tyrosine kinase receptors in the primary tumor and tumor thrombus cells in patients with renal cell carcinoma. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2020;16(1):17–26. (In Russ.).

Введение

Специфической особенностью почечно-клеточного рака (ПКР) является способность к инвазии в венозную систему почки и распространению опухоли в крупные вены с формированием опухолевого тромбоза почечной вены, нижней полой вены (НПВ) 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 [1, 2]. Светлоклеточный вариант ПКР ассоциирован с наиболее высоким риском опухолевой венозной инвазии, реже тромбозы наблюдаются при хромофобном и папиллярном раке почки [3]. Опухолевые тромбы чаще всего являются флотирующими и фиксированы к стенке НПВ только в области устья почечной вены [4, 5]. Однако у 14 % пациентов имеется истинное врастание опухоли в стенку НПВ [3]. Несмотря на огромное количество исследований, посвященных широкому спектру вопросов диагностики и лечения рака почки с опухолевым венозным тромбозом, в доступной нам литературе мы не обнаружили работ, посвященных экспрессии проангиогенных факторов, регулируемых гипоксия-индуцированным фактором (HIF), в клетках опухолевого тромба.

Цель исследования – изучение экспрессии и прогностической значимости фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), фактора роста фибробластов 2 (FGF-2) и их рецепторов VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2, а также

рецепторов фактора роста тромбоцитарного происхождения PDGFR- α и PDGFR- β в клетках парных образцов первичной опухоли и опухолевого тромба у больных ПКР.

Материалы и методы

Характеристика больных ПКР. В исследование были включены 25 больных ПКР pT3a–T4N0–1M0–1, осложненным опухолевым венозным тромбозом. 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 больным была выполнена нефрэктомия, тромбэктомия, забрюшинная лимфодиссекция. Удаление

отдаленных метастазов произведено в 5 случаях (адреналэктомия – 3 (12,0 %), резекция печени – 1 (4,0 %), резекция легкого – 1 (4,0 %)). Все определяемые опухолевые очаги удалось удалить в 12 (48,0 %) наблюдениях, 13 (52,0 %) операций носили циторедуктивный характер.

Гистологическое исследование выявило светлоклеточный вариант ПКР во всех удаленных образцах. Степень дифференцировки опухоли G_2 имела место в 7 (28,0 %), G_3 – в 13 (52,0 %), G_4 – в 25 (20,0 %) препаратах. Вростание опухоли в паранефрий определялось в 14 (56,0 %) случаях, истинная инвазия тромба в венозную стенку – в 2 (8,0 %) операционных образцах. 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 лимфатические узлы были выявлены у 9 (36,0 %) больных, при этом поражение более одного лимфатического узла имело место в 6 (24,0 %) наблюдениях. Опухолевый тромб и удаленные метастазы имели строение, аналогичное первичной опухоли, во всех случаях.

Из 13 пациентов, подвергнутых циторедуктивной операции, системное лекарственное лечение проводилось 10 (76,9 %) (цитокриновая 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.

Методика иммуногистохимического исследования. Для исследования использовали парные образцы опухоли почки и опухолевого тромба, полученные при хирургическом удалении новообразования. В работе были использованы антитела к рецепторам и ростовым факторам: anti-VEGFR-1 (ab2350 Abcam), anti-VEGFR-2 (A-3, SantaCruz), anti-PDGFR- α (C-20, SantaCruz), anti-PDGFR- β (P-20, SantaCruz), anti-FGFR-1 (M2F12, SantaCruz), anti-FGFR-2 (C-8, SantaCruz), anti-FGF-2 (G-2, SantaCruz), anti-VEGF (VG-1, Dako). Микросрезы рака почки депарафинировали и регидратировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте. «Демаскировку» антигенов выполняли при нагревании срезов в течение 30 мин при 95 °C в цитратном (pH 6,0) или Трис-буфере (pH 9,0) (Dako). Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали с 3 % перекисью водорода 5 мин. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали с 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина при комнатной температуре. Первичные антитела к рецепторным тирозинкиназам или факторам роста VEGF, FGF-2 инкубировали при +4 °C в течение 18 ч. Для проявки антител использовали набор REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako). Срезы докрашивали гематоксилином Майера (Sigma), дегидрати-

ровали 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 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) рассчитывали путем умножения процента окрашенных клеток на показатель интенсивности окрашивания [6].

Методы статистической обработки данных. Все данные пациентов были внесены в базу данных на основе электронных таблиц Microsoft Excel с помощью специально разработанного кодификатора. Анализ данных осуществляли с применением блока статистических программ SPSS Statistics 19. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по t-критерию Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^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 $< 0,05$. 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. Общую выживаемость (ОВ) рассчитывали у всех пациентов от даты хирургического вмешательства до последнего дня наблюдения или смерти, безрецидивную выживаемость (БРВ) – от даты хирургического вмешательства до даты регистрации рецидива у пациентов, подвергнутых радикальной операции, выживаемость без прогрессирования (ВБП) – от даты циторедуктивного хирургического вмешательства до даты регистрации прогрессирования у больных метастатическим ПКР. Выживаемость оценивали по методу Каплана–Майера, различия выживаемости определяли с помощью *log-rank*-теста. Для выявления прогностически значимых для выживаемости факторов использовали одно- и многофакторный регрессионный анализ Кокса.

Результаты

В цитоплазме и на мембране клеток опухолевого тромба так же, как и клеток первичной опухоли у больных раком почки экспрессировались VEGF-A,

Экспрессия ростовых факторов и рецепторов тирозинкиназ в клетках первичной опухоли и опухолевого венозного тромба у больных почечно-клеточным раком (n = 25)

Expression of growth factors and receptor tyrosine kinases in primary tumor cells and tumor venous thrombus cells in patients with renal cell carcinoma (n = 25)

Ростовые факторы и рецепторы тирозинкиназ Growth factors and receptor tyrosine kinases	Экспрессия, средняя ± σ, HS Expression, mean ± σ, HS		Значимость двухсторонняя 2-tailed significance
	Клетки опухоли почки Kidney tumor cells	Клетки опухолевого тромба Tumor thrombus cells	
VEGF-A	21,2 ± 5,0	9,2 ± 3,6	0,060
FGF-2	58,0 ± 9,6	33,2 ± 7,3	0,046
VEGFR-1	156,4 ± 13,1	79,6 ± 9,3	<0,0001
VEGFR-2	88,4 ± 10,1	45,6 ± 7,5	0,001
PDGFR-α	98,8 ± 12,9	52,4 ± 9,8	0,006
PDGFR-β	38,4 ± 9,4	24,0 ± 6,5	0,216
FGFR-1	2,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,077
FGFR-2	52,4 ± 9,4	30,8 ± 8,2	0,090

Примечание. HS – H-score.

Note. HS – H-score.

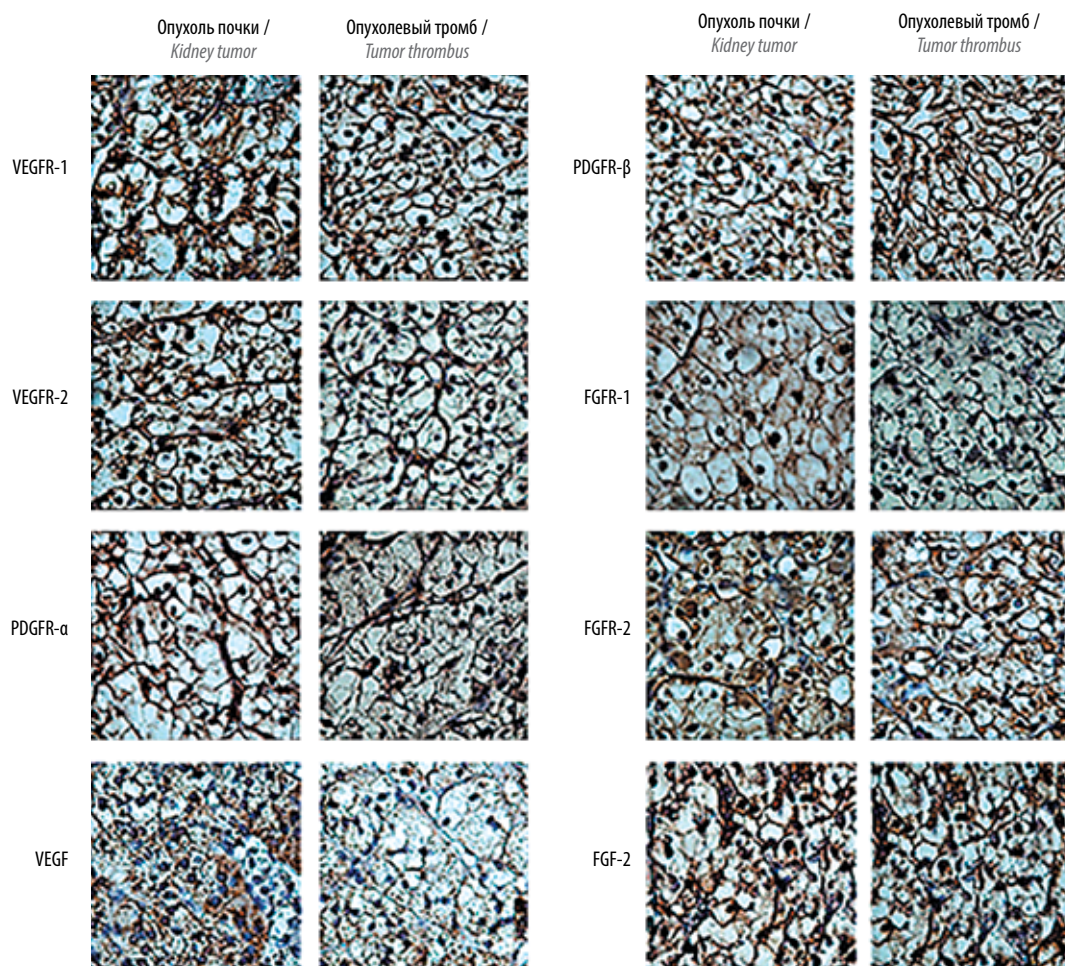


Рис. 1. Экспрессия ростовых факторов и рецепторных тирозинкиназ в первичной опухоли и опухолевом тромбе (шкала 50 мкм)

Fig. 1. Expression of growth factors and receptor tyrosine kinases in primary tumor and tumor thrombus (50 μm scale)

FGF-2, а также VEGFR-1, -2; FGFR-1, -2; PDGFR- α , - β (рис. 1). Уровни экспрессии перечисленных маркеров приведены в таблице. При иммуногистохимическом анализе выявлено, что клетки опухолевого тромба характеризуются тенденцией к более низкой экспрессии ростовых факторов VEGF-A ($p = 0,060$) и FGF-2 ($p = 0,046$), достоверно более низкой экспрессией рецепторов VEGFR-1, -2, PDGFR- α ($p < 0,05$ для всех), а также тенденцией к более низкой экспрессии FGFR-1 ($p = 0,077$) и FGFR-2 ($p = 0,090$) по сравнению с клетками первичной опухоли почки.

Для оценки возможной взаимосвязи уровней экспрессии ростовых факторов и рецепторов тирозинкиназ в клетках опухоли и опухолевого тромба с характеристиками опухолевого процесса (степень дифференцировки, размер первичной опухоли, протяженность опухолевого венозного тромба, вращание опухоли почки в паранефрий, категории pT, pN, M) был проведен корреляционный анализ. Степень дифференцировки G была прямо взаимосвязана с уровнем экспрессии VEGFR-1 ($r = 0,423$; $p = 0,035$) и FGFR-1 в клетках опухоли ($r = 0,455$; $p = 0,022$). Отмечена прямая значимая корреляция инвазии опухолевого тромба в венозную стенку и уровней экспрессии VEGFR-1 ($r = 0,454$; $p = 0,023$) и FGFR-2 ($r = 0,544$; $p = 0,005$) на клетках внутрисосудистой опухоли. Других значимых взаимосвязей не выявлено ($p > 0,05$ для всех).

Медиана наблюдения за всеми 25 больными составила 16,4 (0,3–74,5) мес. Рецидивы развились у 5 (41,7 %) из 12 радикально оперированных больных, в среднем через 6 (1–11) мес после хирургического вмешательства. Во всех случаях отмечено появление отдаленных метастазов, что послужило показанием к назначению системной антиангиогенной терапии. 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 ПКР. Медиана ОВ и специфической выживаемости всех пациентов составила 43,7 мес, медиана БРВ радикально оперированных больных – 11,2 мес, медиана ВБП у нерадикально оперированных пациентов на фоне 1-й линии терапии равнялась 10,3 мес.

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 у больных с высокой категорией pT (медиана для пациентов с категорией pT3 – 43,7 мес, pT4 – 5,8 мес; $p = 0,098$), категорией pN+ (медиана для пациентов с категорией pN0 – 43,7 мес, pN+ – 15,7 мес; $p = 0,899$) и категорией M+ (медиана для пациентов с категорией M0 не достигнута, M+ – 15,7 мес; $p = 0,302$). Степень дифференцировки G₄ имела строгую тенденцию к негативному влиянию

на ОВ (медиана для пациентов с опухолями G₂₋₃ – 43,7 мес, G₄ – 4,7 мес; $p = 0,054$). Медиана ОВ радикально оперированных больных была недостоверно выше, чем у пациентов, подвергнутых циторедуктивным операциям (не достигнута против 15,7 мес; $p = 0,288$). В связи с отсутствием смертей, не обусловленных прогрессированием ПКР, отдельный анализ факторов риска специфической выживаемости не проводился. В однофакторном анализе не выявлено факторов риска БРВ радикально оперированных пациентов и ВБП больных, подвергнутых циторедуктивным вмешательствам.

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

На следующем этапе был произведен поиск пограничных значений уровней экспрессии маркеров, влияющих на ОВ. Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFR-1 в клетках первичной опухоли ≥ 90 HS составила 15,6 мес, пациентов с экспрессией < 90 HS не достигнута; разница результатов между группами статистически незначима ($p = 0,230$). Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFR-2 в клетках первичной опухоли ≥ 95 HS составила 6,0 мес, пациентов с экспрессией < 95 HS – 52,1 мес ($p = 0,011$) (рис. 2). Медиана ОВ больных с экспрессией VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба ≥ 40 HS составила 7,4 мес, пациентов с экспрессией < 40 HS не достигнута; имеется тенденция к значимому различию результатов между группами ($p = 0,093$) (рис. 3). Медиана ОВ больных с экспрессией VEGF-A в клетках опухолевого тромба < 15 HS составила 15,7 мес, пациентов с экспрессией ≥ 15 HS не достигнута; имеется тенденция к значимому различию результатов между группами ($p = 0,095$) (рис. 4).

В многофакторном анализе дискретных независимых факторов риска ОВ не выделено.

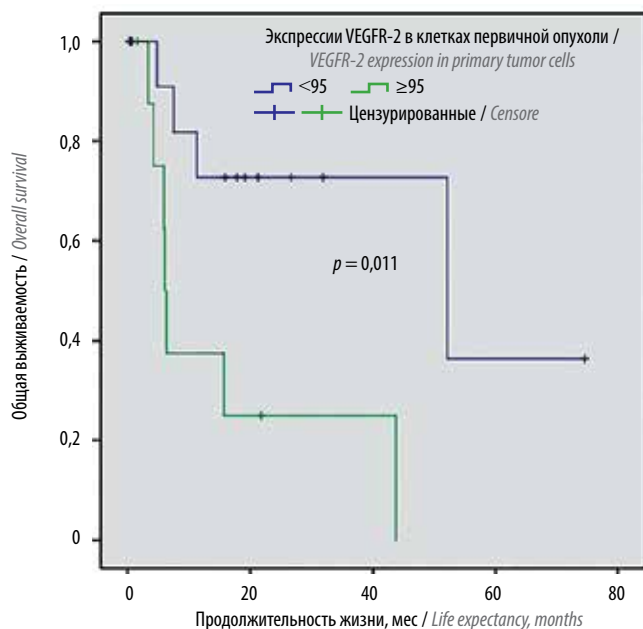


Рис. 2. Общая выживаемость оперированных больных почечно-клеточным раком с опухолевым венозным тромбозом в зависимости от экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли

Fig. 2. Overall survival of renal cell carcinoma patients with tumor venous thrombosis after surgery depending on VEGFR-2 expression in primary tumor cells

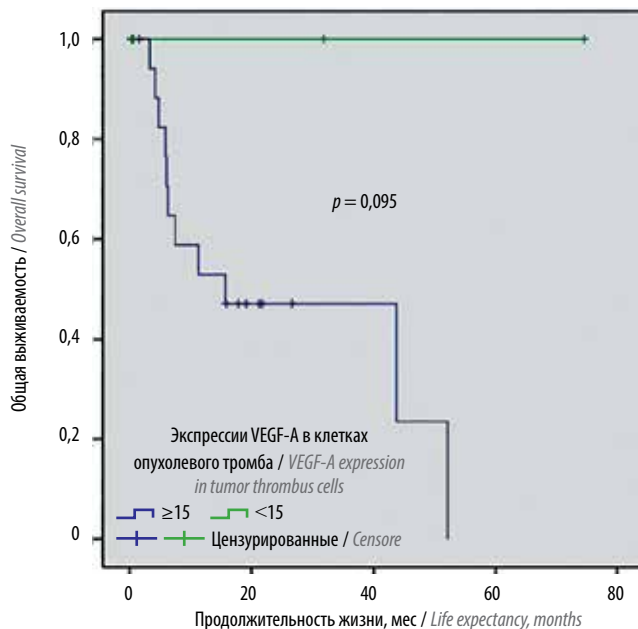


Рис. 4. Общая выживаемость оперированных больных почечно-клеточным раком с опухолевым венозным тромбозом в зависимости от экспрессии VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба

Fig. 4. Overall survival of renal cell carcinoma patients with tumor venous thrombosis depending on VEGFR-2 expression in tumor thrombus cells

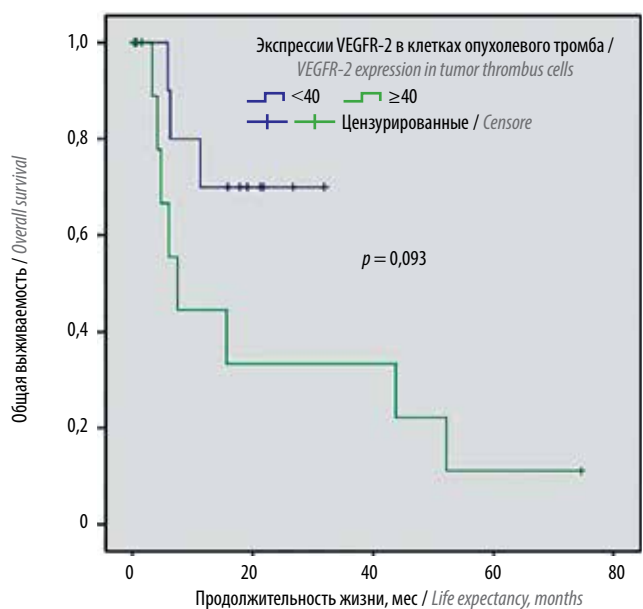


Рис. 3. Общая выживаемость оперированных больных почечно-клеточным раком с опухолевым венозным тромбозом в зависимости от экспрессии VEGFR-2 в клетках опухолевого тромба

Fig. 3. Overall survival of renal cell carcinoma patients with tumor venous thrombosis after surgery depending on VEGFR-2 expression in tumor thrombus cells

Проведен многофакторный анализ ОВ, в который в качестве потенциальных факторов риска включены количество признаков (от 0 до 4) и комбинации количества признаков (0 или 1–4, 0–1 или 2–4, 0–2 или

3–4, 0–3 или 4), оказывавших негативное влияние на ОВ, по данным однофакторного анализа (экспрессия VEGFR-2 в клетках первичной опухоли ≥ 95 HS, экспрессия VEGFR-2 ≥ 40 HS и VEGF-A < 15 HS в клетках опухолевого тромба, степень дифференцировки G_{3-4}). Независимым негативным прогностическим влиянием на ОВ обладало наличие ≥ 3 перечисленных выше факторов риска (отношение рисков 1,8; 95 % доверительный интервал 1,1–3,1; $p = 0,026$). Пациенты с < 3 факторами риска имели достоверно более высокую 1-летнюю ОВ по сравнению с больными, имевшими ≥ 3 факторов риска (77,8 и 30,0 % соответственно; медиана не достигнута и 6,0 мес соответственно; $p = 0,012$) (рис. 5). Предсказательная точность – 83,8 % ($p = 0,004$).

Проведен многофакторный анализ ОВ, в который в качестве потенциальных факторов риска включены количество молекулярных признаков (от 0 до 3) и комбинации количества признаков (0 или 1–3, 0–1 или 2–3, 0–2 или 3), оказывавших негативное влияние на ОВ, по данным однофакторного анализа (экспрессия VEGFR-2 в клетках первичной опухоли ≥ 95 HS, экспрессия VEGFR-2 ≥ 40 HS и VEGF-A < 15 HS в клетках опухолевого тромба). Независимым негативным прогностическим влиянием на ОВ обладало наличие ≥ 2 перечисленных выше факторов риска (отношение рисков 3,4; 95 % доверительный интервал 1,2–9,5; $p = 0,021$). Однолетняя выживаемость пациентов с ≥ 2 факторами риска составила 27,3 % (медиана 6,2 мес), < 2 факторов

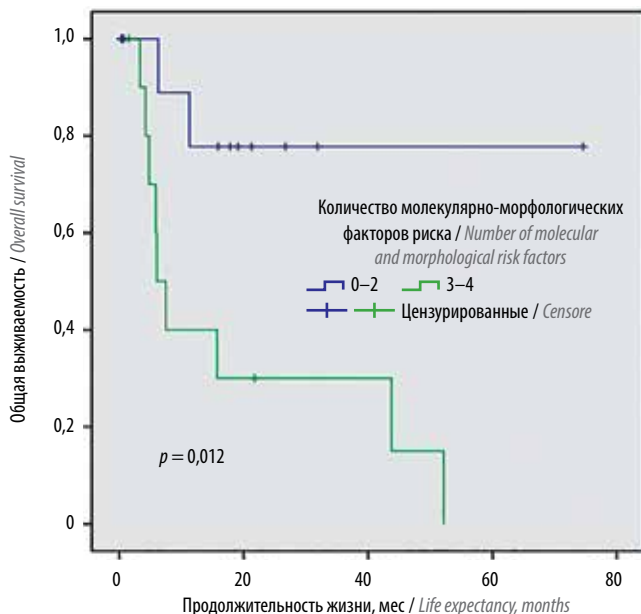


Рис. 5. Общая выживаемость оперированных больных почечно-клеточным раком с опухолевым венозным тромбозом в зависимости от количества факторов риска (степени анаплазии опухоли G_{3-4} , экспрессии VEGFR-1 в клетках первичной опухоли ≥ 95 HS, экспрессии VEGFR-2 ≥ 40 HS и VEGF-A < 15 HS в клетках опухолевого тромба). Здесь и на рис. 6: HS – H-score

Fig. 5. Overall survival of renal cell carcinoma patients with tumor venous thrombosis after surgery depending on the quantity of risk factors (G_{3-4} tumor anaplasia, VEGFR-1 expression in primary tumor cells ≥ 95 HS, VEGFR-2 expression ≥ 40 HS and VEGF-A < 15 HS in tumor thrombus cells). Here and in the fig. 6: HS – H-score

риска – 87,5 % (медиана не достигнута) ($p = 0,004$). Предсказательная точность – 88,3 % ($p = 0,001$) (рис. 6).

Обсуждение

Наиболее распространенным вариантом рака почки является светлоклеточный ПКР [7], ассоциированный с высокой частотой инактивирующих мутаций гена фон Гиппеля–Линдау, приводящих к гиперэкспрессии HIF и HIF-зависимых сигнальных путей, прежде всего VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR [8]. HIF-зависимые ростовые факторы и их рецепторы принимают участие в регуляции опухолевого ангиогенеза, митогенеза, а также формировании опухолевого микроокружения и являются основными мишенями таргетной терапии ПКР [9–12]. Продукция VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGF/PDGFR при раке почки изучалась в клетках первичной опухоли и эндотелия сосудов. Влияние HIF-зависимых молекул на процесс опухолевой венозной инвазии, являющейся специфическим свойством ПКР, ранее не исследовалось.

Насколько мы можем судить, в нашей работе впервые продемонстрировано, что клетки опухолевого тромба так же, как и клетки первичной опухоли экспрессируют HIF-зависимые факторы роста и рецепторы

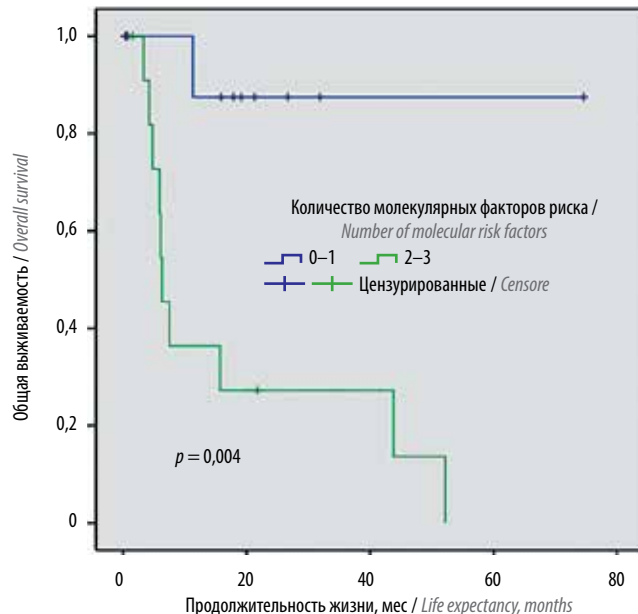


Рис. 6. Общая выживаемость оперированных больных почечно-клеточным раком с опухолевым венозным тромбозом в зависимости от количества молекулярных факторов риска (экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли ≥ 95 HS, экспрессии VEGFR-2 ≥ 40 HS и VEGF-A < 15 HS в клетках опухолевого тромба)

Fig. 6. Overall survival of renal cell carcinoma patients with tumor venous thrombosis after surgery depending on the quantity of molecular risk factors (VEGFR-2 expression in primary tumor cells ≥ 95 HS, VEGFR-2 expression ≥ 40 HS and VEGF-A < 15 HS in tumor thrombus cells)

тирозинкиназ VEGF/VEGFR, FGF/FGFR и PDGFR у больных ПКР. Однако клетки, формирующие опухолевый тромб, характеризуются меньшим уровнем экспрессии перечисленных HIF-зависимых молекул по сравнению с клетками первичной опухоли почки. Теоретически растворимые формы VEGF и FGF, концентрация которых повышена в сыворотке крови у больных ПКР [9–17], могут акцептироваться тирозинкиназами клеток опухолевого тромба, что способно снизить их потребность в самостоятельной продукции ростовых факторов. Еще одним источником ростовых факторов и тирозинкиназ для опухолевого тромба, несомненно, является опухоль почки. Хотя относительно низкая экспрессия тирозинкиназных рецепторов на клетках опухолевого тромба указывает на невысокую потребность внутрисосудистой опухоли в ростовых факторах. Наиболее вероятным объяснением этому факту являются молекулярно-генетические различия между клетками опухолевого тромба и первичной опухоли. Также нельзя скидывать со счетов, что помимо HIF-зависимых сигнальных путей существует 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,

и отрицательное давление в НПВ, создаваемое в фазу сердечной диастолы.

В нашей серии наблюдений гиперэкспрессия рецепторов VEGFR-1 и FGFR-1 на опухолевых клетках прямо коррелировала со степенью дифференцировки G. Кроме того, отмечена прямая значимая взаимосвязь инвазии опухолевого тромба в венозную стенку и уровней экспрессии VEGFR-1 и FGFR-2 на клетках внутрисосудистой опухоли. Наши данные в отношении VEGFR-1 сходны с результатами Н. Kluge и соавт. (2008), которые отметили, что экспрессия VEGFR прямо коррелировала со степенью дифференцировки опухоли в 334 образцах ПКР [18]. Напротив, S. Lkhagvadorj и соавт. (2014) показали, что более высокая экспрессия VEGFR-1 прямо взаимосвязана с низкой степенью дифференцировки опухоли по Фурману и отсутствием инвазии тканей почечного синуса в 126 образцах ткани светлоклеточного ПКР [19]. В нескольких работах отмечено негативное влияние повышенной экспрессии FGF/FGFR на прогноз больных ПКР, хотя авторы не указывают на корреляцию продукции тирозинкиназ со степенью дифференцировки опухоли и распространенностью опухолевого процесса [12, 20, 21].

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 дифференцировки G₄ имела строгую тенденцию к негативному влиянию на ОВ. Тем не менее нам удалось выявить влияние экспрессии ростовых факторов и их рецепторов на прогноз больных ПКР с опухолевым венозным тромбозом. В однофакторном анализе отмечено неблагоприятное влияние на ОВ пациентов, подвергнутых нефрэктомии, тромбэктомии, гиперэкспрессии VEGFR-2 ≥95 HS в клетках первичной опухоли, а также тенденция к снижению ОВ при гиперэкспрессии VEGFR-2 ≥40 HS и гипоекспрессии VEGF-A

<15 HS в клетках опухолевого тромба. Наибольшую прогностическую значимость имела гиперэкспрессия VEGFR-2 в клетках первичной опухоли. Это отчасти соответствует результатам Н. Kluge и соавт. (2008), показавшим, что высокая экспрессия VEGFR в клетках опухоли почки являлась независимым фактором ОВ больных ПКР [18].

Гипоекспрессия VEGF-A в клетках тромба коррелировала с ухудшением прогноза. Мы полагаем, что это может быть обусловлено быстрым связыванием ростовых факторов чрезмерным количеством специфичных тирозинкиназных рецепторов в клетках ПКР. Косвенным свидетельством этой гипотезе служит наиболее выраженное ухудшение прогноза при повышенной экспрессии VEGFR-2 в клетках первичной опухоли и тромба в сочетании с гипоекспрессией VEGFR-A. Однолетняя выживаемость пациентов с ≥2 факторами риска составила 27,3 %, <2 факторов риска – 87,5 % ($p = 0,004$).

Заключение

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lawindy S.M., Kurian T., Kim T. et al. Important surgical considerations in the management of renal cell carcinoma (RCC) with inferior vena cava (IVC) tumour thrombus. *BJU Int* 2012;110(7):926–39. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11174.x.
2. Wagner B., Patard J.J., Méjean A. et al. Prognostic value of renal vein and inferior vena cava involvement in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2009;55(2):452–9. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.07.053.
3. Давыдов М.И., Матвеев В.Б., Волкова М.И. и др. Резекция нижней полой вены у больных раком почки с массивным опухолевым тромбозом. *Онкоурология* 2018;14(2):15–25. DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-15-25. [Davydov M.I., Matveev V.B., Volkova M.I. et al. Resection of the inferior vena cava in patients with renal cell carcinoma with bulky tumor venous thrombosis. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(2):15–25 (In Russ.).]
4. Abel E.J., Thompson R.H., Margulis V. et al. Perioperative outcomes following surgical resection of renal cell carcinoma with inferior vena cava thrombus extending above the hepatic veins: a contemporary multicenter experience. *Eur Urol* 2014;66(3):584–92. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.10.029.
5. Kirkali Z., Van Poppel H. A critical analysis of surgery for kidney cancer with vena cava invasion. *Eur Urol* 2007;52(3):658–62. DOI: 10.1016/j.eururo.2007.05.009.

6. Detre S., Saclani Jotti G., Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995;48(9):876–8. DOI: 10.1136/jcp.48.9.876.
7. Tsimafeyeu I., Zolotareva T., Varlamov S. et al. Five-year survival of patients with metastatic renal cell carcinoma in the Russian Federation: results from the RENSUR5 registry. *Clin Genitourin Cancer* 2017;15(6):e1069–72. DOI: 10.1016/j.clgc.2017.07.017.
8. Tsimafeyeu I., Demidov L., Ta H. et al. Fibroblast growth factor pathway in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2011;28(15_suppl):4621. DOI: 10.1200/jco.2010.28.15_suppl.4621.
9. Porta C., Paglino C., Imarisio I. et al. Changes in circulating pro-angiogenic cytokines, other than VEGF, before progression to sunitinib therapy in advanced renal cell carcinoma patients. *Oncology* 2013;84(2):115–22. DOI: 10.1159/000342099.
10. Paule B., Bastien L., Deslandes E. et al. Soluble isoforms of vascular endothelial growth factor are predictors of response to sunitinib in metastatic renal cell carcinomas. *PLoS One* 2010;5(5):e10715. DOI: 10.1371/journal.pone.0010715.
11. Tsimafeyeu I., Zaveleva E., Stepanova E., Low W. OM-RCA-01, a novel humanized monoclonal antibody targeting fibroblast growth factor receptor 1, in renal cell carcinoma model. *Invest New Drugs* 2013;31(6):1436–43. DOI: 10.1007/s10637-013-0017-x.
12. Tsimafeyeu I., Volkova M., Olshanskaia A. et al. Expression of receptor tyrosine kinases on peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma and healthy donors. *Oncology* 2020. DOI: 10.1159/000505373. Online first.
13. Horstmann M., Merseburger A.S., von der Heyde E. et al. Correlation of bFGF expression in renal cell cancer with clinical and histopathological features by tissue microarray analysis and measurement of serum levels. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(11):715–22. DOI: 10.1007/s00432-005-0019-y.
14. Fujimoto K., Ichimori Y., Yamaguchi H. et al. Basic fibroblast growth factor as a candidate tumor marker for renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1995;86(2):182–6. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1995.tb03037.x.
15. Duensing S., Grosse J., Atzpodi J. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with progressive lung metastases in advanced renal cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 1995;15(5B):2331–3.
16. Rasmuson T., Grankvist K., Jacobsen J., Ljungberg B. Impact of serum basic fibroblast growth factor on prognosis in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2001;37(17):2199–203. DOI: 10.1016/s0959-8049(01)00290-8.
17. Slaton J.W., Inoue K., Perrotte P. et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001;158(2):735–43. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64016-3.
18. Kluger H.M., Siddiqui S.F., Angeletti C. et al. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. *Lab Invest* 2008;88(9):962–72. DOI: 10.1038/labinvest.2008.65.
19. Lkhagvadorj S., Oh S.S., Lee M.R. et al. VEGFR-1 expression relates to fuhrman nuclear grade of clear cell renal cell carcinoma. *J Lifestyle Med* 2014;4(1):64–70. DOI: 10.15280/jlm.2014.4.1.64.
20. Iacovelli R., De Tursi M., Mosillo C. et al. Relationship and predictive role of the dual expression of FGFR and IL-8 in metastatic renal cell carcinoma treated with targeted agents. *Anticancer Res* 2018;38(5):3105–10. DOI: 10.21873/anticancer.12569.
21. Ho T.H., Liu X.D., Huang Y. et al. The impact of FGFR1 and FRS2α expression on sorafenib treatment in metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2015;15:304. DOI: 10.1186/s12885-015-1302-1.

Вклад авторов

М.И. Волкова, И.В. Тимофеев, В.Б. Матвеев: разработка дизайна исследования, анализ результатов, написание текста рукописи; А.С. Ольшанская, Н.Л. Вашакмадзе: сбор клинических данных и морфологического материала пациентов, включенных в исследование, написание текста рукописи;

Ю.А. Хоченкова, Э.Ш. Соломко, С.А. Ашуба, Д.А. Хоченков: изучение экспрессии маркеров методом иммуногистохимического анализа, написание текста рукописи.

Authors' contributions

M.I. Volkova, I.V. Tsimafeyeu, V.B. Matveev: development of research design, analysis of the results, writing the text of the manuscript; A.S. Olshanskaya, N.L. Vashakmadze: collection of clinical data and morphological material of patients included in the study, writing the text of the manuscript;

Yu.A. Khochenkova, E.Sh. Solomko, S.A. Ashuba, D.A. Khochenkov: study of the expression of markers by immunohistochemical analysis, writing the text of the manuscript.

ORCID авторов/ORCID of authors

М.И. Волкова/M.I. Volkova: <https://orcid.org/0000-0001-7754-6624>
 А.С. Ольшанская/A.S. Olshanskaya: <https://orcid.org/0000-0003-0389-564X>
 И.В. Тимофеев/I.V. Tsimafeyeu: <https://orcid.org/0000-0002-7357-0392>
 Н.Л. Вашакмадзе/N.L. Vashakmadze: <https://orcid.org/0000-0002-9029-2590>
 Ю.А. Хоченкова/Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>
 Э.Ш. Соломко/E.Sh. Solomko: <https://orcid.org/0000-0002-8070-4707>
 Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>
 В.Б. Матвеев/V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00442).

Financing. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 19-15-00442).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.