

## Прогностическое значение молекулярно-генетических маркеров у больных раком почки, получающих таргетную терапию

М.В. Петерс<sup>1</sup>, В.Е. Шевченко<sup>1</sup>, В.Б. Матвеев<sup>1</sup>, М.И. Волкова<sup>1</sup>, С.А. Калинин<sup>1</sup>, Д.М. Михайленко<sup>2</sup>, Д.В. Залетаев<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва; <sup>2</sup>НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Контакты: Мария Витальевна Петерс maria.peters.omega0803@mail.ru

**Цель исследования** — изучение прогностической значимости альтераций гена *VHL* и плазменных маркеров *hVEGF*, *hVEGFR-2*, *hVEGFR-3* у больных метастатическим раком почки (РП), получающих таргетную терапию.

**Материалы и методы.** Проанализированы парафиновые блоки от 22 пациентов с метастатическим РП, получавших таргетную терапию, на наличие мутации/метилирования гена *VHL*. Секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI3100 в соответствии с протоколами Applied Biosystems. Метилирование гена *VHL* определяли с помощью метилчувствительной ПЦР.

Количественное содержание маркеров *hVEGF*, *hVEGFR-2*, *hVEGFR-3* в плазме крови определяли у 43 пациентов до начала, на фоне и после окончания таргетной терапии. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью известных статистических методов при использовании блока статистических программ SPSS 13.0 for Windows. Выживаемость оценивали по методу Каплана—Майера. Различия в выживаемости групп пациентов определяли с помощью log-rank-теста. Для выявления прогностически значимых для выживаемости факторов использовали одно- и многофакторный регрессионный анализ Cox.

**Результаты.** Из 22 пациентов у 10 (45,5%) были выявлены мутации, у 1 (4,5%) — метилирование гена *VHL*. Инактивация гена *VHL* не влияла на прогноз у пациентов и результаты антиангиогенной терапии. Корреляционный анализ не выявил связи между концентрацией *hVEGF* и *hVEGFR-2* до и на фоне лечения, а также абсолютного прироста концентрации *hVEGF* и *hVEGFR-2* на фоне лечения с частотой прогрессирования на фоне таргетной терапии, выживаемостью без прогрессирования и общей продолжительностью жизни. Также не обнаружено корреляции между концентрацией *hVEGFR-3* и ее динамикой с результатами антиангиогенной терапии. Отмечена обратная корреляция уровня *hVEGFR-3* в плазме крови до лечения и времени жизни без прогрессирования на фоне антиангиогенной терапии ( $r = -0,477$ ,  $p = 0,039$ ).

**Вывод.** Альтерации гена *VHL*, уровень плазменного *hVEGF* и *hVEGFR-2* не являлись предикторами ответа на антиангиогенную терапию. Уровень *hVEGFR-3* в плазме крови до лечения коррелирует с выживаемостью без прогрессирования у больных РП, получающих таргетную терапию.

**Ключевые слова:** таргетная терапия, альтерации гена *VHL*, плазменные маркеры, прогностическая значимость

### Prognostic value of molecular genetic markers in kidney cancer patients receiving targeted therapy

M.V. Peters<sup>1</sup>, V.E. Shevchenko<sup>1</sup>, V.B. Matveev<sup>1</sup>, M.I. Volkova<sup>1</sup>, S.A. Kalinin<sup>1</sup>, D.M. Mikhailenko<sup>2</sup>, D.V. Zaletayev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Research Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

**Objective:** to study the prognostic value of alterations in the *VHL* gene and the plasma markers *hVEGF*, *hVEGFR2*, and *hVEGFR3* in patients with metastatic kidney cancer (KC) who receive targeted therapy.

**Subjects and methods.** Paraffin blocks from 22 patients with metastatic KC who received targeted therapy were analyzed for *VHL* gene mutation/methylation. Polymerase chain reaction (PCR) products were sequenced using a BigDye® Terminator v 3.1, a Cycle Sequencing Kit, and an ABI3100 genetic analyzer in accordance with the Applied Biosystems protocols. *VHL* gene methylation was determined by methyl-sensitive PCR. The markers *hVEGF*, *hVEGFR2*, and *hVEGFR3* were measured in the plasma of 43 patients before, during, and after targeted therapy, by applying the commercial DuoSet® ELISA kits (RnD Systems, USA). The results obtained were analyzed by known statistical methods, by using the package of statistical programs SPSS 13.0 for Windows. Survival was estimated by the Kaplan-Meier method. Survival differences were found by the log-rank test in the patient groups. Cox uni- and multi-factorial regression analyses were used to identify factors that were prognostically significant for survival.

**Results.** Out of 22 patients, 10 (45.5%) and 1 (4.5%) were found to have *VHL* gene mutations or methylation, respectively. *VHL* gene inactivation did not affect prognosis in patients and the results of antiangiogenic therapy. Correlation analysis revealed no relationship between the concentrations of *hVEGF* and *hVEGFR2* before and during therapy or absolute increases in *hVEGF* and *hVEGFR2* concentrations during treatment with the frequency of progression during targeted therapy, with progression-free survival, and total life expectancy. No correlation was either found between the *hVEGFR3* concentration and its changes and the results of antiangiogenic therapy. There was an inverse correlation between the pretreatment plasma *hVEGFR3* level and lifetime without progression during antiangiogenic therapy ( $r = -0.477$ ,  $p = 0.039$ ).

**Conclusion.** *VHL* gene alterations and plasma *hVEGF* and *hVEGFR2* levels are not predictors of a response to antiangiogenic therapy. The pretreatment plasma *hVEGFR3* level correlates with progression-free survival in KC patients receiving targeted therapy.

**Key words:** targeted therapy, *VHL* gene alterations, plasma markers, prognostic value

## Введение

Изучение генетических аспектов наследования рака почки (РП) привело к открытию гена *VHL*, локализованного на коротком плече 3-й хромосомы в области 3p25. *VHL* является геном опухолевой супрессии. Инактивация этого гена характерна для наследственных форм светлоклеточного РП, но также встречается и при спорадическом варианте СРП в 30–80% случаев. Открытие сигнального пути, связанного с *VHL*, а также других сигнальных патогенетических цепочек, играющих важную роль в туморогенезе, дало основание для разработки лекарственных препаратов, действующих на определенные звенья в этих цепочках, блокируя их и тем самым влияя на рост опухоли. Данные лекарственные (таргетные) препараты стали широко применяться в последнее время для лечения пациентов с диссеминированным РП в связи с большей эффективностью по сравнению с цитокиновой терапией, которая приводила к объективному ответу лишь в 15% случаев у довольно ограниченной популяции пациентов [1]. Ключевые мишени таргетных препаратов (VEGF, VEGFR 1, 2 и 3-го типов, PDGFR) гиперэкспрессируются в ответ на инактивацию гена *VHL* [2]. Следовательно, светлоклеточные карциномы, несущие молекулярно-генетические нарушения *VHL*, теоретически представляют собой наиболее оптимальные случаи для таргетной терапии, а уровни сывороточных VEGF и VEGFR могут служить в качестве потенциальных маркеров для прогнозирования эффективности проводимого лечения.

## Материалы и методы

Для изучения альтераций гена *VHL* в работе проведено исследование 24 архивных образцов (парафиновые блоки) от 22 пациентов с почечно-клеточным раком (ПКР). Получен 21 образец после операций (18 нефрэктомий и 3 резекции почки) у 21 пациента по поводу первичного РП. Один образец (№ 6) получен после операции у пациента по поводу местного рецидива РП. Три образца получены от 1 пациента: № 24 — после первичной нефрэктомии справа в 1998 г., № 2 и 5 — после резекции левой почки по поводу метастазов в 2004 и 2008 гг. соответственно.

Образцы опухолей, заключенные в парафиновые блоки, депарафинизировали с последующим выделением ДНК фенольным методом. Мутации *VHL* выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) экзонов 1–3 и последующего секвенирования. При проведении ПЦР отдельных экзонов использовали праймеры и условия, разработанные ранее и модифицированные в ходе выполнения настоящей работы. Реакционную смесь после проведения ПЦР проверяли с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) на отсутствие неспецифических продуктов амплификации. Секвенирование

проводили с использованием BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI3100 в соответствии с протоколами Applied Biosystems. Метилирование гена *VHL* определяли с помощью метилчувствительной ПЦР. Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 8% ПААГ.

Для определения уровня потенциальных плазменных маркеров использовалась свежзамороженная плазма крови 43 больных диссеминированным РП, получавших лекарственное лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с 2004 по 2010 г. Медиана возраста больных составила 56 (19–81) лет. Все 43 пациента получали VEGF-таргетную терапию в качестве 1-й ( $n = 25$ ) или 2-й линии ( $n = 18$ ) после цитокиновой терапии. VEGF-таргетная терапия включала ингибиторы тирозинкиназ ( $n = 29$ ), антитела к VEGF в сочетании с интерфероном  $\alpha$  ( $n = 7$ ) и комбинацию антител к VEGF и ингибиторов mTOR ( $n = 7$ ). Для анализа динамики потенциальных маркеров (hVEGF, hVEGFR-2, hVEGFR-3) у всех пациентов производили забор крови до, во время и после проведения таргетной терапии с последующим центрифугированием и заморозкой полученной плазмы до  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Оценку уровня потенциальных молекулярных маркеров в плазме крови больных РП до, на фоне и после окончания ангиогенной терапии проводили с помощью иммуноферментного анализа — ИФА — (ELISA). Определяли количественное содержание маркеров hVEGF, hVEGFR-2, hVEGFR-3 в плазме крови пациентов с помощью китов: hVEGF (каталожный номер # DY293B); hVEGFR-2/KDR (каталожный номер # DY357); hVEGFR-3 (Flt-4) (каталожный номер # DY349), DuoSet® ELISA, RnDSystems, США.

Для приготовления реагентов, образцов, стандартов использовали 2-кратные последовательные разведения стандартных концентраций (наивысшая стандартная концентрация для hVEGF — 2000 пкг/мл; для hVEGFR-2 — 12 000 пкг/мл; для hVEGFR-3 — 185 000 пкг/мл) и нулевой стандарт (разбавитель) 0 пкг/мл. Для построения стандартной кривой использовали 7–8 точек стандартного разведения. Проводили измерение на микропланшетном ридере Microplate Readers (Model 680Series, Bio-Rad, США) результатов исследования при 450 нм с коррекцией при 540 нм. Вычисление результатов проводилось в автоматическом режиме на программном обеспечении прибора Microplate Manager® Software, version 5.2.1 user guide, США.

Оценка эффекта проводимого лечения осуществлялась по критериям RECIST. Продолжительность жизни оценивали с первого дня консервативного лечения диссеминированного РП до последнего дня наблюдения или смерти. Для статистической обработки все данные о пациентах и результаты лечения были формализованы с помощью специально разработан-

ного кодификатора и внесены в базу данных, созданную на основе электронных таблиц EXCEL. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью известных статистических методов при использовании блока статистических программ SPSS 13.0 for Windows. Выживаемость оценивали по методу Каплана—Майера. Различия выживаемости в группах определяли с помощью *log-rank*-теста. Для выявления прогностически значимых для выживаемости факторов использовали одно- и многофакторный регрессионный анализ Сох. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию *t*-Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна—Уитни. Для сравнения качественных параметров применялся точный критерий Фишера и  $\chi^2$  с учетом непараметрических данных и нормального распределения Пуассона. Различия признавали значимыми при  $p < 0,05$ . Для выявления связи между признаками, имеющими количественное значение, проводился корреляционный анализ методом квадратов Пирсона. Корреляционная связь считалась сильной при коэффициенте корреляции  $r$ , составляющем от  $\pm 0,7$  до  $\pm 1$ , средней при  $r$  от  $\pm 0,3$  до  $\pm 0,699$ , слабой при  $r$  от 0 до  $\pm 0,299$ .

### Результаты

В табл. 1 приведены результаты анализа по наличию или отсутствию определенных альтераций гена *VHL* в 24 блоках.

Альтерации гена *VHL* наблюдались в 11 (50%) случаях, 10 (45,5%) из которых были представлены мутациями, а 1 (4,5%) — метилированием. Из 10 обнаруженных мутаций 3 были представлены делециями со сдвигом рамки считывания, 2 — нонсенс-мутациями, 1 — инсерцией со сдвигом рамки считывания, 1 — комплексной мутацией со сдвигом рамки считывания, 1 — комплексной мутацией без сдвига рамки считывания, 1 — миссенс-мутацией, описанной ранее, и 1 — дупликацией.

Все образцы (24 парафиновых блока) были представлены светлоклеточным ПКР (сПКР). У 4 была примесь другого компонента помимо сПКР. У 1 пациента (№ 1) кроме сПКР была примесь хромофобного рака, у пациентов № 4, 8, 11 — примесь саркоматоидного компонента.

Одна линия консервативного лечения проводилась 11 (50%) пациентам, 2 линии — 5 (31,8%), 3 линии получали 6 (18,2%) пациентов. Все пациенты получали таргетную терапию: 16 (72,7%) — 1 линию, 6 (27,3%) — 2 линии.

В 1-й линии 7 (31,8%) пациентов получали иммунотерапию интерфероном  $\alpha$ , 13 (59,1%) — анти-VEGF-препараты и 2 (9,1%) пациента — комбинацию анти-VEGF-препаратов и ингибиторов mTOR. Ме-

диана продолжительности 1-й линии терапии составила  $7,72 \pm 9,841$  мес. Стабилизация наблюдалась у 14 (63,6%) пациентов, прогрессирование — у 6 (27,3%), частичный эффект — у 1 (4,5%), полный эффект также у 1 (4,5%) пациента.

Во 2-й линии консервативного лечения все 11 пациентов получали анти-VEGF-препараты с медианой продолжительности лечения  $6,95 \pm 5,584$  мес. У 2 (18,2%) пациентов на фоне 2-й линии терапии наблюдалась стабилизация, у 2 (18,2%) — частичный ответ, у 6 (54,5%) отмечено прогрессирование опухолевого процесса, 1 (9,1%) пациент выбыл из наблюдения.

В 3-й линии терапии 2 пациента получали анти-VEGF-препараты, 2 — химиотерапию с медианой продолжительности лечения  $5,1 \pm 5,455$  мес. У всех пациентов отмечалась стабилизация опухолевого процесса.

Оценка влияния альтераций гена *VHL* на беспрогрессивную выживаемость осуществлялась при анализе времени от появления метастазов РП до прогрессирования на фоне таргетной терапии в 1-й линии, т. е. у 7 пациентов, которые получали цитокиновую терапию в качестве 1-й линии, а антиангиогенную терапию во 2-й, их беспрогрессивная выживаемость рассчитывалась с момента появления отдаленных метастазов до прогрессирования на фоне 1-й линии таргетной терапии.

Не отмечено зависимости результатов антиангиогенной терапии (частота контроля за опухолью, частота прогрессирования, выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость — ОВ) от инактивации гена *VHL* (табл. 2).

Оценить концентрацию плазменных маркеров (hVEGF, hVEGFR-2, hVEGFR-3) у всех 43 пациентов во всех точках (до, на фоне и после лечения) не удалось из-за гемолиза в некоторых образцах плазмы.

**Сосудистый эндотелиальный фактор роста в плазме крови (hVEGF).** Плазменная концентрация hVEGF до начала лечения оценена у 22 больных. Данный показатель варьировал в значительных пределах (табл. 3). Только у 3 (13,6%) из 22 больных РП уровень hVEGF находился в рамках концентрации этого маркера в сыворотке крови условно здоровых доноров ( $\leq 115$  пкг/мл).

На фоне лечения уровень hVEGF оценен у 35 пациентов. Медиана концентрации hVEGF в группе была равна  $632,3$  пкг/мл (см. табл. 3).

Данные о динамике уровня hVEGF получены у 20 пациентов. Повышение концентрации маркера отмечено в 10 (50,0%), снижение — в 10 (50,0%) случаях. Медиана разницы значений уровня hVEGF до и на фоне лечения составила  $26,3 \pm 602,5$  (от  $-1172$  до  $1577$ ) пкг/мл, что в процентном отношении было равно  $0,4 \pm 135,4\%$  (от  $-95$  до  $+361,0\%$ ). Медиана концентрации hVEGF на фоне лечения у данной группы больных оказалась достоверно выше исходной ( $p = 0,001$ ).

**Таблица 1.** Результаты анализа по наличию или отсутствию определенных альтераций гена *VHL* в 24 блоках

№ образца	Мутации / метилирование <i>VHL</i>
1-7, 11,12, 14,17,18,20	Не выявлено
8	c.168_184del (p.A57GfsX69), делеция со сдвигом рамки считывания, нет в UMD
9	c.253_260del (p.L85MfsX42), делеция со сдвигом рамки считывания, нет в UMD
10	Метилирование
13	c.481C→T (p.R161X), нонсенс-мутация, описана ранее Crosseу и соавт.
15	c.319_320insGC (p.R108AfsX52), инсерция со сдвигом рамки считывания, нет в UMD
16	c.350G→A (p.W117X), нонсенс-мутация, описана ранее Gnага и соавт.
19	c.545delG (p.R182SfsX20), делеция со сдвигом рамки считывания, нет в UMD
21	c.330_331delinsT (p.S111Afs48), комплексная мутация со сдвигом рамки считывания, нет в UMD
22	c.353_368delinsC (p.L118_G123delinsP), комплексная мутация без сдвига рамки считывания, нет в UMD
23	c.266T→C (p.L89P), миссенс-мутация, описана ранее Crosseу и соавт.
24	c.440dupT(p.A149C fs25X), дупликация, соматическая мутация

**Примечание.** В таблице рассматриваются изменения на нуклеотидном уровне по базе данных UMD (<http://www.umd.be/VHL/>).

После лечения уровень hVEGF определен у 7 больных (см. табл. 3). Достоверных различий уровня hVEGF после антиангиогенной терапии и концентраций до ( $p = 0,962$ ) и на фоне лечения ( $p = 0,974$ ) не выявлено.

**Таблица 2.** Результаты антиангиогенной терапии в зависимости от мутационного статуса гена *VHL*

Показатель	<i>VHL</i> не изменен (n = 11)	<i>VHL</i> инактивирован (n = 11)	<i>p</i>
Частота контроля за опухолью, n (%)	5 (45,5)	7 (63,6)	0,682
Частота прогрессирования, n (%)	6 (54,5)	4 (36,4%)	0,682
Беспрогрессивная выживаемость			
Медиана, M ± σ, мес	7,1±3,5	11,6±16,5	0,619
1 год, %	57,1	47,6	
ОВ			
Медиана, M ± σ, мес	16,4±11,3	19,1±8,7	0,317
1 год, %	66,7	36,4	

Корреляционный анализ не продемонстрировал связи между концентрацией hVEGF до и на фоне лечения, а также абсолютного прироста концентрации hVEGF на фоне лечения с частотой прогрессирования на фоне таргетной терапии, продолжительностью жизни без прогрессирования и общей продолжительностью жизни. Поиск корреляции уровня hVEGF после лечения и исхода заболевания не проводился ввиду малой выборки.

Динамика уровня маркера не влияла на прогноз. Частота прогрессирования среди больных со снизившимся и повысившимся на фоне анти-VEGF-терапии уровнем hVEGF была одинакова (2/10 и 2/10 больных соответственно,  $p = 0,709$ ). Однолетняя ОВ в группах составила 51,9 и 55,6 % соответственно ( $p = 0,537$ ).

**Рецепторы сосудистого эндотелиального фактора роста 2-го типа в плазме крови (hVEGFR-2).** Концентрация hVEGFR-2 до лечения антиангиогенными препаратами оценена у 19 больных. Данный показатель варьировал в широких пределах (0–23 673 пкг/мл). Из 19 пациентов у 4 уровень hVEGFR-2 соответствовал концентрации маркера в сыворотке крови условно здоровых доноров (6635–13 553 пкг/мл), у 2 был выше, а у 13 — ниже нормальных значений (см. табл. 3).

Концентрация hVEGFR-2 на фоне лечения, оцененная в 26 случаях, существенно колебалась; ее медиана была равна 5899 (2113–51 660) пкг/мл.

Таблица 3. Уровень hVEGFR-3, hVEGFR-2, hVEGF у больных РП до, на фоне и после лечения анти-VEGF-агентами, пкг/мл

Период	Медиана			Σ			Разброс		
	hVEGFR-3	hVEGFR-2	hVEGF	hVEGFR-3	hVEGFR-2	hVEGF	Маркер	min	max
До лечения	106268,0	5407	380,5	116825,4	6757,2	632,3	hVEGFR-3	32017	364342
							hVEGFR-2	0	32673
							hVEGF	69	3183
На фоне лечения	82563,9	5899	632,3	122139,8	9506,9	862,6	hVEGFR-3	11257	604565
							hVEGFR-2	2113	51660
							hVEGF	53	3412,5
После лечения	78108,0	9694	928	35945,7	5185,7	467,9	hVEGFR-3	40963	141879
							hVEGFR-2	2395	17765
							hVEGF	283	1531

Данные о динамике уровня hVEGFR-2 получены у 16 пациентов. Из них повышение концентрации маркера отмечено у 6, снижение — у 10 больных. Медиана разницы значений уровня hVEGFR-2 до и на фоне лечения составила  $-312,5 \pm 5197,9$  (от  $-16\ 236$  до  $+6593$ ) пкг/мл, что в процентном отношении было равно  $-5,7 \pm 57,6\%$  (от  $-64,5$  до  $+124,5\%$ ). Медиана концентрации hVEGFR-2 на фоне лечения у данной группы больных достоверно не отличалась от исходной ( $p = 0,534$ ).

После лечения уровень hVEGFR-2 определен у 7 больных. Достоверных различий уровня hVEGFR-2 после антиангиогенной терапии и концентраций до ( $p = 0,403$ ) и на фоне лечения ( $p = 0,139$ ) не выявлено, что может быть связано с малой выборкой (см. табл. 3).

Корреляционный анализ не выявил связи между показателями hVEGFR-2 (до начала терапии, на фоне лечения, прирост маркера) и результатами таргетной терапии (частота прогрессирования, продолжительность жизни без прогрессирования и общая продолжительность жизни) ( $-0,299 < r < 0,299, p > 0,05$ ).

Не отмечено значимого влияния динамики hVEGFR-2 на результаты антиангиогенной терапии. Прогрессирование зарегистрировано у 3 (30,0%) из 10 пациентов со снизившимся на фоне терапии уровнем маркера и у 1 (16,7%) из 6 больных с повышением концентрации hVEGFR-2 после начала лечения ( $p = 0,511$ ). Медиана ОВ в группах составила 11,5 и 13,2 мес соответственно ( $p = 0,651$ ).

**Рецепторы сосудистого эндотелиального фактора роста 3-го типа в плазме крови (hVEGFR-3).** Концентрация hVEGFR-3 до лечения антиангиогенными препаратами

оценена у 20 больных (см. табл. 3). Этот показатель варьировал в широких пределах ( $32\ 017-36\ 4342$  пкг/мл). Данные относительно концентрации маркера в сыворотке крови условно здоровых доноров отсутствуют.

Концентрация hVEGFR-3 на фоне лечения, оцененная в 27 случаях, существенно колебалась ( $11\ 257-60\ 4565$ ) пкг/мл.

Данные о динамике уровня hVEGFR-3 получены у 19 пациентов. Повышение концентрации маркера отмечено в 6, снижение — в 13 случаях. Медиана разницы значений уровня hVEGFR-3 до и на фоне лечения составила  $-28\ 228 \pm 107\ 526,23$  (от  $-302\ 302$  до  $240\ 223$ ) пкг/мл, что в процентном отношении было равно  $-22,8 \pm 41,1\%$  (от  $-84,6$  до  $+65,9\%$ ). Медиана концентрации hVEGFR-3 на фоне лечения у данной группы больных достоверно не отличалась от исходной ( $p = 0,102$ ).

После лечения уровень hVEGFR-3 определен у 6 больных. Достоверных различий уровня hVEGFR-3 после антиангиогенной терапии и концентраций до ( $p = 0,167$ ) и на фоне лечения ( $p = 0,221$ ) не выявлено, что может быть связано с малой выборкой (см. табл. 3).

Частота прогрессирования среди больных со снизившимся уровнем hVEGFR-3 на фоне лечения составила 30,8% (у 4 из 13 пациентов). Среди 6 больных с повысившейся концентрацией маркера прогрессирования не зарегистрировано ( $p = 0,184$ ) (табл. 4). Однолетняя ОВ в группах составила 59,8 и 60,0% соответственно ( $p = 0,256$ ).

Частота прогрессирования заболевания с концентрацией hVEGFR-3 и ее динамикой не коррелировала. Отмечена обратная корреляция уровня hVEGFR-3

**Таблица 4.** Корреляция уровня и динамики концентрации hVEGFR-3 с результатами таргетной терапии РП

Показатель	hVEGFR-3 до лечения	hVEGFR-3 на фоне лечения
Частота прогрессирования	$r = 0,139$ $p = 0,560$	$r = 0,148$ $p = 0,461$
Время жизни без прогрессирования	$r = -0,477$ $p = 0,039^*$	$r = -0,408$ $p = 0,053$
Общее время жизни	$r = -0,303$ $p = 0,207$	$r = 0,097$ $p = 0,639$

*Примечание.* Корреляционная связь достоверна при  $p < 0,05$ .

в плазме крови до лечения и времени жизни без прогрессирования на фоне антиангиогенной терапии ( $r = -0,477, p = 0,039$ ).

### Обсуждение

Альтерации гена *VHL*, приводящие к потере его функции, играют важнейшую роль в опухолевом патогенезе при РП. В нормальных клетках организма человека в результате метаболических реакций образуются факторы, индуцированные гипоксией (HIF), которые разрушаются в протеосомах после образования белкового комплекса в результате присоединения E3-убиквитин-лигазного комплекса и белка VHL. Такая деградация факторов HIF возможна в условиях нормоксии и при нормальной экспрессии белка VHL. В случае инактивации гена *VHL* синтезируется дефектный белок VHL и деградации HIF не происходит. В результате происходит накопление HIF, который проникает в ядро клетки, воздействуя на определенные гены-мишени, такие как ген *VEGF*, гены фактора роста тромбоцитов (*PDGF*), ген трансформирующего фактора роста  $\alpha$  (*TGF- $\alpha$* ) и ген основного фактора роста фибробластов (*FGF*), ответственные за ангиогенез, пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток [3–5].

Для ПКР характерны мутации типа loss of function (потеря функции), отсутствие горячих точек мутагенеза и преобладание делеций/инсерций над другими типами мутаций в отличие от ПКР при синдроме Хиппеля—Линдау, при котором преобладают миссенс-мутации в определенных частях *VHL* [6]. В нашей серии наблюдений из 10 мутаций делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания были представлены в 4 (40%) случаях. Это согласуется с данными, полученными рядом других авторов [7].

В серии наблюдений Т.К. Choueiri и соавт. при анализе 123 пациентов с метастатическим РП, получавших VEGF-таргетную терапию, мутации гена *VHL* наблюдалась в 48% случаев. У пациентов с мутацией гена *VHL* объективный ответ на проводимое лечение

наблюдался в 46% случаев по сравнению с 28% в группе без мутации гена *VHL* [8]. Схожие результаты были получены В.И. Rini и соавт., зарегистрировавшими объективный ответ на таргетную терапию у 48% пациентов с альтерациями гена *VHL*, по сравнению с 35% у больных без мутации или метилирования [9]. Среди больных с альтерациями гена *VHL* получавших пазопаниб, суммарный ответ на лечение составил 76% (частичный + стабилизация) по сравнению с 63% у пациентов без них [10]. Сходные данные были получены у пациентов с потерей функции мутированного гена *VHL*, достигших суммарного ответа на таргетную терапию 52% по сравнению с 31% у больных с неизменным *VHL* ( $p = 0,04$ ). [8] В нашем исследовании альтерации гена *VHL* встречались в 50% случаев, однако нам не удалось выявить зависимости между наличием альтерации исследуемого гена и частотой контроля за опухолью, частотой прогрессирования, временем до прогрессирования и продолжительностью жизни от начала таргетной терапии, что может быть связано с недостаточным числом наблюдений. В действительности данные в отношении прогностической значимости альтерации гена *VHL* противоречивы. К.М. Smits и соавт. не выявили влияния наличия альтерации гена *VHL* на специфическую выживаемость при сПКР [6]. В 2 других исследованиях соматические мутации гена *VHL* с потерей функции служили предикторами худшей ОВ [11, 12]. Безусловно, необходимо проведение дополнительных исследований для лучшего понимания роли мутаций гена *VHL* при спорадической форме РП, что особенно актуально в свете появившейся и бурно развивающейся таргетной терапии.

Рост опухоли во многом зависит от появления новых сосудов. Одним из наиболее хорошо изученных ангиогенных факторов является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), принадлежащий к семейству гомодимерных гликопротеинов, связывающийся с 3 различными рецепторами (VEGFR) тирозинкиназ. Под VEGF подразумевают семейство гликопротеинов, состоящее из 5 факторов роста, встречающихся у млекопитающих: VAGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста PLGF, а также пагарох-вирус-обусловленный фактор VEGF-E. Эти лиганды присоединяются к 3 различным рецепторам (VEGFR-1, 2, 3) тирозинкиназ, частично перекрывая друг друга [13].

В ряде исследований было показано, что VEGF в плазме крови коррелирует с клинической стадией и степенью дифференцировки опухоли [14–16], сосудистой инвазией ( $p = 0,03$ ), размером опухоли ( $p = 0,01$ ) [16] и выживаемостью [15–17]. В исследовании, включившем 302 больных РП с метастазами, начальный уровень сывороточного VEGF являлся фактором прогноза выживаемости без прогрессирования

и ОВ после проведенного лечения [17]. Тем не менее уровень сывороточного VEGF оказался недостаточно достоверным для достижения статуса независимого фактора прогноза в других исследованиях [15–19]. После назначения сунитиниба концентрация VEGF повышалась более чем в 3 раза у 44% пациентов и у больных с объективным ответом изменения в концентрации маркера были более выражены, чем у больных со стабилизацией или прогрессированием заболевания [20]. В серии наблюдений В.И. Rini и соавт. среди пациентов, получавших сунитиниб после прогрессирования на фоне терапии авастинном, концентрация плазменного VEGF-A достоверно увеличивалась, в то время как VEGF-C и VEGFR-3 снижались. Более низкие исходные уровни VEGFR-3 и VEGF-C достоверно коррелировали с беспрогрессивной и ОВ [21]. В другом исследовании уровень VEGF не влиял на ответ на сорафениб ( $p = 0,6$ ), но был ассоциирован с лучшей ОВ у этих больных ( $p = 0,01$ ) [22]. Корреляционный анализ в нашем исследовании не продемонстрировал связи между концентрацией hVEGF до и на фоне лечения, а также абсолютного прироста концентрации hVEGF на фоне лечения с непосредственными и отдаленными результатами антиангиогенной терапии, хотя медиана концентрации hVEGF на фоне лечения оказалась достоверно выше исходной ( $p = 0,001$ ).

Несмотря на важную роль VEGF, его прогностическое значение требует дальнейших доказательств. Оценка уровней VEGF как фактора прогноза в настоящее время проводится в 2 независимых исследованиях (NCT00538772, NCT00930345).

Существует 3 разновидности рецепторов к сосудистому эндотелиальному фактору роста: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1), VEGFR-3 (Fly-4). VEGFR-1 экспрессируется на эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, VEGFR-2 — на эндотелиоцитах и клетках кровеносных и лимфатических сосудов, VEGFR-3 — на эндотелиоцитах лимфатических сосудов. Также эти рецепторы экспрессируются на эпителиальных и эндотелиальных клетках ПКР.

Изменения уровней сывороточных VEGFR при применении ингибиторов тирозинкиназ возникают за счет блокирования соответствующих рецепторов. Однако механизм появления сывороточных фракций VEGFR до конца неясен: возникают ли они за счет

изменения при синтезе самого рецептора, за счет его так называемого опрокидывания, протеолитического расщепления или вследствие комбинации этих событий. Согласно данным S.E. DePrimo у пациентов с метастатическим ПКР после назначения сунитиниба уровень сывороточного VEGFR-2 снижался на 30% и более у 91% пациентов и на 20% и более у всех пациентов во время первого цикла лечения, в то время как уровень сывороточного VEGFR-3 снижался на 30% и более у 87% пациентов и на 20% и более у всех пациентов, кроме 2. После 2-недельного перерыва в лечении уровень этих маркеров возвращался практически к исходному значению до лечения. У пациентов с объективным ответом на лечение наблюдались большие изменения в уровнях сывороточных VEGFR, чем у пациентов со стабилизацией или прогрессированием заболевания [20]. В исследовании В.И. Rini исходно более низкий уровень VEGFR-3 ассоциировался с более длительной беспрогрессивной и ОВ [21].

В нашей работе не было выявлено корреляции между уровнем плазменного hVEGFR-3 до лечения, его приростом на фоне лечения с ОВ и прогрессированием заболевания, также не отмечено корреляции между беспрогрессивной выживаемостью и приростом маркера на фоне антиангиогенной терапии. Однако показана статистически достоверная обратная корреляция уровня hVEGFR-3 в плазме крови до лечения и временем жизни без прогрессирования на фоне антиангиогенной терапии ( $r = -0,477$ ,  $p = 0,039$ ), т. е. чем ниже был исходный уровень VEGFR-3, тем дольше была беспрогрессивная выживаемость. Это подтверждает потенциально важное прогностическое значение hVEGFR-3 у больных РП, получающих антиангиогенную терапию.

### Заключение

Уровень hVEGFR-3 в плазме крови до лечения у больных РП, получающих таргетную терапию, является потенциальным маркером беспрогрессивной выживаемости. Дальнейшее изучение молекулярно-генетических факторов прогноза крайне актуально у пациентов, получающих таргетную терапию, для возможности индивидуализации проводимой терапии с целью повышения ее эффективности и уменьшения экономических затрат.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wood C.G. Multimodal Approaches in the Management of Locally Advanced and Metastatic Renal Cell Carcinoma: Combining Surgery and Systemic Therapies to Improve Patient Outcome. Clin Cancer Res 2007; 13(Suppl 2):697–702.

2. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Пер. с англ. М.: Мир, 1999. 558 с.  
3. Hansel D.E., Rini B.I. Molecular genetics of hereditary renal cancer: new genes and diagnostic and therapeutic opportunities.

Expert Reviews in Anticancer Therapy 2008; 8:895–905.  
4. Linehan W.M., Walther M.M., Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. J Urol 2003; 170:2163–72.

5. Linehan W.M., Zbar B., Klausner R.D. The genetic basis of human cancer, chapter 27 (Renal carcinoma). 2<sup>nd</sup> ed. USA.: McGraw-Hill Companies, 2002.
6. Smits K.M., Schouten L.J., Dijk B.A. et al. Genetic and epigenetic alterations in the von Hippel-Lindau gene: the influence on renal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2008;14:782–7.
7. Gallou C., Joly D., Mejean A. et al. Mutations of the *VHL* gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for *VHL* patients to develop an RCC. *Hum Mutat* 1999; 13: 464–75.
8. Choueiri T.K., Vaziri S.A.J., Jaeger E. et al. von Hippel-Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2008;180(3):860–5.
9. Rini B.I., Jaeger E., Weinberg V. et al. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU International*. 2006 Oct 1; 98(4):756–62.
10. Hutson T., Davis I.D., Macheils J.H. et al. Biomarker analysis and final efficacy and safety results of a phase II renal cell carcinoma trial with pazopanib (GW786034), a multi-kinase angiogenesis inhibitor. *J Clin Oncol* 2008;26.
11. Kim J.H., Jung C.W., Cho Y.H. et al. Somatic VHL alteration and its impact on prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2005;13: 859–64.
12. Van Houwelingen K.P., van Dijk B.A., Hulsbergen-van de Kaa C.A. et al. Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study. *BMCCancer* 2005;5:57.
13. Ferrara N., Gerber H.P., Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6):669–76.
14. Rioux-Leclercq N., Fergelot P., Zerrouki S. et al. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol* 2007;38(10):1489–95.
15. Jacobsen J., Rasmuson T., Grankvist K., Ljungberg B. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2000;163(1):343–7.
16. Klatte T., Böhm M., Nelius T. et al. Evaluation of peri-operative peripheral and renal venous levels of pro- and anti-angiogenic factors and their relevance in patients with renal cell carcinoma. *BJU International*. 2007;100(1):209–14.
17. Negrier S., Perol D., Menetrier-Caux C. et al. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6—from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol* 2004 Jun 15; 22(12):2371–8.
18. Alamdari F.I., Rasmuson T., Grankvist K., Ljungberg B. Angiogenesis and other markers for prediction of survival in metastatic renal cell carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 2007;41(1):5–9.
19. Schips L., Dalpiaz O., Lipsky K. et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin in renal cell carcinoma patients compared to a control group. *Eur Urol* 2007;51(1):168–73.
20. Deprimo S.E., Bello C.L., Smeraglia J. et al. Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins. *J Transl Med* 2007;5:32.
21. Rini B.I., Michaelson M.D., Rosenberg J.E. et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26(22):3743–8.
22. Escudier B., Eisen T., Stadler WM. et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* 2009;27(20):3312–8.