

На правах рукописи

ТЕН
Евгения Александровна

**ЗНАЧЕНИЕ ОСНОВНОГО И КИСЛОГО ФАКТОРОВ РОСТА
ФИБРОБЛАСТОВ В КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
БОЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ КОСТЕЙ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор
Кушлинский Николай Евгеньевич.

Официальные оппоненты:

Балдуева Ирина Александровна – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая научным отделом онкоиммунологии;

Моисеенко Федор Владимирович – доктор медицинских наук, ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», заведующий онкологическим химиотерапевтическим (противоопухолевой лекарственной терапии) отделением биотерапии.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «24» января 2023 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: [https:// nrcerm.ru](https://nrcerm.ru)

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Широкая распространенность онкологических заболеваний и высокие по их причине показатели смертности в большинстве стран мира, в том числе и в России, - одна из наиболее важных проблем современной клинической медицины (Гарин А.М. с соавт., 2016; Каприн А.Д. с соавт., 2017; Siegel R.L. et al., 2017). Данные Американского онкологического общества прогнозируют увеличение новых случаев злокачественных новообразований в мире почти на 50% к 2030 году (Джемал А. с соавт., 2014).

Среди онкологических заболеваний саркомы костей относят к наиболее сложным разделам клинической онкологии (Isakoff M.S. et al., 2015; Niu X. et al., 2015). Этиология новообразований костей не известна, патогенез изучен не достаточно. Однако, следует отметить, что с молекулярной точки зрения злокачественные опухоли, в том числе и саркомы костей, являются заболеванием генома клетки (Кушлинский Н.Е. с соавт., 2017; Baird K. et al., 2005; Hanahan D. et al., 2011; Wang J. et al., 2016).

Злокачественные новообразования костей встречаются сравнительно редко. Например, в США ежегодно выявляют до 2900 новых случаев злокачественных опухолей костей. Эти опухоли выявляют редко (они составляют 1-4% всех опухолей), однако они крайне агрессивны и склонны к раннему метастазированию (ESMO, 2014; Rogozhin D.V. et al., 2015). Наиболее часто обнаруживают остеосаркому, затем (по частоте встречаемости) следуют хондросаркома и саркома Юинга (Бабкина И.В. с соавт., 2017; Ottaviani G. et al., 2009). Остеосаркома и саркома Юинга чаще всего возникают у детей и подростков (от 7 лет и старше) и во втором десятилетии жизни (в период пубертата в возрасте от 16 до 18 лет) (Ottaviani G. et al., 2009; Franchi A., 2012; Rogozhin D.V. et al., 2015). Следует отметить, что на этапе постановки клинического диагноза остеосаркомы кости у 10-20% больных имеются метастазы, а у 80% пациентов – микроскопические метастазы первичной опухоли. Метастазирует остеосаркома главным образом в легкие (90%) (Ritter J. et al., 2010; Paioli A. et al., 2017). Другие саркомы костей, в частности, хондросаркома, фибросаркома наблюдаются в основном у взрослых (Алиев М.Д., 2008).

Комплексное лечение больных саркомами костей включает радикальное хирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию (Гарин А.М. с соавт., 2016).

Кроме того, крайне важна разработка новых подходов к оценке биологических особенностей опухолей костей, выбора наиболее адекватных схем индивидуальной терапии на основании изучения метаболических и биологических особенностей опухолевой клетки (Бейшон М., 2016).

Среди основных отличительных признаков, определяющих злокачественный рост при саркомах костей, можно выделить неконтролируемую пролиферацию, уклонение опухолевой клетки от факторов, регулирующих апоптоз, репликацию, неоангиогенез, инвазию и метастазирование (Hanahan D. et al., 2011; Claesson-Welsh L. et al., 2013; Gulyaeva L.F. et al., 2016; Sverdlov E.D. et al., 2016; Zhou W.Y. et al., 2016).

При этом, факторы роста лежат в основе выше указанных биологических свойств опухолей, они синтезируются не только опухолевыми клетками, но и рядом иммунологических клеток, которые взаимодействуют с тирозинкиназами

рецепторами клеток-продуцентов, запуская процессы клеточного деления (Walia A. et al., 2015).

Понимание биологических свойств опухоли необходимо для выбора персонализированной терапии, в связи с чем, активно развиваются фундаментальные исследования молекулярных и клеточных маркеров биологических свойств опухоли (Герштейн Е.С. с соавт., 2016, 2017; Имянитов Е.Н., 2012).

Как оказалось, клинико-лабораторные прогностические факторы при опухолях костей могут быть полезны «при выявлении группы пациентов с неблагоприятным прогнозом, за которыми требуется пристальное наблюдения и которым показано более агрессивное адьювантное лечение, а также для определения чувствительности или резистентности опухоли к конкретным видам терапии» (Герштейн Е.С. с соавт., 2016) На основании данных «молекулярно-биологического фенотипа опухоли», создана новая стратегия лечения сарком костей. Кроме того, выявление новых мишеней способствует в развитии совершенно новых подходов к патогенетическому их лечению или усовершенствованию существующих схем терапии (Герштейн Е.С. с соавт., 2016; Zhou W.Y. et al., 2016).

Несмотря на то, что известны десятки факторов роста, в последнее десятилетие интерес исследователей привлекают факторы роста фибробластов (FGF) и роль сигнального пути FGF/FGF-R в канцерогенезе ряда новообразований (Haugsten E.M. et al., 2010; Lleher F.C. et al., 2013; Raju R. et al., 2014).

Степень разработанности темы исследования

FGF относят к сигнальным молекулам с широким спектром действия и вовлеченным во многие клеточные процессы, в том числе и в развитие ряда опухолей (Михайленко Д.С. с соавт., 2018; Олейникова Н.А. с соавт., 2020; Ahmad I. et al., 2012). FGF относятся к тем факторам, посредством которых происходит потенцирующее взаимодействие между опухолью и окружающей ее стромой (Shimizu T. et al., 2012). В экспериментальных исследованиях установлено, что в процессах метастазирования опухолей костей большую роль играет внеклеточный матрикс (ВКМ) и, в частности, система FGF и их рецепторов, которые экспрессируются не только стромальными компонентами опухоли, но и клетками сарком костей (Powers C.J. et al., 2000).

В настоящее время известно, что белки семейства FGF относятся к гепарин-связывающим секретируемым гликопротеинам, которые вне клетки обычно находятся в комплексе с гепарансульфат-содержащими протеогликанами (HSPG) перичеллюлярного пространства и ВКМ (Ornitz D.M., 2001). Стало известно, что FGF индуцируют митогенную, хемотаксическую и ангиогенную активности клеток мезодермальной и нейроэктодермальной природы, увеличивают инвазивный потенциал многих типов клеток, изменяют синтез коллагена и эластина, дифференцировку мезенхимальных клеток (Ornitz D.M., 2001; Harmer N.J. et al., 2004; Ren T. et al., 2014; Correa D. et al., 2015). Низкая экспрессия FGF-R2 и FGF-R3 выявлена в 10 клеточных линий остеосаркомы (OS229, OS232, OS231, OS238, OS242, OS252, OS290, OS293, OS308, OS311) (Hassan S.E. et al., 2012). Установлено, что в клетках линии остеосаркомы TE85 FGF-2 снижал экспрессию проколлагена и продукцию остеокальцина (Bodo M. et al., 2002).

Известно 23 белка семейства FGF. У человека семейство белков FGF включает: FGF1 (FGFa), FGF2 (FGFb), FGF3, FGF4 (HST/K-FGF), FGF5, FGF6,

FGF7 (KGF), FGF8-FGF10, FGF11 (FHF-3), FGF12 (FHF-1, FGF13 (FHF-2), FGF14 (FHF-14), FGF-15, FGF16-FGF23 факторы (Ornitz D.M., 2001).

В зависимости от функциональных свойств FGF делят на несколько подсемейств: паракринные – индуцирующие эффекты вблизи расположенных клетках-мишенях (FGF-1-10, FGF-16-20, FGF-22); эндокринные – способные оказывать системное влияние на отдаленные ткани и органы (FGF-15, 19, 21, 23), интракринные – накапливаются в ядре клеток, не секретируются во ВКМ, способны активировать специфические внутриклеточные рецепторы, которые запускают внутриядерные сигнальные каскады (FGF-11-14) (Schoorlemmer J. et al., 2001; Schultz V. et al., 2017).

Известно, что FGF и их рецепторы принимают активное участие в формировании костной системы, регулируя процессы пролиферации, дифференцировки остеобластов и хондроцитов, соединительной ткани, формировании нервной системы (Zheng Y.H. et al., 2011; Ahmad I. et al., 2012; Yang C. et al., 2013). Физиологически FGF экспрессируются в остеобластическом фронте мембранозных костей, в низких концентрациях опосредуют клеточную пролиферацию через активацию FGF-R2, а в высоких концентрациях – остеобластическую дифференцировку через активацию FGF-R1.

Показано, FGF-2 контролирует фенотип остеосаркомы и ее дифференцировку. Лиганд-зависимое влияние FGF на дифференцировку остеобластов доказано при остеосаркоме. Так, FGF-2 на клеточной линии остеосаркомы ROS17/2.8 подавлял экспрессию *Osf2/Til-1/Cbfa1*-мРНК - одного из важных регуляторов дифференцировки (Zheng Y.H. et al., 2011).

Некоторые исследователи доказали, «что исходные сывороточные уровни VEGF и FGF-2 следует считать независимыми факторами прогноза безрецидивной выживаемости у больных остеосаркомой и предложили использовать их как дополнительные маркеры к основным критериям оценки «биологического поведения» и прогноза опухоли (Chen G.L. et al., 2011; Chen Z. et al., 2012).

Пристальный интерес вызывают исследования FGF с другими факторами роста и, в частности с эндостатином - С-терминальным фрагментом коллагена XVIII типа, способного сдерживать ангиогенез (O'Reilly M.S. et al., 1997; Walia A. et al., 2015). Интерес к эндостатину возрос среди онкологов в последнее десятилетие в связи с его способностью проявлять не только антиангиогенный, но и противоопухолевый эффекты, которые опосредуются через его связывание с рецептором нуклеолином (Kim H.S. et al., 2009; Poluzzi Ch. et al., 2016). По данным Кауа М. et al. (2007) сокращения размеров метастазов в легких при остеосаркоме LM 8 после удаления первичной опухоли можно добиться путем снижения активности ангиогенеза вследствие введения эндостатина (Кауа М. et al., 2007). Таким образом, формируется представление о возможном использовании эндостатина при лечении саркомы (Dutour A. et al., 2005; Кауа М. et al., 2004, 2007). Поэтому, несомненный интерес представляет исследование связи ингибитора неоангиогенеза эндостатина с FGF в сыворотке крови больных первичными саркомами костей.

Нарушение сигнального пути FGF/FGF-R – комплексный процесс, в котором важную роль играют также тип и изоформа рецепторов, регулирующих ремоделирующий эффект FGF и последующую активацию данными факторами пролиферации клеток опухоли. Кроме того, FGF и их рецепторы рассматривают в качестве потенциальных специфических маркеров и возможных мишеней для

целенаправленной терапии некоторых опухолей (Gnatenko D.A. et al., 2016; Liu Y. et al., 2017) и, в частности, ингибитора киназы FGF-R – BGJ398 (Новартис) в комбинации с другими химиотерапевтическими препаратами при ряде онкологических заболеваний (Xu B. et al., 2016; Zhou W.Y. et al., 2016).

Белки FGF обладают сходными функциональными свойствами: индукция пролиферации (в том числе фибробластов), стимуляция ангиогенеза, влияние на нейрогенез (Chang J. et al., 2014; Zhou W.Y. et al., 2016). Стало быть, роль FGF в росте, неоангиогенезе и паракринной регуляции клеток первичных опухолей костей может иметь клиническое значение, особенно опухолей, склонных к гематогенному метастазированию (например, остеосаркома) (Костылева О.И. с соавт., 2016).

Имеющиеся в литературе весьма противоречивые данные об эффектах не только FGF-1 и FGF-2, но и остальных членов семейства FGF требуют более детального исследования механизмов их действия. Более отчетливое понимание механизмов действия FGF, которые реализуются в эмбриональном развитии, заживлении ран и при опухолевом росте, необходимо как для более полного понимания механизмов канцерогенеза, так и решения клинических задач - выявления новых факторов прогноза и создания противоопухолевых препаратов, мишенью которых является FGF-сигнальный путь.

Следует отметить, что в доступной нам литературе выявлены работы по изучению FGF при различных заболеваниях у человека (Kato M., 2016), в том числе и при различных злокачественных новообразованиях: рак шейки матки (Zhang Q.H. et al., 2016), рак легкого (Hu Y. et al., 2016), уротелиальные опухоли (Kikuchi A. et al., 2016), РМЖ (De Luca A. et al., 2017), рак простаты (Feng S. et al., 2017), эмбриональная и альвеолярная рабдомиосаркомы (De Giovanni C. et al., 2009; Wachtel M. et al., 2014), липосаркома (Zhang K. et al., 2013). Выявлены единичные экспериментальные и клинические исследования системы FGF/FGF-R при саркомах костей: саркоме Юинга (Girnit L. et al., 2000), хондросаркоме (van Oosterwijk J.G. et al., 2013), остеосаркоме (Fernanda Amary M. et al., 2014; Hassan S.E. et al., 2012).

Стало быть, исследование FGF позволит выделить больных отличающихся по продукции FGF; на основании данных исследования FGF можно разработать критерии эффективности проводимой терапии; обсудить перспективы использования препаратов, влияющих на продукцию FGF у больных опухолями костей. Тем более, что в последнее десятилетие появились различные по механизму действия препараты, влияющие на систему FGF/FGF-R при таких заболеваниях как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак молочной железы (РМЖ) и среди них низкомолекулярные тирозинкиназные ингибиторы (Soria J.C. et al., 2014; Noonan S. et al., 2015).

Все выше изложенное свидетельствует об актуальности проблемы изучения роли FGF-1 и FGF-2 в клиническом течении и прогнозе первичных сарком костей.

Цель исследования

Оценить клиничко-лабораторную значимость определения факторов роста фибробластов 1 и 2 типа, общей активности ЩФ, фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови больных первичными саркомами костей и их связь с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания и прогнозом.

Задачи исследования

1. Определить уровень факторов роста фибробластов 1 и 2 типа (FGF-1, FGF-2) методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови больных первичными злокачественными, пограничными опухолями костей до лечения и у лиц контрольной группы (здоровых доноров).
2. Изучить особенности содержания FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови больных саркомой Юинга, костеобразующими (остеосаркома), хрящеобразующими (хондросаркома) и пограничными опухолями костей с учетом их основных клинико-морфологических характеристик.
3. Исследовать связь уровней VEGF в сыворотке крови больных новообразованиями костей с основными клиническими, морфологическими и биохимическими маркерами (FGF-1, FGF-2, общая активность ЩФ), оценить их роль в диагностике и прогнозе заболевания.
4. Оценить клинико-лабораторную и прогностическую значимость исследованных маркеров (FGF-1, FGF-2, VEGF, общей активности ЩФ) на основе многофакторного анализа.

Научная новизна исследования

Получены новые данные об уровнях FGF-1, FGF-2, VEGF и общей активности ЩФ в сыворотке крови пациентов первичными злокачественными и пограничными опухолями костей, а также у здоровых доноров соответствующего возраста и пола.

Впервые получены данные о достоверно более частом выявлении FGF-1 в сыворотке крови больных злокачественными (65,7%) и пограничными (100%) новообразованиями костей по сравнению с группой практически здоровых лиц (26,9%).

Впервые была обнаружена зависимость частоты обнаружения FGF-1 в сыворотке крови больных новообразованиями костей от морфологического строения опухоли: у пациентов с хондросаркомой и с недифференцированной плеоморфной саркомой данный маркер был выявлен у 59,4% и 55,6% пациентов соответственно, а при саркоме Юинга – у 76,9%. Медианы FGF-1 были наиболее низкие в контроле (19,6 пг/мл), а самые высокие в группах больных типичной остеосаркомой и саркомой Юинга (51,2 и 44,4 пг/мл соответственно), по сравнению с таковыми показателями при хондросаркоме и недифференцированной плеоморфной саркоме кости (31,1 и 24,6 пг/мл соответственно).

Наиболее часто маркер FGF-1 выявляли в сыворотке крови больных саркомами малоберцовой (100%), подвздошной (93,3%) и бедренной (75,0%) костей, а самая высокая медиана FGF-1 обнаружена у больных с поражением саркомой малоберцовой кости (46 пг/мл). У женщин, больных типичной остеосаркомой кости были выявлены статистически более высокие медианы FGF-1, по сравнению с мужчинами.

Впервые были обнаружены статистически значимо более высокие показатели FGF-2 в сыворотке крови больных паростальной остеосаркомой (58 пг/мл) по сравнению с типичной остеосаркомой (15,0 пг/мл), саркомой Юинга (17,8 пг/мл), хондросаркомой (15,7 пг/мл) и недифференцированной плеоморфной саркомой кости (10,2 пг/мл).

Одновременно высокие уровни FGF-1 (>20 пг/мл) и FGF-2 (>16 пг/мл) обнаружены в сыворотке крови 19% больных саркомами костей и среди них наиболее часто при типичной остеосаркоме (28,1%), саркоме Юинга (26,9%), реже

при хондросаркоме (12,5%) и не выявлены у больных с другими гистологическими вариантами сарком костей, а также у здоровых доноров.

Анализ полученных результатов не выявил корреляционных связей между сывороточными показателями FGF-1, FGF-2 и возрастом больных саркомами костей, их гистологическим строением (исключение FGF-2 при паростальной остеосаркоме), степенью выраженности лечебного патоморфоза опухоли, типом пораженной кости, стадией заболевания и уровнем общей активности ЩФ в сыворотке крови.

Выявлены статистически значимо высокие концентрации VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей, по сравнению с пограничными опухолями и здоровыми донорами. При этом, обнаружена прямая корреляционная зависимость между уровнями проангиогенного маркера и сывороточным FGF-1 в двух выше указанных группах пациентов и его связь со стадией опухолевого процесса, гистологическим строением и степенью дифференцировки опухоли. Уровни сывороточного VEGF не отражали возраст больных, степень лечебного патоморфоза опухоли, тип пораженной кости, не связаны с содержанием общей активности ЩФ (за исключением больных хондросаркомой кости), но в сочетании с сывороточными маркерами FGF-1 и FGF-2 уточняют общий прогноз сарком костей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что на большом репрезентативном материале дана клиничко-лабораторная оценка роли сывороточных биологических маркеров, включая FGF-1, FGF-2, VEGF, общую активность ЩФ в диагностике и прогнозе общей выживаемости первичных больных опухолями костей.

Сформулированы научно-обоснованные гипотезы о клинической роли FGF-1, FGF-2, VEGF и общей активности ЩФ в комплексной диагностике, прогрессировании и прогнозе сарком костей.

На основе оценки комплекса лабораторных маркеров (FGF-1, FGF-2, VEGF, ЩФ) показана возможность прогноза течения заболевания с учетом агрессивного потенциала опухоли, определяющего результаты лечения и показатели общей выживаемости.

Анализ полученных результатов исследования молекулярно-биологических маркеров в сыворотке крови (FGF-1, FGF-2, VEGF, ЩФ) больных злокачественными опухолями костей предопределяет особенности клинического течения заболевания и с высокой степенью вероятности позволяют оценить общий прогноз заболевания.

Наиболее низкие показатели 5-летней общей выживаемости отмечены у больных саркомой Юинга (47,5%), а при остеосаркоме и хондросаркоме кости показатели 5-летней общей выживаемости были сопоставимы и составили 56,9% и 56,0% соответственно.

Практическое значение полученных результатов заключается в формировании основы для оптимизации диагностики и терапии пациентов с саркомами костей с учетом биологических характеристик заболевания и открывает возможности для формирования перспективных направлений клиничко-лабораторных исследований.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием современного оборудования и методов исследования. Определение биохимических маркеров проводили методом иммуноферментного анализа. Полученные результаты анализировали с учетом клинических и морфологических особенностей опухоли на основании общеклинических, рентгенологических и гистологических данных. Статистический анализ показателей общей выживаемости был проведен с учетом исследованных лабораторных маркеров.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сывороточные показатели FGF-1, FGF-2, VEGF не обладают диагностической значимостью, при этом выявлена связь сывороточных уровней FGF-1 с отдаленными результатами лечения больных остеосаркомой кости, а FGF-1 и FGF-2 - с саркомой Юинга.

2. Повышенный уровень общей активности ЩФ в сыворотке крови у больных саркомами костей является неблагоприятным прогностическим признаком течения заболевания.

3. Исходные сывороточные уровни VEGF выше у больных саркомами костей, по сравнению с пограничными опухолями и здоровыми донорами, связаны со стадией заболевания, гистологическим строением и степенью дифференцировки опухоли, а также с показателями FGF-1 в сыворотке крови этих групп пациентов.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объемом выборки (124 больных опухолями костей), достаточным количеством проведенных лабораторных исследований с использованием современных биохимических исследований и сравнительным анализом с гистологическими и клиническими данными, применением комплекса современных программ статистического анализа полученных данных.

Обсуждение полученных результатов основано на анализе большого количества отечественных и зарубежных работ (204 литературных источника). Выводы и практические рекомендации логичны, вытекают из результатов проведенных исследований и полностью соответствуют цели и задачам диссертационной работы.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены и обсуждены на: XVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 11-15 апреля 2011 г.); XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 23-27 апреля 2012 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва 18-20 марта 2014 г.); X Юбилейном Всероссийском съезде ортопедов-травматологов (Москва 16-19 сентября 2014 г.); XX Всероссийской научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России» (Москва 24-26 марта 2015 г.); V International symposium. Interactions of the nervous and immune systems in health and disease (Saint Petersburg. June 23-26, 2015); II Российском Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 12-14 октября 2016 г.); XXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика клинической лабораторной диагностики» (Москва, 21-23 марта 2017 г.); XXIII Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием (Москва, 12-14 мая 2021 г.).

Внедрение результатов работы в практику

Полученные результаты исследования внедрены в клиническую практику лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России. Материалы диссертации используются на лекционных, семинарских занятиях с курсантами циклов повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова МЗ РФ.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно были определены цель и задачи исследования и составлен план проведения всех этапов работы. Обзор литературы по изучаемой проблеме написан лично автором. Автор выполнял биохимические исследования и анализировал полученные результаты. При непосредственном участии автора был проведен анализ результатов исследования на основе современных методов вариационной статистики. Выводы и практические рекомендации были сформулированы автором самостоятельно.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 16 печатных работ, 6 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», глав «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, выводов и указателя цитируемой литературы. Общий объем диссертации 155 листов машинописного текста, иллюстрирована 50 таблицами и 26 рисунками. Указатель литературы содержит 204 источника, из них 18 работ отечественных и 186 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика больных опухолями костей

В исследование включено 105 больных злокачественными (саркомами) опухолями костей (ЗОК) в возрасте от 15 до 69 лет, из них: типичная (конвенциональная) остеосаркома (32), периостальная остеосаркома (1), паростальная остеосаркома (5), саркома Юинга (26), хондросаркома (32), недифференцированная плеоморфная саркома кости (9), а также 19 больных пограничными новообразованиями костей (гигантоклеточная опухоль кости). Группу контроля составили 26 практически здоровых доноров (15 мужчин, 11 женщин) в возрасте от 15 до 55 лет.

У всех больных клинический диагноз новообразования кости установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования новообразования согласно «Международной гистологической классификации опухолей костей» (ВОЗ, 2016г.).

Специальные лабораторные методы исследования

Концентрации маркеров исследовали в сыворотке крови ИФА наборами реактивов: FGF-1 – «Human FGF acidic» компании R&D (США), FGF-2 – «Human FGF basic» компании R&D (США), VEGF – «R&D» (США) на автоматическом ридере “Elx 800” (“Biotek Instruments Inc.”). Общую активность ЩФ – определяли спектрофотометрическим методом при использовании тест-системы на основе диэтаноламинового буфера на автоматическом анализаторе «Modular» («Roche», Швейцария).

Статистические методы анализа

Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и сравнения его с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квартили и применяли непараметрические методы сравнения несвязанных признаков (Kruskal-Wallis Anova & Median test при количестве сравниваемых групп более двух и Mann-Whitney при сопоставлении двух групп). При сравнении частот строили таблицы сопряженности признаков. Для расчета p использовали точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий хи-квадрат. Для частот, характеризующих чувствительность и специфичность, рассчитывали 95% ДИ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Проводили корреляционный анализ рангов Спирмена с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости. Также использовали регрессионную многофакторную модель Кокса. Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS в отделе информационных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови больных новообразованиями костей и в контроле. Распределения изученных уровней FGF-1 и FGF-2 отличалось от распределения Гаусса, поэтому для анализа различий применяли непараметрические методы, в качестве центральной характеристики маркеров использовали медиану, а в качестве меры разброса – квартили. За нулевые значения FGF-1 принято содержание маркера менее 13,9 пг/мл, в соответствии с указанной производителем наборов реактивов аналитической чувствительностью. Уровни FGF-1 $\geq 13,9$ пг/мл статистически значимо чаще ($p < 0,0001$) выявляли в сыворотке крови больных пограничными (100%) и злокачественными (65,7%) опухолями костей, по сравнению с контролем (26,9%), при этом маркер обладал низкими показателями чувствительности - 65,7% [95% ДИ=55,8-74,7%] и специфичности 73,1% [95% ДИ=52,2-88,4%] в диагностике сарком костей. При построении кривых ROC для FGF-2 в группе контроля и у больных саркомами костей площадь под кривой составила $55,1 \pm 6,3\%$, что также не позволяет рекомендовать FGF-2 в качестве диагностического маркера.

В контроле и у больных пограничными опухолями костей выявили статистически значимую обратную корреляционную зависимость между сывороточными уровнями FGF-1 и FGF-2 ($r = -0,62$; $p = 0,005$); у больных саркомами костей эта зависимость не обнаружена. При этом, выявление одновременно высоких уровней FGF-1 ≥ 20 пг/мл и FGF-2 ≥ 16 пг/мл позволяет заподозрить злокачественный характер новообразования кости.

Уровни FGF-1 в сыворотке крови не зависели от гистологического типа саркомы кости, тогда как концентрации FGF-2 у больных злокачественными опухолями костей были значимо выше при паростальной остеосаркоме (58 пг/мл) как по сравнению с контролем (11,9 пг/мл), так и по сравнению с хондросаркомой, типичной остеосаркомой.

Следует отметить, что частота одновременно высоких значений FGF-1 и FGF-2, не характерных для пограничных опухолей костей, выявлялась наиболее часто в сыворотке крови при типичной остеосаркоме - 28,1% и саркоме Юинга - 26,9%, по сравнению с хондросаркомой - 12,5%. Коэффициент соотношения FGF-1/FGF-2 был наибольшим в группе больных типичной остеосаркомой (по медиане почти в 3 раза) и наименьшим у больных хондросаркомой (в 2 раза), однако различия незначимы.

Различия уровней FGF-1 и FGF-2 в группах больных по полу были незначимы ($p > 0,05$), за исключением группы пациентов с типичной остеосаркомой, у которых медиана FGF-1 среди женщин была статистически значимо выше, чем у мужчин (79,9 и 44,7 пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Не установлено зависимости между содержанием FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови и возрастом в контроле и у больных опухолями костей всех групп.

Многофакторный анализ не установил связи значений FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови с возрастом больных пограничными и злокачественными опухолями костей различного гистологического строения ($p > 0,05$). Не выявлено корреляционной зависимости между показателями FGF-1, FGF-2 и ЩФ в сыворотке крови больных саркомами костей различного гистологического строения. При этом, частота превышения нормальных уровней общей активности ЩФ составила 25,9% при гигантоклеточной опухоли, 30% при недифференцированной плеоморфной саркоме (30%), 50% при типичной остеосаркоме, 28,6% при паростальной остеосаркоме, 32,4% при саркоме Юинга и 48,7% при хондросаркоме.

Провели анализ содержания FGF-1 и FGF-2 у больных саркомами костей в двух группах с учетом уровня общей активности ЩФ: 1) группа - ЩФ-норма (≤ 250 Е/л) и 2) группа - ЩФ-выше нормы (> 250 Е/л). При анализе содержания FGF-1 с учетом нормальных и повышенных уровней ЩФ в группе больных хондросаркомой медианы маркера в сыворотке крови не различались и составили соответственно 24,1 и 16,8 пг/мл ($p = 0,9$); в группе больных остеосаркомой медианы FGF-1 составили соответственно 23,5 и 58,3 пг/мл ($p = 0,15$); в группе больных саркомой Юинга медианы FGF-1 равнялись соответственно 23,6 и 61,1 пг/мл и различия между ними были статистически значимы ($p = 0,01$). При анализе содержания FGF-2 с учетом нормальных и повышенных уровней ЩФ у больных хондросаркомой медианы показателя не различались (20,4 пг/мл при ЩФ-норма и 10,7 пг/мл при ЩФ-выше нормы; $p = 0,6$). Аналогичный результат отмечен и для больных остеосаркомой - медианы FGF-2 составили соответственно 18,8 и 12,3 пг/мл ($p = 0,3$), а также в группе больных саркомой Юинга - 15,7 и 19,0 пг/мл соответственно. В то же время ни в одной из групп корреляционная зависимость между FGF-1, FGF-2 и уровнем общей активности ЩФ в сыворотке крови не установлена.

Дисперсионный анализ не выявил связи исходных показателей FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови с типом пораженной опухоли кости у больных саркомами костей и их гистологическим строением. У больных злокачественными

новообразованиями костей не установлено связи показателей FGF-1 и FGF-2 со степенью выраженности лечебного патоморфоза опухоли после проведенной неoadьювантной полихимиотерапии. Анализ полученных нами данных не выявил связи уровней FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови со стадией злокачественных опухолей костей и степенью их дифференцировки.

Показано, что медиана FGF-2 не зависела от гистологического строения сарком костей, за исключением группы пациентов с паростальной остеосаркомой, у которых отмечены статистически значимо высокие уровни маркера (58 пг/мл; $p < 0,05$); показана статистически значимая связь FGF-2 с возрастом в группе контроля, но не у больных; наибольший уровень FGF-2 выявлен при саркоме лонной (37,2 пг/мл), малоберцовой (20,3 пг/мл) и бедренной (19 пг/мл) костей.

Содержание VEGF в сыворотке крови больных новообразованиями костей и в контроле. Медиана VEGF в сыворотке крови группы контроля (338 пг/мл) не отличалась от пациентов с пограничными опухолями (170 пг), но была статистически значимо ниже, чем у больных саркомами костей (690 пг/мл) ($p < 0,0001$). При построении ROC кривых для VEGF в общей группе контроль + пограничные опухоли и в группе злокачественных опухолей костей, площадь под кривой составила $74,1 \pm 3,8\%$ и, таким образом, показатель не обладал приемлемыми диагностическими характеристиками в распознавании характера новообразования кости.

Следует отметить, что у больных пограничными опухолями и саркомами костей выявили статистически значимую прямую корреляционную зависимость сывороточных уровней VEGF с FGF-1, но не с FGF-2.

Дополнительно уровни VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей были разделены на 4 интервала: 1) до 420 пг/мл, 2) 421-690 пг/мл, 3) 691-950 пг/мл, 4) 951 пг/мл и более. Соответствующие частоты представлены на рисунке 1.

Выявлена статистически значимая связь уровней VEGF ($p = 0,004$) с гистологическим строением сарком костей. Так, наибольшая частота «высоких» (> 790 пг/мл) уровней VEGF отмечена в группе больных типичной остеосаркомой – 64,5% [95% ДИ=53,3-86,3%%] и саркомой Юинга – 48,0% [95% ДИ=56,4-91%%]. Реже «высокие» уровни маркера выявляли у больных паростальной остеосаркомой (33,3%) и хондросаркомой (18,8%) кости.

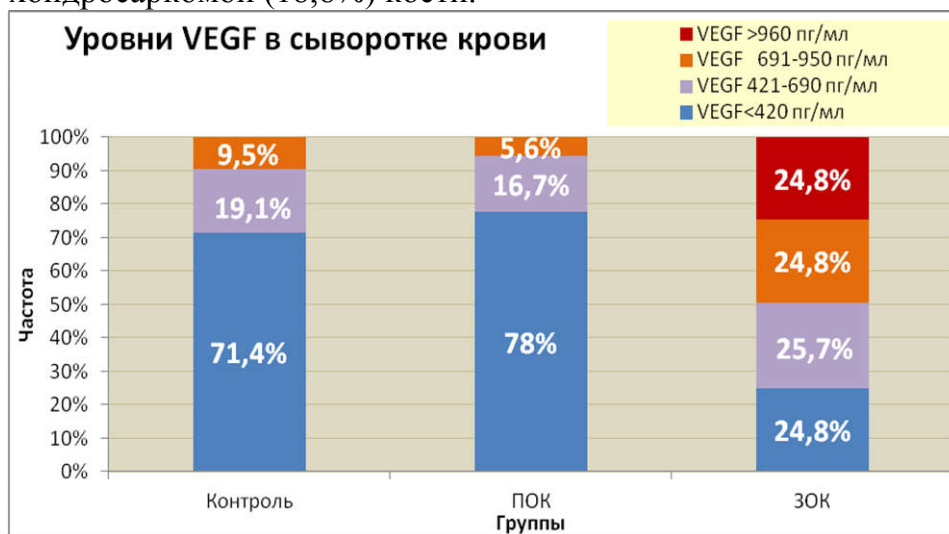


Рисунок 1. Частота выявления различных значений VEGF в сыворотке крови больных злокачественными и пограничными опухолями костей, а также в контроле.

Не выявлено различий в содержании VEGF в группах с учетом пола ($p>0,05$), за исключением типичной остеосаркомы, при которой медиана VEGF в сыворотке крови женщин была статистически значимо выше, чем у мужчин (1800 и 1130 пг/мл соответственно, $p<0,05$). Однако многофакторный анализ не подтвердил связи значений VEGF в сыворотке крови с возрастом больных различными злокачественными опухолями костей ($p>0,05$).

Медианы VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей с нормальными и высокими относительно нормы показателями ЩФ статистически значимо не различались ($p>0,05$), как и в группе больных пограничными опухолями. При анализе содержания VEGF с учетом уровней общей активности ЩФ в группе больных хондросаркомой кости медианы VEGF были сопоставимы (при ЩФ-норма - 645 пг/мл и ЩФ-выше нормы - 650 пг/мл). У больных типичной остеосаркомой медианы VEGF в сыворотке крови с учетом уровней общей активности ЩФ составили соответственно 1055 и 1760 пг/мл ($p<0,05$), тогда как у больных саркомой Юинга – 670 и 919 пг/мл соответственно ($p<0,05$).

В группе больных хондросаркомой кости с уровнем активности ЩФ-выше нормы корреляционная зависимость между ЩФ и VEGF была значимой ($r_s=0,61$; $p=0,016$). В других группах данная зависимость не обнаружена.

Многофакторным анализом не установлено связи исходных значений VEGF в сыворотке крови пациентов с типом (трубчатые, плоские) пораженной саркомой кости с различным гистологическим строением опухоли ($p>0,05$). Вместе с тем, концентрации VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей были заметно выше при поражении плечевой (1048 пг/мл), малоберцовой (950 пг/мл), подвздошной (800 пг/мл) и бедренной (735 пг/мл) костей, однако все наблюдаемые различия статистически не значимы.

У больных саркомой кости не установлено связи исходных показателей VEGF в сыворотке крови со степенью выраженности лечебного патоморфоза первичной опухоли и наибольшим размером новообразования.

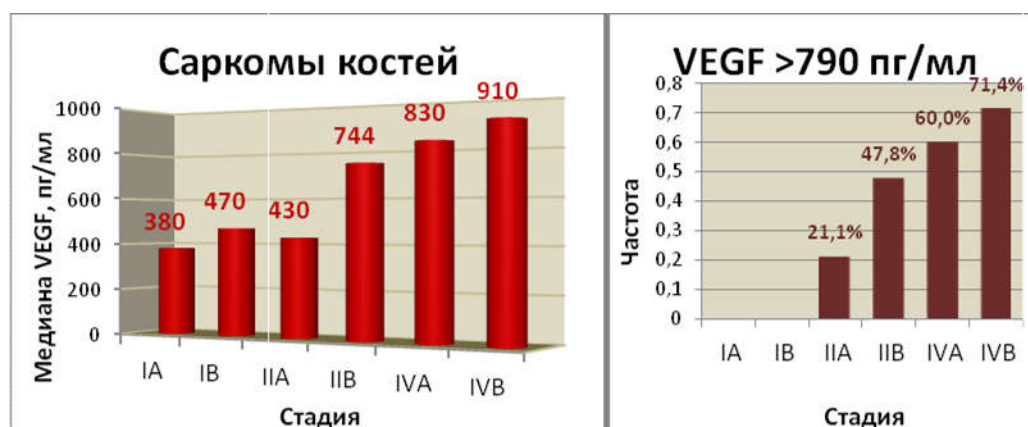


Рисунок 2. Содержание и частота выявления VEGF >790 пг/мл у больных саркомами костей в зависимости от стадии опухолевого процесса.

Выявлено статистически значимое увеличение медианы VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей по мере увеличения стадии опухолевого процесса с 380 до 910 пг/мл ($p=0,006$) (рисунок 2).

Не обнаружили связи сывороточных уровней VEGF с наличием регионарных и отдаленных метастазов, однако установлена статистически значимая связь маркера со степенью дифференцировки сарком костей.

Таким образом, медиана VEGF статистически значимо выше в группе больных саркомами костей по сравнению с пограничными новообразованиями и здоровыми донорами и связана прямой корреляционной зависимостью с уровнями FGF-1 как в группе больных злокачественными ($r_s=0,81$; $p<0,0001$), так и пограничными ($r_s=0,72$; $p<0,0001$) опухолями костей. При этом, в группе женщин, больных типичной остеосаркомой кости медиана VEGF была статистически значимо выше, чем у больных мужчинами. Кроме того, установлена статистически значимая связь концентраций VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей со стадией заболевания, гистологическим строением и степенью дифференцировки опухоли. Маркер VEGF не обладал достаточной диагностической ценностью: чувствительность теста при саркомах костей достигала 75,7% [95% ДИ=66,3-83,6%], специфичность 73,7% [95% ДИ=48,8-90,9%]; не отражал возраст больных, размер опухоли и степень ее лечебного патоморфоза, тип пораженной кости, локализацию опухоли в костях скелета; не значимо был связан с содержанием общей активности ЩФ в сыворотке крови.

Связь показателей общей выживаемости с биохимическими сывороточными маркерами у больных остеосаркомой кости. Выявлено, что при уровне FGF-1 $<13,9$ пг/мл в сыворотке крови медиана общей 5-летней выживаемости больных остеосаркомой не была достигнута на всем сроке наблюдения. В то же время, при концентрациях маркера $\geq 13,9$ пг/мл она составила 53 месяца, при этом показатели общей 5-летней выживаемости в этих группах составили 83,3% и 49,7% соответственно, различие статистически значимо ($p=0,019$; Cox'F-test) (таблица 1).

Таблица 1.

Показатели общей выживаемости больных остеосаркомой кости с учетом уровня FGF-1, FGF-2 (пг/мл) и ЩФ (Е/л) в сыворотке крови

Уровни маркеров	N	Медиана выживаемости (мес.)	Показатели общей выживаемости, %			
			1-летняя	2-летняя	3-летняя	5-летняя
FGF-1 $<13,9$	8	Не достигнута	100	83,3 \pm 15,2	83,3 \pm 15,2	83,3 \pm 15,2
FGF-1 $\geq 13,9$	23	53,0	78,3 \pm 8,6	65,2 \pm 9,9	60,2 \pm 10,4	49,7 \pm 10,9
P=0,019 Cox'F-test						
FGF-2 <10	9	Не достигнута	100	75,0 \pm 15,3	75,0 \pm 15,3	60,0 \pm 18,2
FGF-2 10-16	8	33,2	75,0 \pm 15,3	62,5 \pm 17,1	46,8 \pm 18,7	46,8 \pm 18,7
FGF-2 17-27	9	Не достигнута	77,7 \pm 13,9	77,7 \pm 13,9	77,7 \pm 13,9	62,2 \pm 17,9
FGF-2 >27	5	Не достигнута	80,0 \pm 17,9	53,3 \pm 24,8	53,3 \pm 24,8	53,3 \pm 24,8
P>0,05						
ЩФ-норма ≤ 250	16	Не достигн.	88,1 \pm 6,4	80,1 \pm 8,3	75,6 \pm 8,7	64,4 \pm 10,4
ЩФ-выше нормы >250	13	Не достигн.	85,2 \pm 6,8	70,4 \pm 8,8	56,5 \pm 10,1	51,8 \pm 10,1
P=0,37 Log-Rank test						

Примечание: N – прослеженные больные.

На основании представленных результатов исследования FGF-1 в сыворотке крови больных остеосаркомой кости следует считать данный маркер неблагоприятным прогностическим фактором. Анализ исходных уровней FGF-2 в сыворотке крови больных остеосаркомой кости не выявил связи данного фактора роста с показателями общей выживаемости этих пациентов (таблица 1). Уровни общей активности ЩФ в сыворотке крови также не были связаны с общей выживаемостью больных остеосаркомой кости.

Многофакторный анализ связи основных клинико-морфологических признаков и изучаемых биохимических маркеров сыворотки крови с отдаленными результатами терапии больных остеосаркомой показал, что наибольшей прогностической значимостью обладали стадия заболевания ($p=0,0038$) и исходные уровни FGF-1 в сыворотке крови ($p=0,0034$) (таблица 2).

Таблица 2.

Статистические характеристики прогностических факторов общей выживаемости (Proportional hazard (Cox) regression) в группе больных остеосаркомой кости

Фактор	Beta±m	t-value	Wald-statistica	P
Стадия	1,18±0,40	2,89	8,37	0,0038
G	4,13±2,47	1,67	1,80	0,194
ЩФ	-0,07±0,70	-0,1	0,01	0,92
FGF-1	0,016±0,005	2,93	8,57	0,0034
FGF-2	0,026±0,018	1,47	2,15	0,14

Проведен анализ показателей общей выживаемости больных типичной остеосаркомой в зависимости от исходного уровня VEGF в сыворотке крови. Показатель 5-летней общей выживаемости больных типичной остеосаркомой при неблагоприятных значениях сывороточного VEGF (≥ 690 пг/мл) снижался на 27%, по сравнению с группой пациентов, у которых уровень маркера был менее 690 пг/мл. И хотя различие в показателях выживаемости между группами было не значимо ($p=0,28$), такое снижение для данной категории больных существенно.

Связь показателей общей выживаемости с биохимическими сывороточными маркерами у больных саркомой Юинга. При анализе отдаленных результатов лечения больных саркомой Юинга (таблица 3), нами обнаружено, что показатель общей 2-летней выживаемости в группе пациентов с содержанием FGF-1 $<13,9$ пг/мл в сыворотке крови был не значимо выше (83,3%) такового, по сравнению с группой больных, у которых обнаружены более высокие уровни маркера (>60 пг/мл) (41,7%) ($p=0,4$ Cox'F-test). Однако показатели общей 5-летней выживаемости в трех группах больных саркомой Юинга не зависели от сывороточных концентраций FGF-1 и составили соответственно 50,0%, 50,8% и 41,7% (таблица 3). Обнаружено, что при повышении исходных уровней FGF-2 в сыворотке крови больных саркомой Юинга также отмечалось снижение показателей общей выживаемости пациентов, в том числе и на ранних сроках. В таблице 3 представлены данные о снижении общей 3-летней выживаемости больных саркомой Юинга в четырех группах при постепенном повышении исходных уровней сывороточного маркера FGF-2 (<10 , 10-16, 17-27, >27 пг/мл),

показатели 3-летней общей выживаемости составили соответственно 80,0%, 66,7%, 46,9% и 20,8%. При этом, следует отметить, что снижение показателей 5-летней общей выживаемости у больных саркомой Юинга при исходных значениях сывороточного маркера FGF-2 <10 пг/мл и >27 пг/мл были статистически значимыми и составили около 60% (p=0,032). Медиана выживаемости пациентов при «высоких» значениях FGF-2 (>27 пг/мл) сократилась до 19,2 месяцев и не была достигнута на всем сроке наблюдения при «низких» уровнях сывороточного маркера FGF-2 (<10 пг/мл) (таблица 3).

Таблица 3.

Показатели общей выживаемости больных саркомой Юинга в группах с различным исходным содержанием FGF-1, FGF-2 (пг/мл) и ЩФ (Е/л) в сыворотке крови

Уровни маркеров	N	Медиана выживаемости (мес.)	Показатели общей выживаемости, %			
			1-летняя	2-летняя	3-летняя	5-летняя
FGF-1 <13,9	6	Не достигн.	100	83,3±15,2	56,1±20,4	50,0±20,4
FGF-1 13,9-60	20	Не достигн.	92,9±6,9	69,6±12,7	60,9±13,8	50,8±14,8
FGF-1 >60	6	36,1	83,3±15,2	41,7±22,2	41,7±22,2	41,7±22,2
P=0,4 Cox'F-test						
FGF-2 <10	6	Не достигн.	100	100	80,0±17,9	80,0±17,9
FGF-2 11-16	6	33,8	100	66,7±19,2	66,7±19,2	44,4±22,2
FGF-2 17-27	8	31,8	87,5±11,7	62,5±17,1	46,9±18,7	46,9±18,7
FGF-2 >27	6	19,2	83,3±15,2	41,7±22,2	20,8±18,4	20,8±18,4
P=0,13						
ЩФ норма ≤250	14	Не достигн.	96,0±3,9	75,1±8,8	57,7±10,2	52,8±10,4
ЩФ выше нормы >250	12	26,2	82,5±11,3	61,9±15,2	38,7±16,3	38,7±16,3
P=0,31 Log-Rank test						

Примечание: N – прослеженные больные.

Обнаружено, что при повышении исходных уровней FGF-2 в сыворотке крови больных саркомой Юинга также отмечалось снижение показателей общей выживаемости пациентов, в том числе и на ранних сроках. В таблице 3 представлены данные о снижении общей 3-летней выживаемости больных саркомой Юинга в четырех группах при постепенном повышении исходных уровней сывороточного маркера FGF-2 (<10, 10-16, 17-27, >27 пг/мл), показатели 3-летней общей выживаемости составили соответственно 80,0%, 66,7%, 46,9% и 20,8%. При этом, следует отметить, что снижение показателей 5-летней общей выживаемости у больных саркомой Юинга при исходных значениях сывороточного маркера FGF-2 <10 пг/мл и >27 пг/мл были статистически значимыми и составили около 60% (p=0,032). Медиана выживаемости пациентов при «высоких» значениях FGF-2 (>27 пг/мл) сократилась до 19,2 месяцев и не была достигнута на всем сроке наблюдения при «низких» уровнях сывороточного маркера FGF-2 (<10 пг/мл) (таблица 3). Многофакторный анализ подтвердил статистически значимую корреляционную связь между показателями общей 5-

летней выживаемости у больных саркомой Юинга и исходными уровнями FGF-2 в сыворотке крови. Так, в группе больных саркомой Юинга с исходными уровнями FGF-2 <10 пг/мл показатель общей 5-летней выживаемости составил 80,0%, а с уровнями маркера >27 пг/мл - 20,8%. Данные этих выводов представлены в таблице 3.

Уровни общей активности ЩФ выше нормы (>250 Е/л) также указывали на связь с низкими показателями 3-летней общей выживаемости у больных саркомой Юинга, примерно на 20%, а 5-летней – на 10%, однако различия между этими показателями были незначимы ($p=0,31$ Log-Rank test).

Многофакторный анализ подтвердил статистически значимую связь между показателями общей выживаемости больных саркомой Юинга и уровнями FGF-2 в сыворотке крови ($p=0,007$; таблица 4).

Таблица 4.

Статистические характеристики прогностических факторов общей выживаемости (Proportional hazard (Cox) regression) в группе больных саркомой Юинга

Фактор	Beta±m	t-value	Wald-statistica	P
Стадия	0,25±0,28	0,89	0,80	0,37
G	0,74±0,58	1,28	1,64	0,20
ЩФ	-0,004±0,002	-1,62	2,62	0,11
FGF-1	0,015±0,01	1,58	2,52	0,11
FGF-2	0,077±0,028	2,68	7,18	0,007

Проведен анализ общей выживаемости у больных саркомой Юинга в зависимости от исходных концентраций VEGF в сыворотке крови. Выявлено снижение показателей 5-летней общей выживаемости в группе больных саркомой Юинга с неблагоприятными значениями сывороточного VEGF (≥ 690 пг/мл) на 29%, однако статистически значимых отличий по данному показателю у пациентов с уровнями маркера <690 пг/мл не отмечено ($p=0,22$).

Связь показателей общей выживаемости с биохимическими сывороточными маркерами у больных хондросаркомой кости.

Не установлено корреляционных связей между исходными показателями маркеров FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови больных хондросаркомой и отдаленными результатами лечения. Также не выявили отличий в показателях общей 3-летней выживаемости в трех группах больных хондросаркомой кости с разными исходными значениями FGF-2 в сыворотке крови (<10, 10-27, >27 пг/мл): 56,0%, 58,3% и 50,0% соответственно (таблица 5). Выявленная особенность отмечена и для показателей 5-летней общей выживаемости этих пациентов.

Проведенный нами однофакторный и многофакторный анализы связи основных клинико-морфологических признаков заболевания, а также изученных биохимических маркеров сыворотки крови (FGF-1, FGF-2, ЩФ) и отдаленных результатов лечения больных хондросаркомой кости показал, что наибольшей прогностической значимостью обладали исходные уровни общей активности ЩФ. Выявлено статистически значимое различие в показателях 5-летней общей выживаемости больных хондросаркомой с исходно нормальными уровнями общей активности ЩФ (≤ 250 Е/л) и повышенными уровнями фермента (>250 Е/л), которые составили 92,9% и 11,7% соответственно ($p=0,00038$ Log-Rank test).

Проведен анализ результатов общей 5-летней выживаемости у больных хондросаркомой в зависимости от исходных концентраций VEGF в сыворотке

крови. Обнаружено, что 5-летняя общая выживаемость больных хондросаркомой кости при неблагоприятных значениях сывороточного VEGF (≥ 690 пг/мл) снижалась всего на 8% и, стало быть, не зависела от исходных уровней проангиогенного маркера.

Таблица 5.

Показатели общей выживаемости больных хондросаркомой кости в группах с разным содержанием FGF-1, FGF-2 (пг/мл) и ЩФ (Е/л) в сыворотке крови

Уровни маркеров	Прослеженные больные	Медиана выживаемости (мес.)	Показатели общей выживаемости, %			
			1-летняя	2-летняя	3-летняя	5-летняя
FGF-1 <13,9	13	66,0	81,3±0,8	74,4±11,0	60,0±12,9	60,0±12,9
FGF-1 $\geq 13,9$	14	67,6	85,7±9,4	77,9±11,3	69,3±12,9	60,6±13,9
P=0,6						
FGF-2 <10	10	Не достигнута	80,0±12,6	70,0±14,5	56,0±17,0	56,0±17,0
FGF-2 10-27	10	36,6	70,0±14,5	58,3±16,1	58,3±16,1	58,3±16,1
FGF-2 >27	7	Не достигнута	83,3±15,2	66,7±19,2	50,0±20,4	50,0±20,4
P=0,7						
ЩФ норма ≤ 250	14	Не достигн.	92,9±6,9	92,9±6,9	92,9±6,9	92,9±6,9
ЩФ выше нормы >250	13	16,9	61,5±13,5	35,2±13,9	23,4±13,3	11,7±10,6
P=0,00038 Log-Rank test						

Проведенный нами однофакторный и многофакторный анализы связи основных клинико-морфологических признаков заболевания, а также изученных биохимических маркеров сыворотки крови (FGF-1, FGF-2, ЩФ) и отдаленных результатов лечения больных хондросаркомой кости показал, что наибольшей прогностической значимостью обладали исходные уровни общей активности ЩФ. Выявлено статистически значимое различие в показателях 5-летней общей выживаемости больных хондросаркомой с исходно нормальными уровнями общей активности ЩФ (≤ 250 Е/л) и повышенными уровнями фермента (> 250 Е/л), которые составили 92,9% и 11,7% соответственно ($p=0,00038$ Log-Rank test).

Проведен анализ результатов общей 5-летней выживаемости у больных хондросаркомой в зависимости от исходных концентраций VEGF в сыворотке крови. Обнаружено, что 5-летняя общая выживаемость больных хондросаркомой кости при неблагоприятных значениях сывороточного VEGF (≥ 690 пг/мл) снижалась всего на 8% и, стало быть, не зависела от исходных уровней проангиогенного маркера.

Таким образом, анализ клинических и лабораторных данных показал, что в группе больных остеосаркомой кости с отдаленными результатами лечения были

наиболее тесно связаны исходные сывороточные уровни FGF-1, а при саркоме Юинга - оба маркера и FGF-1, и FGF-2, но особенно следует отметить FGF-2.

Выживаемость больных злокачественными опухолями костей общей группы с учетом уровня VEGF в сыворотке крови. Провели анализ отдаленных результатов лечения в общей группе больных злокачественными опухолями с учетом уровней VEGF в сыворотке крови (рисунок 3).

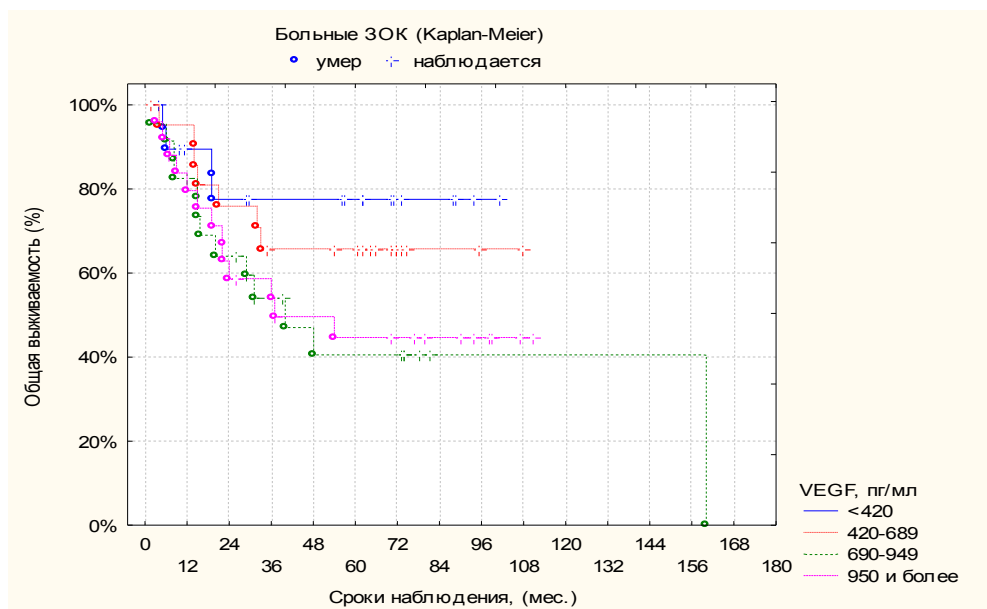


Рисунок 3. Отдаленные результаты лечения у больных злокачественными опухолями костей в зависимости от уровней VEGF в сыворотке крови.

Как следует из данных рисунка 3, наилучшие отдаленные результаты лечения отмечены у больных саркомами костей с низкими уровнями VEGF относительно медианы маркера (<690 пг/мл), а наихудшие – в группе со значениями маркера более 690 пг/мл. При таком разделении в общей группе больных саркомами получены статистически значимые различия в показателях выживаемости ($p=0,025$). Так, в группе больных саркомами костей со значениями VEGF <690 пг/мл 5-летняя общая выживаемость была достаточно высокой и составила $70,6\pm 7,5\%$, тогда как со значениями VEGF ≥ 690 пг/мл медиана длительности жизни равнялась всего 38,5 месяцев, а 5-летняя выживаемость составила только $42,8\pm 7,7\%$.

Многофакторный анализ выживаемости в основных группах больных саркомами костей: хондросаркомой, типичной остеосаркомой, саркомой Юинга. При многофакторном анализе выживаемости больных хондросаркомой кости установлено, что преимущественно отдаленные результаты лечения определяли высокие уровни общей активности ЩФ в сыворотке крови ($p=0,004$) и в меньшей степени тип пораженной кости ($p=0,12$) (таблица 6).

При многофакторном анализе выживаемости больных типичной остеосаркомой установлено, что отдаленные результаты лечения определяла стадия заболевания ($p=0,007$). При саркоме Юинга наиболее связанными с отдаленными результатами лечения оказались: стадия заболевания ($p=0,03$), тип

пораженной кости ($p=0,029$), а из маркеров - уровни FGF-2 в сыворотке крови ($p=0,13$) (таблица 6).

Таблица 6.

Многофакторный анализ (Proportional hazard (Cox) regression)
для больных злокачественными опухолями костей

Факторы	Вета	t-value	Wald statistic	P
	Хондросаркома			
Стадия	0,07±0,39	0,18	0,03	0,85
ЩФ-норма, Е/л	3,001±1,07	2,81	7,91	0,004
VEGF ≥690 пг/мл	1,046±1,93	0,54	0,29	0,59
FGF-1 ≥13,9 пг/мл	-1,223±1,91	-0,64	0,41	0,52
FGF-2, пг/мл	0,19±0,27	0,73	0,56	0,47
Тип кости	-1,054±0,67	-1,57	2,48	0,12
Остеосаркома				
Стадия	0,647±0,24	2,70	7,28	0,007
ЩФ норма, Е/л	0,216±0,43	0,50	0,25	0,62
VEGF ≥690 пг/мл	0,124±0,94	0,13	0,02	0,89
FGF-1 ≥13,9 пг/мл	0,628±1,71	0,54	0,29	0,59
FGF-2, пг/мл	0,124±0,29	0,42	0,18	0,68
Тип кости	-0,838±1,16	-0,72	0,52	0,47
Саркома Юинга				
Стадия	0,660±0,31	2,11	4,45	0,03
ЩФ норма, Е/л	0,309±0,52	0,60	0,36	0,54
VEGF ≥690 пг/мл	0,891±0,99	0,90	0,81	0,37
FGF-1 ≥13,9 пг/мл	-0,852±1,05	-0,81	0,66	0,42
FGF-2, пг/мл	0,469±0,30	1,52	2,31	0,13
Тип кости	-1,114±0,51	-2,18	4,74	0,029

Таким образом, наряду с общепризнанными клинико-морфологическими прогностическими факторами злокачественных опухолей костей – стадия, морфологически тип опухоли и степень ее дифференцировки, поиск биохимических маркеров в сыворотке крови, представленных в настоящем исследовании (FGF-1, FGF-2, общая активность ЩФ, VEGF), может в ряде наблюдений оказаться полезным не только для уточнения прогноза заболевания, но и для выявления новых мишеней таргетной терапии. Все выше указанное свидетельствует о необходимости продолжения этих исследований у данной категории больных.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что больных злокачественными и пограничными новообразованиями костей по сравнению с здоровыми донорами частота выявления в сыворотке крови FGF-1 была выше, зависела от типа пораженной кости, пола пациентов и морфологического варианта строения опухоли; уровни FGF-1 не различались между группами больных и контролем.

2. Обнаружено, что только при паростальной остеосаркоме у пациентов обнаружены статистически значимо высокие показатели FGF-2, по сравнению с другими морфологическими вариантами сарком костей.

3. Выявлены высокие уровни VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей, по сравнению с пограничными опухолями и здоровыми донорами, которые связаны со стадией заболевания, гистологическим строением и

степенью дифференцировки опухоли, не отражает возраст пациентов, локализацию, степень лечебного патоморфоза опухоли, тип пораженной кости, не связаны с содержанием общей активности ЩФ в сыворотке крови (за исключением больных хондросаркомой кости).

4. Доказано, что в сыворотке крови уровни VEGF связаны прямой корреляционной зависимостью с уровнями FGF-1 у больных пограничными и злокачественными опухолями костей. При этом, сывороточные концентрации FGF-1, FGF-2 и VEGF не могут быть использованы в диагностике новообразований костей в качестве самостоятельного микроинвазивного теста.

5. Анализ клинических и лабораторных данных обнаружил связь сывороточных концентраций FGF-1 с отдаленными результатами лечения больных остеосаркомой кости, а FGF-1 и FGF-2 - с саркомой Юинга.

6. Установлено, что высокие уровни общей активности ЩФ (>250 Е/л) у больных хондросаркомой и выявление FGF-1 в сыворотке крови пациентов с остеосаркомой коррелируют с низкими показателями 5-летней общей выживаемости.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Практические рекомендации предназначены врачам клинической лабораторной диагностики, онкологам, травматологам и ортопедам, работающим в специализированных онкологических стационарах.

1. В качестве дополнительных лабораторных маркеров оценки прогноза 5-летней общей выживаемости больных остеосаркомой кости рекомендуется использовать исходные до лечения уровни в сыворотке крови FGF-1, при саркоме Юинга - FGF-1 и FGF-2, при хондросаркоме - уровни общей активности ЩФ;

2. Выявление FGF-1 в сыворотке крови следует считать неблагоприятным фактором прогноза общей выживаемости у больных остеосаркомой кости.

3. Высокие исходные показатели как FGF-1 ($\geq 13,9$ пг/мл), так и FGF-2 (>27 пг/мл) в сыворотке крови больных саркомой Юинга рекомендуется использовать для оценки неблагоприятного 5-летнего прогноза клинического течения заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ по научной специальности диссертации:

1. Бабкина, И.В. Эндостатин, плацентарный фактор роста и факторы роста фибробластов первого и второго типа в сыворотке крови больных первичными опухолями костей / И.В. Бабкина, Е.А. Тен, Ю.Н. Соловьева, И.В. Булычева, Г.Н. Мачак, М.Д. Алиев, Н.Е. Кушлинский // Бюлл. Эксперим. Биол. Мед. – 2009. – Том 148. – № 8. – С. 218-222.

2. Бабкина, И.В. Факторы ангиогенеза в сыворотке крови при опухолях костей / И.В. Бабкина, И.Н. Кузнецов, Ю.Н. Соловьев, Е.Ю. Руссо, Е.А. Тен // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 10. – С. 31-33.

3. Бабкина, И.В. Молекулярно-биологические факторы прогноза при саркоме Юинга / И.В. Бабкина, Е.А. Тен, И.Н. Кузнецов, А.В. Бондарев, М.Ю. Щупак, Ю.Н. Соловьев, И.В. Булычева, М.Д. Алиев, Н.Е. Кушлинский // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 12. – С. 44-48.

4. Костылева, О.И. Кислый и основной факторы роста фибробластов и канцерогенез. Ч. 1. Механизм действия, ангиогенные и апоптотические эффекты / О.И. Костылева, Е.А. Тен, Н.Е. Кушлинский // Технологии живых систем. – 2015. – Том 12. – № 4. – С. 4-16.

5. Костылева, О.И. Кислый и основной факторы роста фибробластов и канцерогенез Ч. 2. Ауто/паракринные и лиганд независимые эффекты, связь со стероидогенезом и перспективы анти-ФРФ терапии при опухолях / О.И. Костылева, Е.А. Тен, Н.Е. Кушлинский // Технологии живых систем. – 2016. – Том 12. – № 1. – С. 14-24.

6. Тен, Е.А. Факторы роста фибробластов 1-го и 2-го типов в сыворотке крови при первичных злокачественных опухолях костей / Е.А. Тен, И.В. Бабкина, И.Н. Кузнецов, А.В. Бондарев, М.Ю. Щупак, Ю.Н. Соловьев, М.Д. Алиев // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 8. – С. 27-31.

Прочие публикации

7. Бабкина, И.В. Фактор некроза опухолей А (TNF-А) в сыворотке крови больных опухолями костей / И.В. Бабкина, Ю.Н. Соловьев, Е.А. Тен, И.В. Булычева / В материалах XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 12-16 апреля 2010г.) // М. – 2010. – С. 36.

8. Тен, Е.А. Фактор роста фибробластов 1 типа в сыворотке крови больных опухолями костей / Е.А. Тен, И.Н. Кузнецов, И.В. Булычева / В материалах XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 11-15 апреля 2011г.) // М. – 2011. – С. 236-237.

9. Лякина, Л.Т. Сывороточные факторы роста фибробластов первого и второго типа и эндостатин у больных первичной саркомой кости / Л.Т. Лякина, Ю.С. Тимофеев, Е.А. Тен, Ю.Н. Соловьев, И.В. Булычева, И.В. Казачок, Г.Н. Мачак, М.Д. Алиев / В материалах XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 23-27 апреля 2012г.) // М. – 2012. – С. 530.

10. Герштейн, Е.С. Компоненты системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови больных первичными опухолями костей / Е.С. Герштейн, Ю.С. Тимофеев, А.А. Зуев, Е.А. Короткова, Е.А. Тен, И.В. Булычева, Ю.Н. Соловьев, М.Д. Алиев / В материалах XIX Форума «Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 30 сентября – 2 октября 2015г.) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Том 60. – № 9. – С. 28-29.

11. Тен, Е.А. Фактор роста фибробластов первого типа у больных саркомами костей / Е.А. Тен / В материалах Второго Российского Конгресса Лабораторной медицины (Москва, 12-14 октября 2016 г.) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Том 61. – № 9. – С. 552.

12. Тен, Е.А. Эндостатин и факторы роста фибробластов 1 и 2 типа при новообразованиях костей / Е.А. Тен, И.В. Булычева, Ю.Н. Соловьев, А.В. Батырев, М.Д. Алиев / В материалах XXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика клинической лабораторной диагностики» (Москва, Крокус-Экспо, 21-23 марта 2017) // Лаборатория. – 2017. – № 2. – С. 56.

13. Алферов, А.А. Факторы роста фибробластов 1 и 2 типа в сыворотке крови при злокачественных опухолях костей / А.А. Алферов, Е.А. Тен, С.С. Бабкин, А.И. Батырев // Медицинский Академический Журнал. – 2016. – Том 16. – № 3. – С. 248-250.

14. Тен, Е.А. Клиническая характеристика факторов роста фибробластов 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных саркомами костей / Е.А. Тен, А.В. Бондарев, М.Ю. Щупак, И.В. Бабкина, Ю.Н. Соловьев, А.Н. Махсон // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Том 3. – № 4. – С. 129-130.

15. Тен, Е.А. Отдаленные результаты лечения больных хондросаркомой кости с учетом содержания в крови фактора роста фибробластов 2-го типа / Е.А. Тен, И.В. Бабкина, Е.С. Герштейн, И.В. Булычева, М.Д. Алиев / В материалах XXV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Наука и практика лабораторных исследований» // Лабораторная служба. 2020. – Том 9. – № 1. – С. 61.

16. Тен, Е.А. Клиническая значимость фактора роста фибробластов 1 типа в сыворотке крови больных опухолями костей / Е.А. Тен, И.В. Булычева, Е.А. Короткова, Е.С. Герштейн, Е.А. Сушенцов / В материалах XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 12-14 мая 2021 г.) // Клиническая лабораторная диагностика (приложение). – 2021. – Том 66. – № 4. – С. 69.