

На правах рукописи

АЛЕЙНОВ Вячеслав Игоревич

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2020

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ УЧРЕЖДЕНИИ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (генеральный директор – член-корреспондент РАН, д-р мед. наук, профессор **О.И. Кит**)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. РАН
Кит Олег Иванович

Официальные оппоненты: **Спирина Людмила Викторовна** – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Научно-исследовательский институт онкологии, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей

Егоров Алексей Викторович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Университетская клиническая больница №1, заведующий хирургическим абдоминальным отделением

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится "___" _____ 2020 г. в ___ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.208.083.02 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.rnioi.ru федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан "___" _____ 2020 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
доктор биологических наук, доцент

Дженкова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (PNET) составляют гетерогенную группу опухолей, происходящих из нейроэндокринных клеток (Kim J.H. et al., 2016). PNET считаются потенциально злокачественными опухолями (Canellas R. et al., 2018). Заболеваемость PNETs достигает 10% в опухолях поджелудочной железы (Kim J.H. et al., 2016). Уровень обнаружения случайных PNETs во время процедур визуализации КТ или МРТ увеличивается (Baur A.D. et al., 2016; Lotfalizadeh E. et al., 2017).

В соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), PNET были классифицированы на высокую (G1), среднюю (G2) и низкую (G3) на основе индекса Ki-67 и митотической активности (Bosman F.T. et al., 2010). Тем не менее, G3 PNET является более разнородной, чем ожидалось, и результат выживания отличается среди пациентов PNET G3. Поэтому классификация ВОЗ была пересмотрена в 2017 году (Basturk O. et al., 2015; Milione M. et al., 2017). Предыдущая нейроэндокринная карцинома G3 была разделена на низко дифференцированную нейроэндокринную опухоль (NET G3) и нейроэндокринную опухоль с повышенной пролиферативной активностью (NEC G3), а последняя была далее разделена на мелкий тип клеток и крупный тип клеток (Kang J. et al., 2018).

Нейроэндокринная карцинома поджелудочной железы (PNEC) является редкой опухолью, на которую приходится 2-3% нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы (PNEN) (Lewis R.V. et al., 2010; Kim J.H. et al., 2013; Guo C. et al., 2018). В последнее время в нескольких исследованиях сообщалось, что PNEC обычно демонстрирует гиповаскулярную картину при компьютерной контрастной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) с усилением контраста (Cappelli C. et al., 2015; Kim D.W. et al., 2015; Lotfalizadeh E. et al., 2017). Кроме того, плохо определенные границы и инвазия лимфатических узлов также распространены в PNEC. Эти ключевые особенности визуализации также являются критическими результатами визуализации при аденокарциноме протоков поджелудочной железы (PDAC). Ранее сообщалось о совпадениях в результатах визуализации между PNEC и PDAC (Gandhi N.S. et al., 2018). В исследовании

было обнаружено, что 57% PNEC были неправильно диагностированы как PDAC (Guo C. et al., 2017; Ren S. et al., 2019).

Стратегии лечения и прогноз PNEC и PDAC существенно различаются. Для PNEC хирургическая терапия доступна, если лечебная резекция возможна, даже в случаях с ограниченными метастазами (Lee L. et al., 2015; Ito T. et al., 2017). Кроме того, в нескольких сообщениях указывается, что терапия сунитинибом или эверолимусом также полезна для PNEC (Gilabert M. et al., 2017; Liu D.J. et al., 2017). Обычно прогноз PNEC лучше, чем PDAC. Следовательно, правильная идентификация PNEC и PDAC является важным предварительным условием лечения.

Несколько исследований показали, что КТ и МРТ полезны для дифференциальной диагностики гиповаскулярных опухолей поджелудочной железы (Guo C. et al., 2017; Jeon S.K. et al., 2017). В последнее время текстурный анализ, который извлекает, анализирует и интерпретирует количественные характеристики изображений, широко используется для диагностики, характеристики и улучшения оценки стадий опухоли и оценки ответа на терапию в области рака (Lubner M.G. et al., 2017).

Поскольку PNEC являются наиболее частой причиной смерти у пациентов, важно идентифицировать их как можно раньше. Исследователи показали, что существующие циркулирующие опухолевые маркеры PNET не имеют достаточной диагностической ценности (Qiu W. et al., 2016). Таким образом, важно определить альтернативные и дополнительные факторы риска для PNET, чтобы улучшить раннее выявление и, возможно, прогноз этих пациентов.

Цель работы: поиск вспомогательных дифференциально-диагностических лабораторных показателей нейроэндокринной аденокарциномы поджелудочной железы.

Задачи исследования

1. Определить частоту выявляемости нейроэндокринной дифференцировки в протоковых аденокарциномах поджелудочной железы. Провести анализ выживаемости пациентов в зависимости от доли нейроэндокринной дифференцировки в протоковой аденокарциноме поджелудочной железы.

2. Изучить содержание стероидных гормонов, их предшественников и АКТГ в крови больных различными заболеваниями поджелудочной железы.

3. Изучить содержание факторов роста (VEGF-A, VEGF-C, IGF-I, IGF-II, TGF- β), их рецепторов (VEGF-R1, VEGF-R3, TGF β -R2) и белков-переносчиков (IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3) в крови больных с патологией поджелудочной железы.

4. Изучить содержание продуктов ПОЛ, ферментов антиокислительной системы и витаминов-антиоксидантов в крови больных с патологией поджелудочной железы.

5. Разработать вспомогательные лабораторные способы дифференциальной диагностики заболеваний поджелудочной железы.

Научная новизна

В диссертационном исследовании впервые:

- в крови больных различными заболеваниями поджелудочной железы изучено содержание половых гормонов, кортизола, их предшественников и АКТГ и выявлены специфические для нейроэндокринного компонента изменения. Получено положительное решение о выдаче патента от 21.07.2020 по заявке 2019140751 09.12.2019;

- в сравнительном аспекте в крови больных различными заболеваниями поджелудочной железы изучено содержание факторов роста, их рецепторов и белков-переносчиков, найдены критерии повышенного риска развития аденокарциномы с нейроэндокринным компонентом. При этом уровень отношения TGF- β к TGFR2 служит информативным лабораторным тестом для предикторной оценки характера заболевания. Патент № 2722276 РФ, опубл. 28.05.2020, бюл. №16.

Теоретическая и практическая значимость

Показано участие предшественников половых гормонов, факторов роста - семейства VEGF, TGF- β , рецептора TGFR2, IGF-I, IGF-II, их белков-переносчиков и системы ПОЛ-АО в развитии нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы.

Определение ДГЭА-S и 17ОНР в крови является информативными лабораторными тестами для предикторной оценки характера заболевания поджелудочной железы.

Соотношение уровня белка TGF- β и его рецептора TGFR2 является прогностическим лабораторным тестом для дифференциальной диагностики аденокарциномы с нейроэндокринным компонентом.

Клиническое применение разработанных способов позволит уже на этапе обследования выделять группы больных с высоким риском развития аденокарциномы поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом с целью своевременного проведения адекватных лечебных мероприятий.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой работы, выполненной в дизайне открытого проспективного сравнительного исследования с применением общеклинических диагностических, лабораторных, анамнестических и статистических методов, явилось последовательное применение методов научного познания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При применении иммуногистохимического анализа в ткани опухоли поджелудочной железы нейроэндокринный компонент выявляется в 76,7% случаев.

2. На этапе обследования больных с патологией поджелудочной железы целесообразно проводить биохимическое исследование крови – уровень половых гормонов, кортизола, DEGA-S, 17-ОНР, АКТГ, факторы семейства VEGF, TGF- β и его рецептора TGFR2, инсулиноподобные факторы роста и их белки-переносчики 2 и 3, систему ПОЛ-АО.

Апробация диссертации

Апробация диссертации состоялась 22.06.2020 г. на заседании Ученого Совета при ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ.

Основные результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, опубликованы в 19 печатных работах, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК, получен патент на изобретение Российской Федерации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики,

молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» паспорта специальности 14.01.12 – онкология.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, 5 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 21 отечественных и 272 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 29 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основу диссертационной работы составили данные клинико-лабораторного исследования 51 больного заболеваниями поджелудочной железы, проходивших лечение в НМИЦ онкологии Минздрава РФ в период с 2017 по 2019 годы (рис. 1).

Пациентам со злокачественным процессом было проведено хирургическое лечение. Распределение больных в исследуемой группе по полу, возрасту, морфологическому типу заболевания, степени дифференцировки и стадиям аденокарциномы представлено на рисунке. Возраст больных колебался от 50 до 79 лет, средний возраст (медиана) составил 60 ± 2.9 года. Соотношение мужчин к женщинам было 1,125 к 1,0.



Рисунок 1 - Материалы и методы исследования

Методы биохимического исследования

В крови больных хроническим панкреатитом, аденокарциномой поджелудочной железы, нейроэндокринным раком поджелудочной железы и

аденокарциномой поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом с помощью стандартных тест-систем ИФА методами определяли уровень: VEGF-A и его рецептора VEGF-R1, VEGF-C и его рецептора VEGF-R3, TGF- β 1 (BenderMedSystem, Австрия), TGF- β RII (RayBiotech, США), IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 (MedDiagnost, Германия), тиоловый статус (Immundiagnostic, Германия), содержание изоформ супероксиддисмутазы СОД1, СОД3 и глутатионпероксидазы 1 (AbFrontier, Корея), ГПО 3 и каталазы (Cloud-Clone Corporation, США. Определение активности глутатионредуктазы (ГР) осуществляли по скорости окисления НАДФН по методу Л.Б.Юсуповой (1989), а количественное определение концентрации ГР проводили ИФА методом (CUSABIO, Китай). Содержание восстановленного глутатиона (GSH) определяли методом Арутюнян А.В. и др. (2000). Содержание в плазме и эритроцитах крови диеновых конъюгатов определяли по методу Копыловой Т.Н. (1982). Уровень МДА оценивали с помощью колориметрического метода (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977), основанного на образовании в кислой среде окрашенного «триметинового» комплекса при взаимодействии малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой. Для определения уровня альфа-токоферола (витамин Е) и ретинола (витамин А) в плазме крови использовали наборы Cloud-Clone Corporation (США). Радиоиммунным методом определяли уровень адренокортикотропного гормона, дегидроэпиандростерон сульфата, 17-гидроксипрогестерона, прогестерона, эстрадиола, тестостерона и кортизола (стандартные тест-наборы фирмы Иммунотех, Чехия; анализатор «Ариан», Россия). Для автоматизации статической обработки полученных результатов исследования использован аналитический пакет программы Excel for Windows и пакет Statistica for Windows 6.0 v.13.3.

При нормальном распределении выборки определение средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$), показателя достоверности (p) позволяло проводить оценку, применяя параметрический критерий Стьюдента. При ненормальном распределении были использованы непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона.

Методы гистологического исследования

Операционный материал фиксировали 24 часа в 10%-забуференном нейтральном формалине. Вырезку операционного материала осуществляли

согласно международным критериям. Гистоологические препараты изготавливали по стандартной методике. Для иммуногистохимического исследования (ИГХИ) готовили срезы толщиной 3-4 мкм на ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200 фирмы Sakura (Япония). Срезы наносили на адгезивные положительно заряженные стекла, которые высушивали вертикально в течение 10 часов при помощи термостата (температура 55-56°C). Депарафинизацию, восстановление антигенной активности и все этапы иммуногистохимической реакции, а также докраску гематоксилином проводили в иммуногистостейнере VENTANA BenchMark ULTRA фирмы Roche. В качестве системы детекции первичных антител была использована «UltraView Universal DAB Detection», произведенная фирмой Ventana Medical Systems для VENTANA BenchMark ULTRA. Антитела, использованные для иммуногистохимических реакций, их производитель, клон, рабочее разведение и условия демаскировки антигенов при 97°C: Ki-67 (SpringBio, SP6, 1:200, Трис-ЭДТА буфер pH=9 в 36 мин), Synaptophysin (Cell Marque, MRQ-40, 1:300, Трис-ЭДТА буфер pH=9 в 64 мин), Chromogranin A (Cell Marque, LK2H10, 1:400, Трис-ЭДТА буфер pH=9 в 36 мин). Экспрессию антител оценивали по проценту положительных клеток в опухоли. Экспрессия нейроэндокринных маркеров была оценена отдельно и после оценки клетками с нейроэндокринной дифференцировкой считали те в которых была обнаружена экспрессия хромогранина А и/или синаптофизина. Маркер пролиферативной активности (Ki-67) был подсчитан в «горячих точках» (участках скопления наибольшего количества позитивно окрашенных опухолевых клеток). Для построения кривых выживания и расчета среднего времени выживания был использован метод Каплана-Мейера. Разница между группами по выживаемости сравнивалась с использованием логарифмического рангового критерия. Сравнения групп по клинко-патологическим параметрам были оценены с использованием критерия хи-квадрат Пирсона, скорректированным поправкой Йейтса для непрерывности. Все статистические анализы были выполнены с использованием SPSS 16.0 для Windows (SPSS, Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Все значения P были двусторонними, и считалось, что P <0,05 указывает на статистически значимое различие.

Результаты исследования

На первом этапе мы изучили послеоперационный материал 30 больных раком поджелудочной железы (рис. 2). По классификации 8-го издания рTNM 12 пациентов были отнесены к I стадии, и 18 - ко второй (IIA - 7 пациентов, IIB - 11).

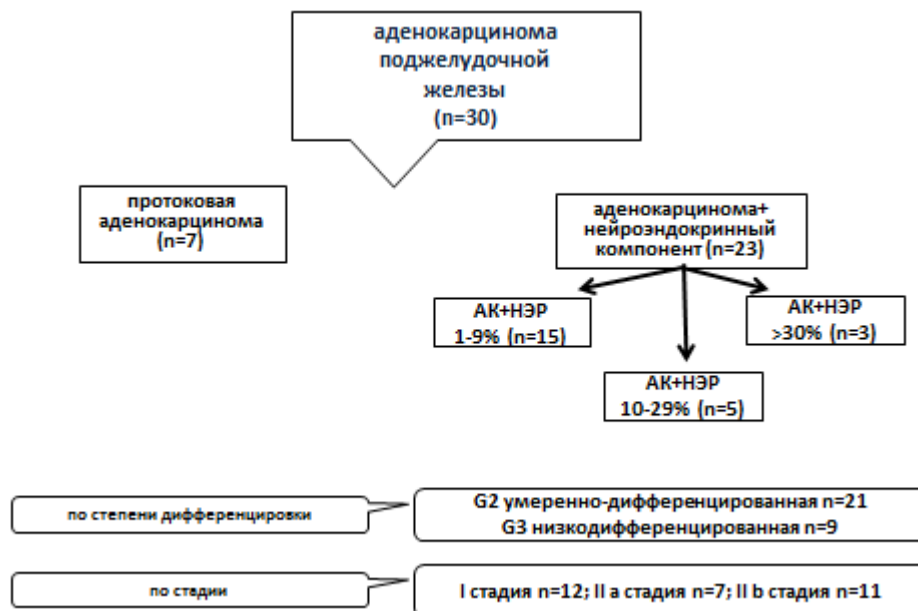


Рисунок 2 – Дизайн морфологического исследования

При патологоанатомическом исследовании опухоли были классифицированы как умеренно дифференцированные (21 пациент), низкодифференцированные (9 пациентов) протоковые аденокарциномы. Было проведено дополнительное иммуногистохимическое исследование, после которого нейроэндокринная дифференцировка была выявлена в 23 наблюдениях (76,7%). В зависимости от гистологического типа опухоли и доли клеток с нейроэндокринной дифференцировкой пациенты распределились следующим образом: протоковая аденокарцинома (7 пациентов) и протоковая аденокарцинома с нейроэндокринной дифференцировкой в 1-9% клеток опухоли (15 пациентов); протоковая аденокарцинома с нейроэндокринной дифференцировкой в 10-29% клеток опухоли (5 пациентов) и смешанные нейроэндокринные – ненейроэндокринные неоплазии (MiNeN) (>30% клеток с нейроэндокринной дифференцировкой) - 3 пациента.

Окраска с антителами к хромогранину А выявлялась в большей части клеток и более интенсивной, чем окраска на синаптофизин. И, несмотря на то, что клетки с эозинофильной цитоплазмой наводили на мысль о

нейроэндокринной дифференцировке, в ИГХ препаратах не все эти структуры были окрашены (рис. 3).

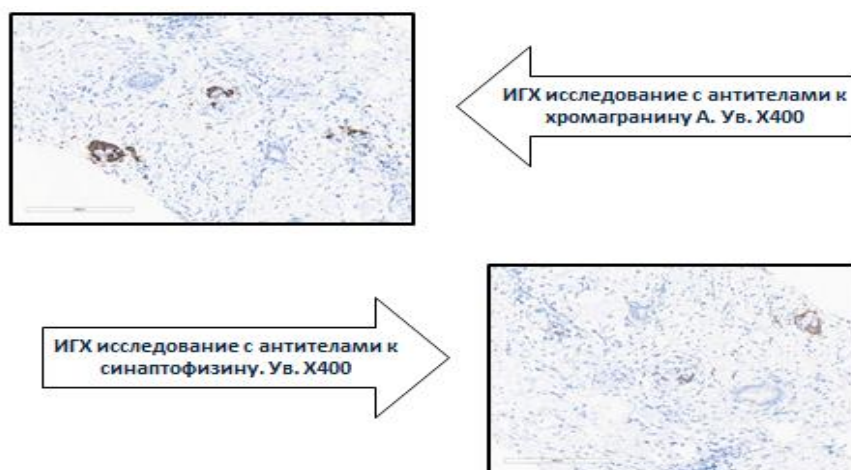


Рисунок 3 - Нейроэндокринная дифференцировка в клетках протоковой аденокарциномы

В то же время большинство структур не имело никак признаков нейроэндокринной дифференцировки при окраске гематоксилин-эозин, ни цитологических, ни гистологических, а после ИГХ исследования давали выраженную реакцию с антителами к хромогранину А. Исходя из этого, мы полагаем, что без повсеместного использования нейроэндокринных маркеров в практике невозможно определить истинную долю MiNeN и их клиническое и прогностическое значение может быть сильно недооценено.

Также была подтверждена обратная связь между % нейроэндокринной дифференцировкой и уровнем выживаемости (рис. 4).

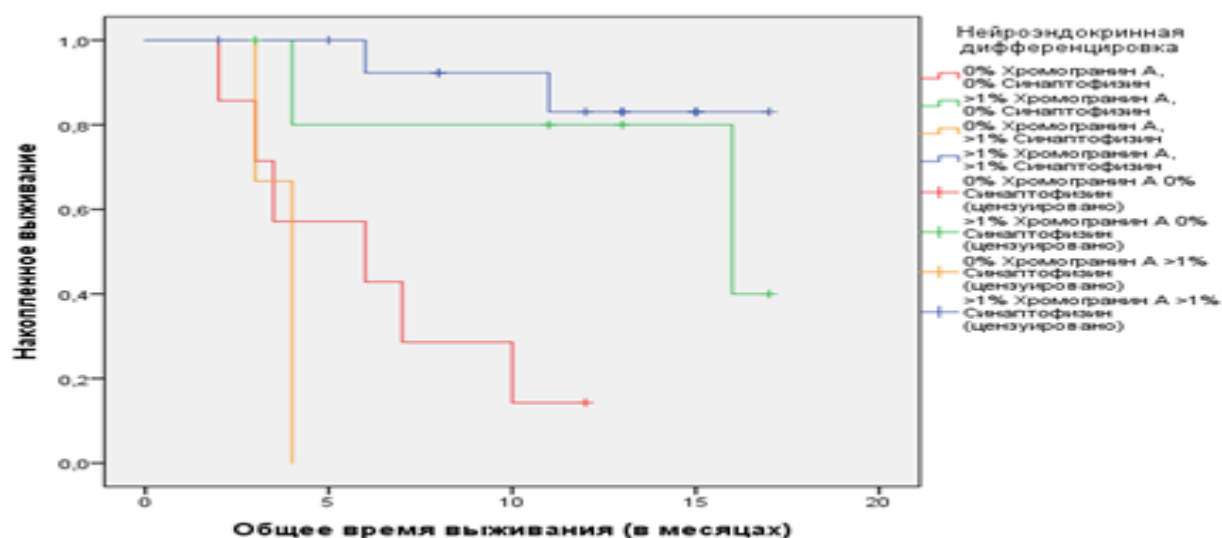


Рисунок 4 - Выживаемость пациентов с опухолями поджелудочной железы в зависимости от экспрессии нейроэндокринных биомаркеров

Была обнаружена преобладающая значимость нейроэндокринного маркера **Хромогранина А** над **Синаптофизином**, как независимого предиктора выживаемости пациентов. Наиболее значимая разница по уровню выживаемости была между отрицательной экспрессией Хромогранина А, и свыше 1% позитивных клеток, что говорит о важности определения даже слабой экспрессии этого нейроэндокринного маркера в опухоли.

Для поиска возможных дополнительных маркеров нейроэндокринных карцином мы исследовали кровь 51 пациента с различными заболеваниями поджелудочной железы (рис. 5).



Рисунок 5 – Дизайн лабораторного исследования

Поджелудочная железа является необычным органом из-за своей двойной экзокринной и эндокринной функции.

Мы провели определение уровня стероидных гормонов и АКТГ в крови у пациентов с заболеваниями поджелудочной железы.

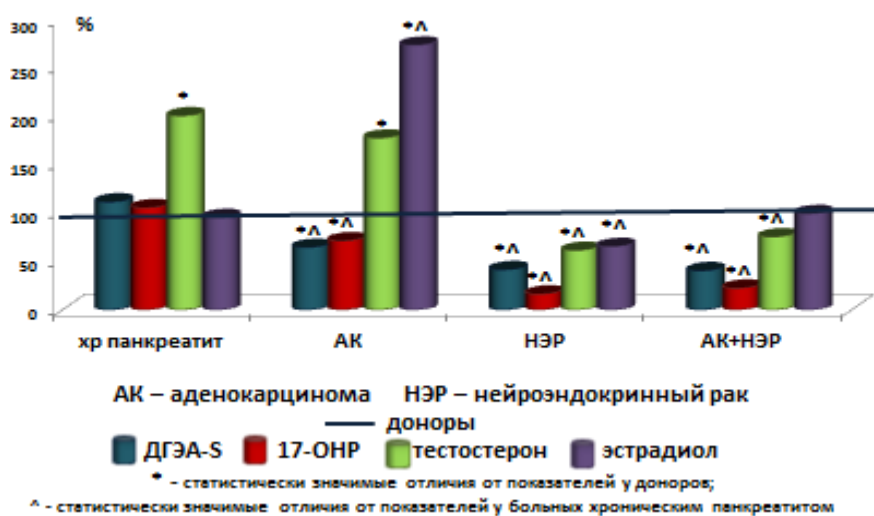


Рисунок 6 – Уровень стероидных гормонов в крови пациентов с заболеваниями поджелудочной железы

Исследованные показатели крови имели различия не только в зависимости от наличия или отсутствия злокачественного поражения поджелудочной железы, но и наличия нейроэндокринного компонента в злокачественной опухоли. Основным отличием хронического воспалительного процесса в поджелудочной железе от злокачественного опухолевого роста, явилось снижение в крови больных РПЖ (в разной мере в зависимости от наличия или отсутствия нейроэндокринного компонента) содержания ДГЭА-S и 17ОНР. Наличие нейроэндокринного компонента в злокачественной опухоли поджелудочной железы усугубляло снижение ДГЭА-S и 17ОНР, по сравнению с аденокарциномой ПЖ. Такое резкое снижение содержания предшественников половых стероидов при наличии нейроэндокринного компонента сказывалось также на уменьшении в крови уровня тестостерона у больных с НЭР и АК+НЭР ПЖ, а также эстрадиола у больных только с НЭР ПЖ (рис. 6).

При этом у больных злокачественными опухолями с наличием или отсутствием нейроэндокринного компонента в ней установлено повышение коэффициента соотношения кортизол/ДГЭА-S (рис. 7).

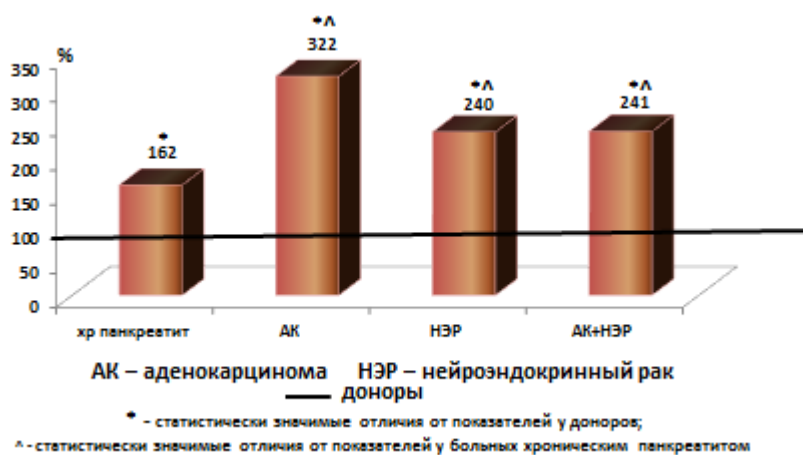


Рисунок 7 – Уровень коэффициента соотношения кортизол/ДГЭА-S у пациентов с заболеваниями поджелудочной железы

При этом максимальное повышение зафиксировано в группе больных аденокарциномой поджелудочной железы. Расчет соотношения кортизол/ДГЭА-S используют в различных исследованиях, так как ДГЭА-S играет защитную роль во время острого стресса как антагонист воздействия гормона стресса кортизола. Повышение соотношения кортизол/ДГЭА-S у всех обследованных больных может свидетельствовать о развитии стрессорной

реакции, снижении сопротивляемости организма и ухудшении адаптивных реакций. Подана заявка на изобретение.

Для выявления точных диагностических параметров было решено использовать информативные математические методы способные улучшить надежность выявленных критериев. ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) является полезным классическим алгоритмом для решения вопросов классификации и определения предсказательной способности теста. AUC для диагностики посредством анализа ДГЭА-S показал, что определение ДГЭА-S в крови является диагностически ценным признаком для выявления НЭР и аденокарциномы с НЭР (рис. 8).

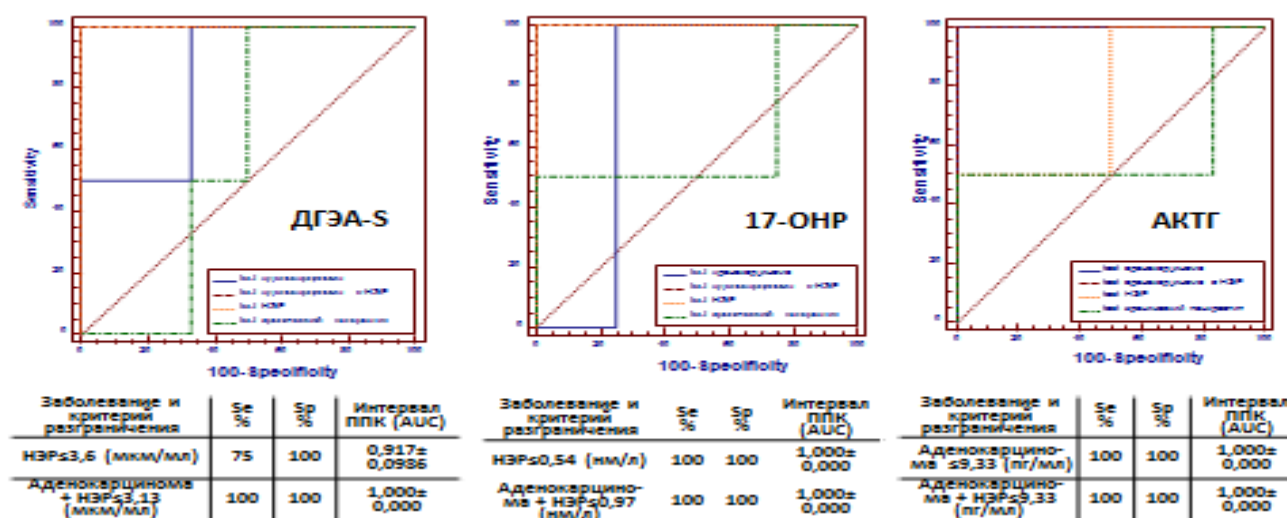


Рисунок 8 – Диагностическая информативность определения ДГЭА-S, 17-ОНР, АКТГ и показателей площади под кривыми ROC-анализа при заболеваниях поджелудочной железы

AUC для диагностики НЭР и аденокарциномы с НЭР посредством ROC-анализа **17-ОНР** говорит об «идеальной» диагностической модели двух данных патологий поджелудочной железы (НЭР и аденокарциномы с НЭР). Согласно проведенному математическому анализу показатель **АКТГ** являлся наиболее диагностически значимым с самыми высокими характеристиками для диагностики аденокарциномы и аденокарциномы с НЭР.

При сравнении **тестостерона** в крови больных с заболеваниями поджелудочной железы и донорами оказалось, что при НЭР и аденокарциноме с НЭР тестостерон не обладает истинно информативными характеристиками, тогда как площадь под кривой - AUC для диагностики хронического панкреатита и аденокарциномы посредством анализа тестостерона

свидетельствовала об «идеальной» и высокой значимости диагностической модели (рис. 9).

Анализируя диагностические характеристики **прогестерона** при всех заболеваниях поджелудочной железы, оказалось, что истинно информативным определением прогестерона может быть для диагностики аденокарциномы и аденокарциномы с НЭР. При других патологиях диагностическая информативность прогестерона не дает возможности использования его в качестве диагностического критерия (рис. 9).

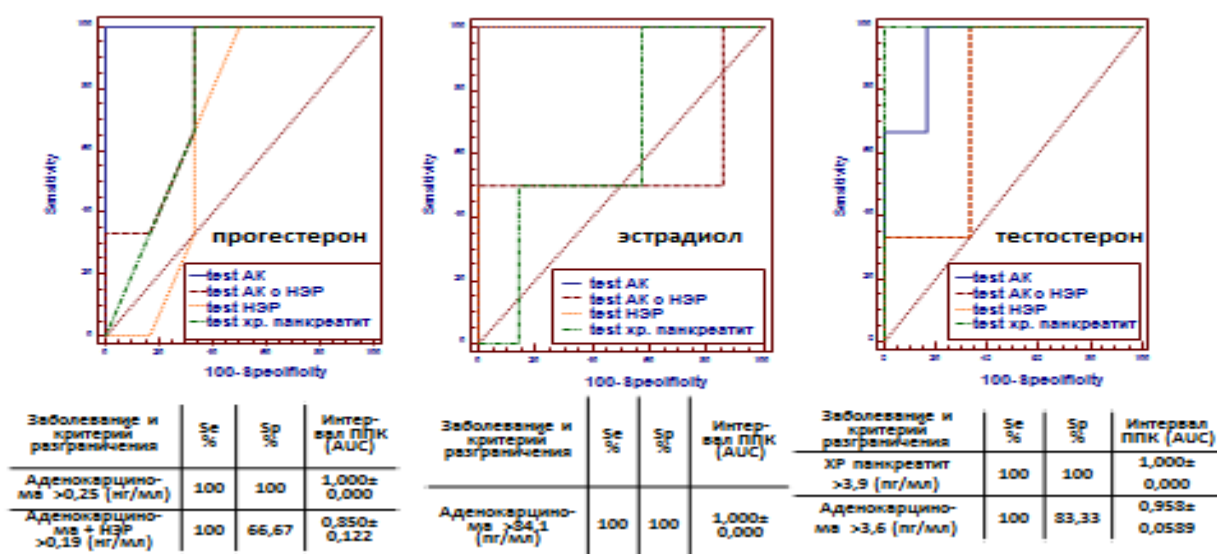


Рисунок 9 – Диагностическая информативность определения прогестерона, эстрадиола и тестостерона и показателей площади под кривыми ROC-анализа при заболеваниях поджелудочной железы

По результатам математического анализа выявлено, что определение **эстрадиола** является информативным только для диагностики аденокарциномы, поскольку при других изучаемых патологиях поджелудочной железы данный показатель не является информативным и высокоточным (рис. 9).

В результате математического ROC-анализа по использованию показателей гормонального статуса в крови больных в качестве диагностических тестов с выявлением патологий поджелудочной железы различного генеза был определен комплекс диагностических критериев (рис. 10).

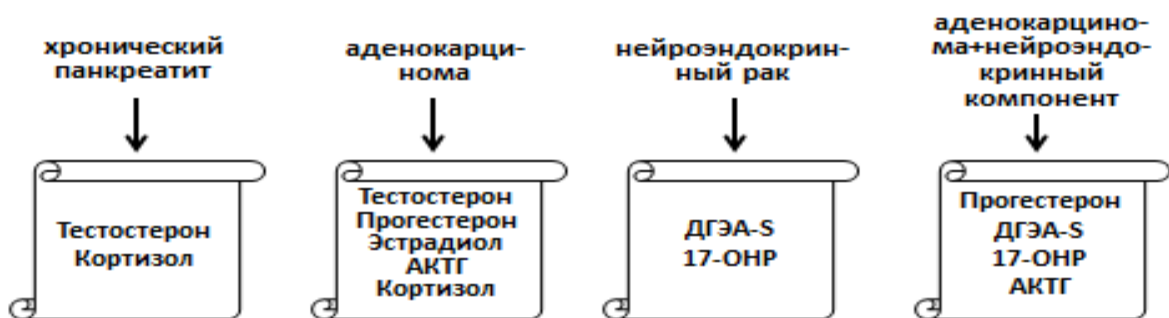


Рисунок 10 - Диагностические гормональные тесты по выявлению патологий поджелудочной железы различного генеза

Факторы семейства VEGF являются наиболее важными проангиогенными факторами, которые усиливают рост опухоли, однако, не менее значимую роль играют и факторы запуска неоангиогенеза. Мы изучили уровень некоторых факторов роста, участвующих в неоангиогенезе в крови больных хроническим панкреатитом, аденокарциномой поджелудочной железы, нейроэндокринным раком поджелудочной железы и аденокарциномой поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом (рис. 11). Было установлено, что злокачественный процесс в поджелудочной железе имеет ряд особенностей содержания исследованных факторов роста в крови. Для выявления точных диагностических параметров использовали ROC-анализ.

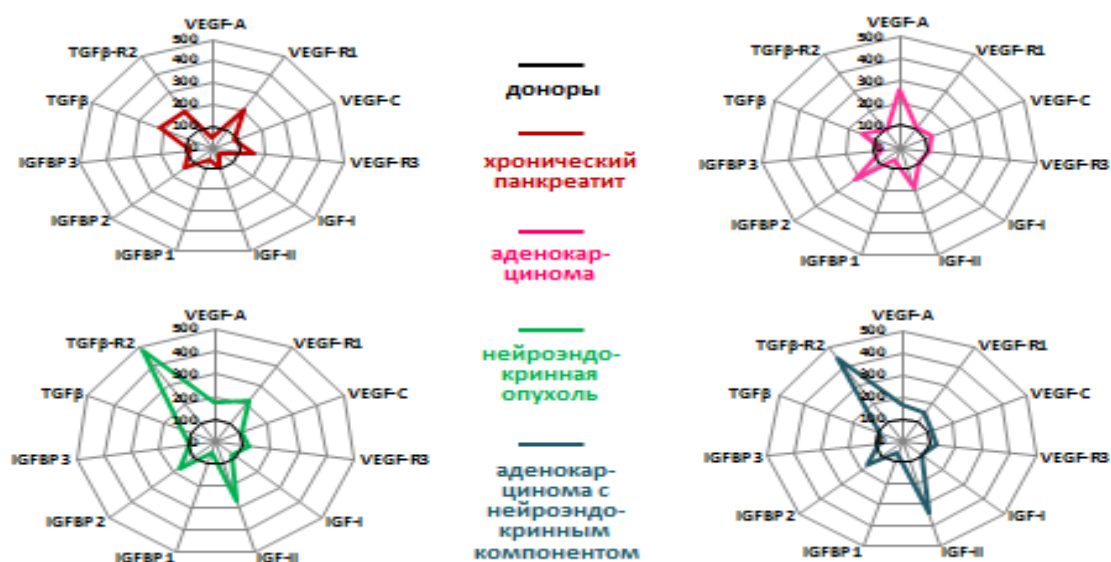


Рисунок 11 – Уровень факторов роста, участвующих в неоангиогенезе, при различных заболеваниях поджелудочной железы

Отличная предсказательная способность VEGF-A выявлена для НЭР и аденокарциномы с НЭР. При всех заболеваниях поджелудочной железы z-критерий был очень высоким или максимальным, что свидетельствует об

отличной диагностической значимости данного диагностического теста (рис. 12).

При анализе диагностических параметров **VEGF-R** при изучаемых патологиях поджелудочной железы было выявлено, что все вычисляемые критерии не обладают высокими статистически убедительными характеристиками, т.е. VEGF-R не может использоваться в качестве диагностического критерия при патологиях поджелудочной железы.

AUC для диагностики аденокарциномы с НЭР посредством анализа **TGF-β** показала высокую диагностическую ценность (рис.12). При использовании критерия **TGF-βR2** для диагностики патологии поджелудочной железы было определено, что использование данного показателя в качестве диагностического теста не представляется возможным. При этом отношение **TGF-β** к **TGFR2** служит информативным лабораторным тестом для предикторной оценки характера заболевания. Получен патент «Способ диагностики аденокарциномы поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом».

Проанализировав параметры **VEGF-C** для всех патологий поджелудочной железы было выявлено, что только для диагностики хронического панкреатита он имеет прогностическое значение, а при остальных изучаемых патологиях он не несет информационной нагрузки (рис. 12).

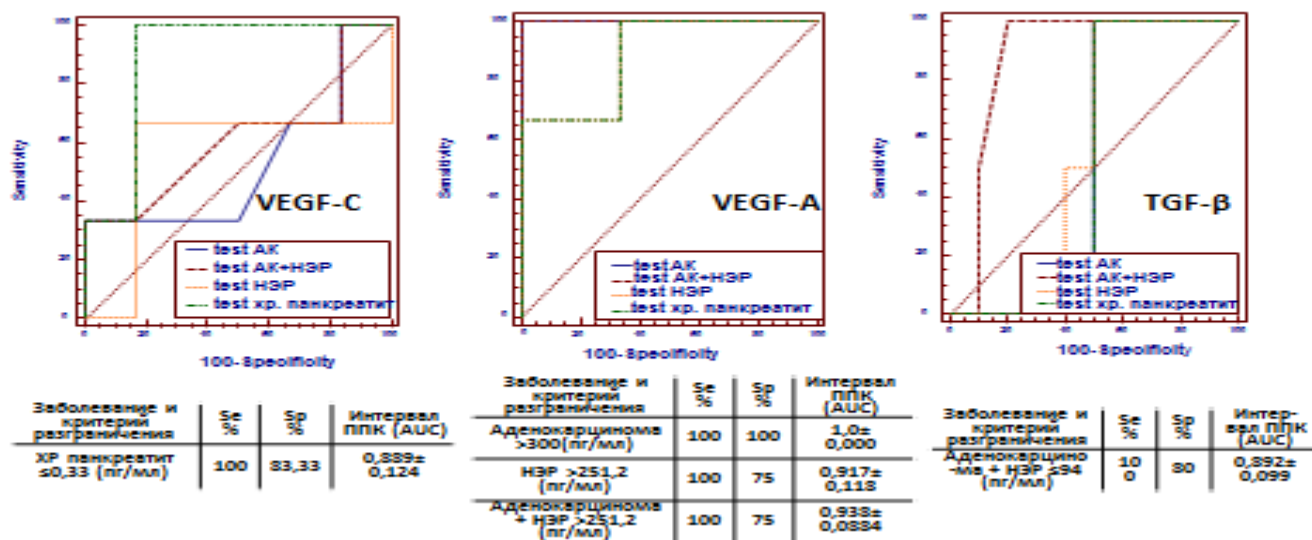


Рисунок 12– Диагностическая информативность определения VEGF-A, VEGF-C и TGF-β и показателей площади под кривыми ROC-анализа при заболеваниях поджелудочной железы

AUC **IGF-I** для диагностики только хронического панкреатита по средствам анализа отвечает «идеальной модели» (рис. 13).

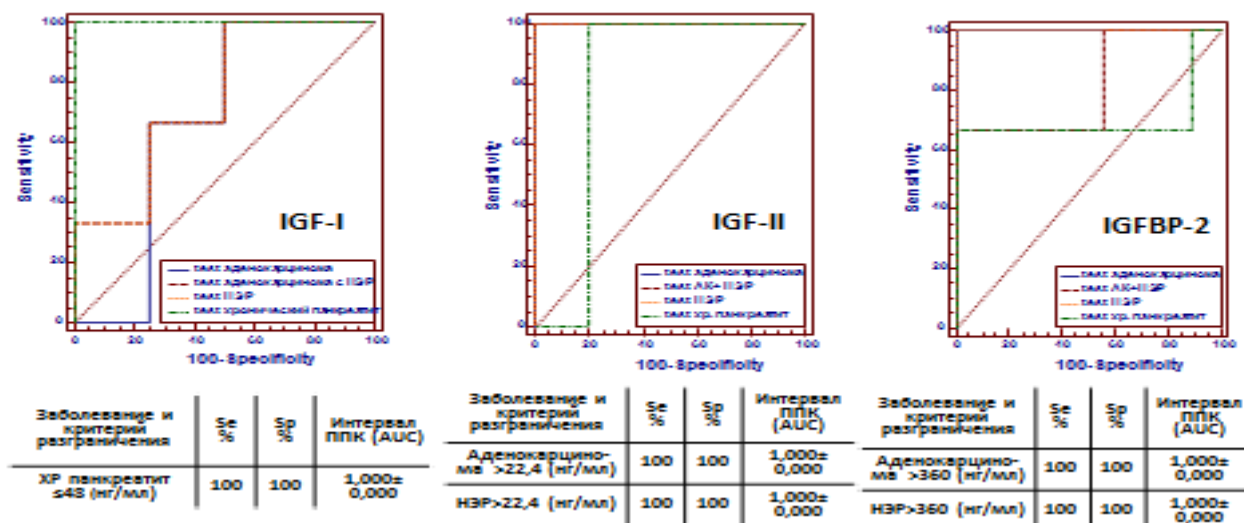


Рисунок 13 – Диагностическая информативность определения IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 и показателей площади под кривыми ROC-анализа при заболеваниях поджелудочной железы

Величины AUC при других изучаемых патологиях поджелудочной железы не отвечают статистически значимым критериям диагностической точности. Вместе с тем, AUC для диагностики посредством анализа **IGF-II** при аденокарциноме и НЭР свидетельствовал об «идеальной модели», а в случае хронического панкреатита и аденокарциномы с НЭР диагностическая ценность IGF-II отсутствовала. Высокой диагностической ценностью по AUC для диагностики аденокарциномы и НЭР обладал **IGFBP-2** (рис. 13).

По итогам данного раздела работы выявлены диагностические критерии, которые можно использовать в диагностике каждой исследованной патологии поджелудочной железы (рис. 14).

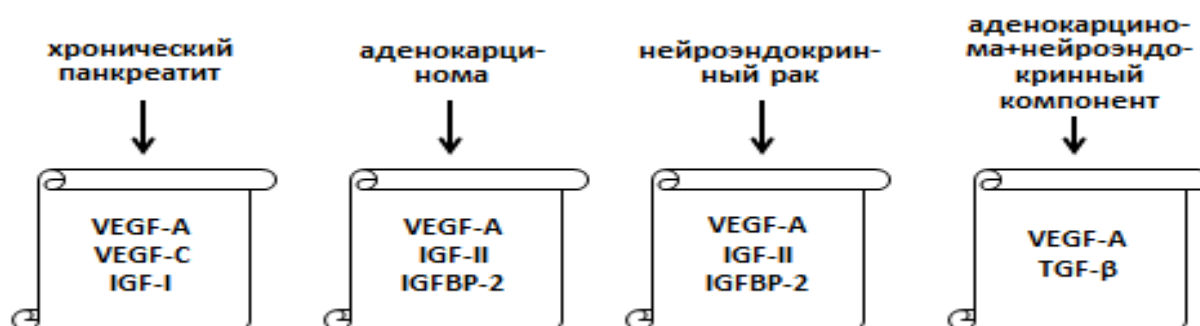


Рисунок 14 – Диагностические тесты факторов роста по выявлению патологий поджелудочной железы различного генеза

Как известно, процессы свободнорадикального окисления и развитие оксидативного стресса играют важную роль в инициации злокачественной трансформации и прогрессировании неоплазии (рис. 15).

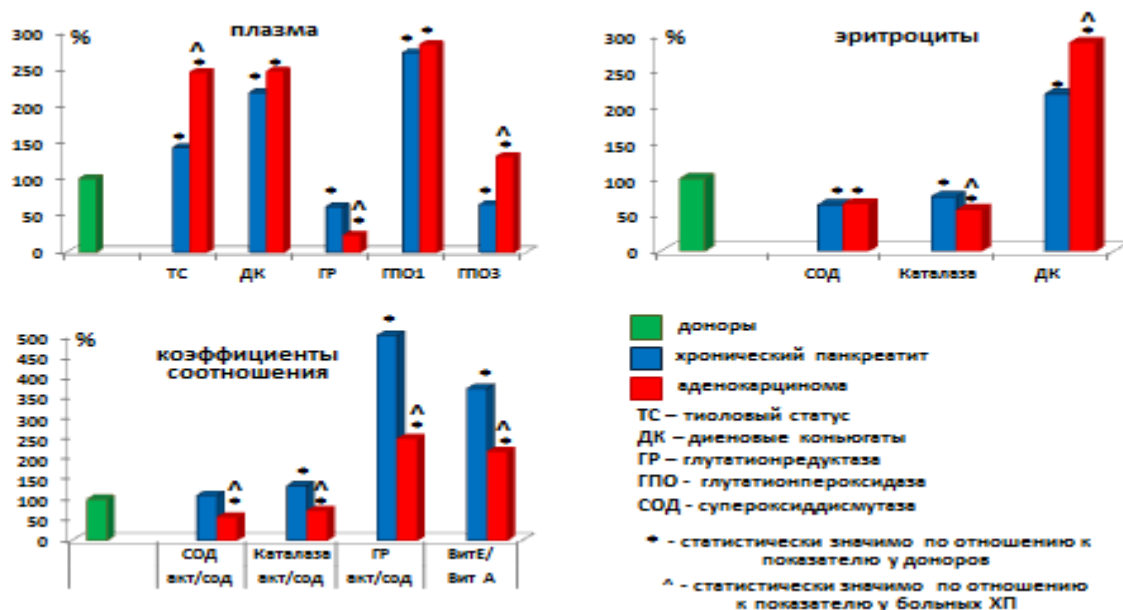


Рисунок 15 – Уровень показателей ПОЛ в крови больных с аденокарциномой поджелудочной железы

При этом состояние антиоксидантной системы, как ферментативных так и неферментативных ее компонентов, может иметь ключевое значение в регуляции процессов, поддерживающих прогрессию опухоли.

Выявление наиболее выраженных изменений большинства изученных показателей у больных нейроэндокринным раком свидетельствует о том, что нарушение окислительного статуса является одной из метаболических особенностей этой патологии, возможно связанной с повышенной агрессивностью течения данного гистотипа поражения поджелудочной железы (рис. 16). Анализ представленных в данном разделе данных позволяет прийти к заключению о том, что при злокачественном поражении поджелудочной железы выраженная интенсификация ПОЛ характерна для нейроэндокринного рака, чему способствует значительное ингибирование ферментов первой линии антиоксидантной защиты в эритроцитах и сниженная активность каталазы в плазме крови, наиболее выраженные отклонения от нормы показателей, характеризующих функционирование основных ферментов глутатионовой системы, а также максимальное нарушение соотношения витаминов Е и А, свидетельствующее о нарушении и неферментативного звена антиоксидантной системы крови.

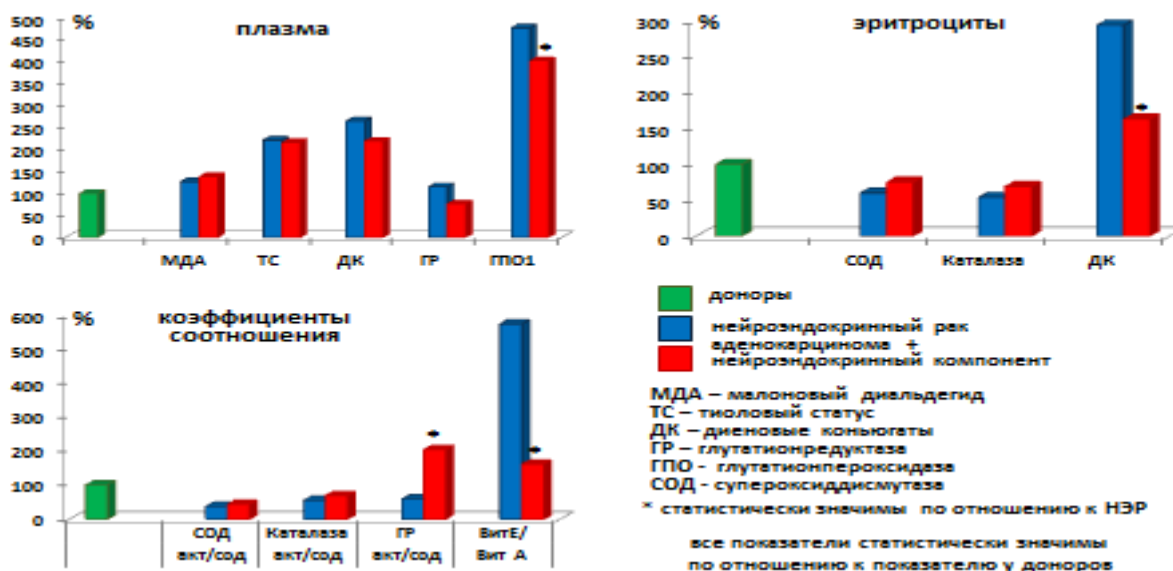


Рисунок 16 – Уровень показателей ПОЛ в крови больных с нейроэндокринным раком поджелудочной железы

Полученные данные позволяют прийти к заключению о том, что значительное нарушение окислительного статуса, проявляющееся в выраженной интенсификации ПОЛ и максимальном дефекте как ферментативного, так и неферментативного звеньев антиоксидантной системы, является одной из метаболических особенностей нейроэндокринного рака. И это может вносить вклад в повышенную агрессивность течения данного гистотипа поражения поджелудочной железы.

Таким образом, предложен и апробирован комплекс лабораторных показателей, позволяющих на этапе обследования проводить дифференциальную вспомогательную диагностику нейроэндокринной аденокарциномы поджелудочной железы (рис. 17).



Рисунок 17 – Диагностические критерии по выявлению аденокарциномы поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом

ВЫВОДЫ

1. Нейроэндокринная дифференцировка была выявлена в 76,7% (23 из 30) аденокарцином поджелудочной железы: протоковая аденокарцинома с нейроэндокринной дифференцировкой в 1-9% клеток опухоли 65,2%; протоковая аденокарцинома с нейроэндокринной дифференцировкой в 10-29% клеток опухоли 21,8% и смешанные нейроэндокринные – ненейроэндокринные неоплазии (MiNeN) >30% клеток с нейроэндокринной дифференцировкой 13,0%.

2. Посредством ROC-анализа установлено, что для диагностики хронического панкреатита следует определять VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R3, IGF-I, IGFBP-1, тестостерон, кортизол в крови. Показана высокая диагностическая ценность ($p < 0,0001$) в том случае, когда $VEGF-A \leq 108,6$ пг/мл, $VEGF-C \leq 0,33$ пг/мл, $VEGF-R3 > 10$ нг/мл, $IGF-I \leq 48$ нг/мл, $IGFBP-1 \leq 9,1$ нг/мл, тестостерон $> 3,9$ пг/мл, кортизол $> 383,7$ нм/л, при хроническом панкреатите.

3. С помощью ROC-анализа обнаружено, что при аденокарциноме присутствует высокая диагностическая значимость ($p < 0,0001$) определения в крови VEGF-A, IGF-II, IGFBP-2, тестостерона, прогестерона, эстрадиола, АКТГ, кортизола. В том случае, когда $VEGF-A > 300$ пг/мл, $IGF-II > 22,4$ нг/мл, $IGFBP-2 > 360$ нг/мл, тестостерон $> 3,6$ пг/мл, прогестерон $> 0,25$ нг/мл, эстрадиол $> 84,1$ пг/мл, АКТГ $> 9,33$ пг/мл, кортизол $> 383,7$ нм/л, следует говорить о наличии аденокарциномы.

4. Применение ROC-анализа способствовало обнаружению диагностически значимых критериев, характеризующих НЭР. Если $VEGF-A > 251,2$ пг/мл, $VEGF-R > 0,034$ нг/мл, $VEGF-R3 > 10$ нг/мл, $IGF-II > 22,4$ нг/мл, $IGFBP-2 > 360$ нг/мл, ДГЭА-S $\leq 3,6$ мкм/мл, 17-ОНР $\leq 0,54$ нм/л, то этот комплекс показателей характеризует наличие НЭР.

5. При использовании ROC-анализа были зафиксированы критерии характеризующие аденокарциному с НЭР. Так при $VEGF-A > 251,2$ пг/мл, $VEGF-R3 > 10$ нг/мл, $IGFBP-2 > 360$ нг/мл, $TGF-\beta \leq 94$ пг/мл, прогестерон $> 0,19$

нг/мл, 17-ОНР \leq 0,97 нм/л, АКТГ \leq 9,33 пг/мл, ДГЭА-S \leq 3,13 мкм/мл, можно с высокой долей вероятности диагностировать аденокарциному с НЭР.

6. Для нейроэндокринного рака ПЖ характерны выраженная интенсификация ПОЛ и максимальное снижение функциональной активности ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы. Содержание МДА в плазме крови было увеличено на 27,2% ($p < 0,01$), диеновых конъюгатов в плазме – на 165%, в эритроцитах – на 194% ($p < 0,001$), эритроцитарная активность СОД снижена на 39,7%, каталазы – на 46,5%, глутатионредуктазы – на 77,2% ($p = 0,000000$ для всех ферментов), что сопровождалось падением соотношения активности к содержанию ферментов (для СОД в 2,7 раз, каталазы в 1,8 раз, глутатионредуктазы в 1,7 раз, $p \leq 0,0001$), содержание α -токоферола увеличено на 51,4%, соотношение витаминов Е и А – в 5,7 раз ($p = 0,000000$) по сравнению с донорами.

7. Изменения показателей окислительного статуса при аденокарциноме поджелудочной железы были менее выраженными, чем при нейроэндокринном раке ПЖ: уровень диеновых конъюгатов увеличен относительно доноров на 119-146% в плазме и 63-188% в эритроцитах, $p < 0,001$; активность СОД снижена на 25,1-35,2%, каталазы – на 31-43,4%, $p < 0,00001$, отсутствовали: содержание МДА в плазме, активность глутатионредуктазы или имели противоположную направленность: соотношение активности к содержанию глутатионредуктазы было увеличенным в 2,5 раза ($p = 0,000000$), содержание α -токоферола снижено на 39% ($p = 0,001$) относительно группы доноров и соответственно в 4,2 раза и на 60% ($p = 0,000000$) относительно нейроэндокринного рака ПЖ. Для всех групп больных со злокачественной патологией поджелудочной железы были выявлены статистически значимые отличия от больных хроническим панкреатитом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На этапе обследования больных с патологией поджелудочной железы целесообразно определять в крови отношение TGF- β к TGFR1 для предикторной оценки характера заболевания. Клиническое применение

предлагаемого способа позволит уже на этапе обследования выделять группы больных с высоким риском развития аденокарциномы поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом с целью своевременного проведения адекватных лечебных мероприятий.

2. В крови больных с патологией поджелудочной железы целесообразно определять содержание дегидроэпиандростерона-сульфата (ДГЭА-S) и 17-оксипрогестерона (17ОНР):

- при уровне ДГЭА-S ниже нормы в 2 и более раза ($2,4 \pm 0,2$ против нормы $5,8 \pm 0,59$) и 17-ОНР меньше в 6 и более раза ($0,42 \pm 0,40$ против нормы $2,68 \pm 0,3$) у больного прогнозируют нейроэндокринный рак поджелудочной железы;

- в случае снижения в крови концентрации ДГЭА-S ниже нормы в 1,6 раза ($3,7 \pm 0,37$ против нормы $5,8 \pm 0,59$) и 17-ОНР меньше в 1,4 раза ($1,9 \pm 0,19$ против нормы $2,68 \pm 0,3$) прогнозируют аденокарциному поджелудочной железы.

- у больных хроническим панкреатитом в крови не выявлены статистически значимые изменения содержания ДГЭА-S и 17 ОНР.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Биомаркеры, неоангиогенез и факторы роста при раке поджелудочной железы / Е.М. Франциянц, О.И. Кит, В.И. Алейнов, И.А. Горошинская // Исследования и практика в медицине. – 2019. – Т.6, № 3. – С. 51-64.

2. Показатели окислительного метаболизма в крови больных с разным гистотипом опухолей поджелудочной железы / И.А. Горошинская, Е.М. Франциянц, В.И. Алейнов, Л.А. Немашкалова, Н.Д. Черярина, О.И. Кит // Современные проблемы науки и образования. -2020. - №2. - URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29548> (дата обращения: 07.08.2020).

3. Содержание стероидных гормонов, их предшественников и АКТГ в крови больных с патологией поджелудочной железы / О.И. Кит, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, Н.Д. Черярина, В.И. Алейнов, Е.В. Шалашная // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 29-33.

4. Особенности регуляции редокс-статуса крови больных при разных видах поражения поджелудочной железы / И.А. Горошинская, Е.М. Франциянц, В.И. Алейнов, Л.А. Немашкалова, Н.Д. Черярина, А.В. Шапошников, Е.А. Дженкова // Исследования и практика в медицине. – 2020. – Т. 7, № 2. – С. 30-46.

5. Патент № 2722276 Российской Федерации. Способ диагностики аденокарциномы поджелудочной железы с нейроэндокринным компонентом [текст] / Кит О.И., Франциянц Е.М., Трифанов В.С., Алейнов В.И., Бандовкина В.А; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (RU). Заявл. 9.12.2019; опубл. 28.05.2020, Бюл. №16.

6. Blood levels of steroid hormone precursors allow differentiation between pancreatic adenocarcinoma and neuroendocrine tumors / **V.I. Aleynov**, E.M. Frantsiyants, V.A. Bandovkina, N.D. Cheryarina, V.S. Trifanov, S.V. Sanamyants, M.A. Averkin, O.I. Kit, A.V. Shaposhnikov, Y.A. Fomenko, D.S. Petrov // 2020 ASCO Annual Meeting J. Clin. Oncol. 38, 2020 (suppl; abstr e16692).

7. Effect of neuroendocrine component in pancreatic adenocarcinoma on blood levels of steroid hormones / **V.I. Aleynov**, E.M. Frantsiyants, V.A. Bandovkina, N.D. Cheryarina, V.S. Trifanov, M.N. Chernyak, S.S. Mezentsev, F.N. Grechkin, T.B. Katsieva, O.I. Kit, A.V. Shaposhnikov, D.S. Petrov, Y.A. Fomenko // 2020 ASCO Annual Meeting J. Clin. Oncol. 38, 2020 (suppl; abstr e16695).

8. Parameters of oxidative metabolism in the blood of patients with pancreatic tumors of different histotypes / I.A. Goroshinskaya, E.M. Frantsiyants, **V.I. Aleynov**, L.A. Nemashkalova, N.D. Cheryarina, V.S. Trifanov, S.S. Mezentsev, F.N. Grechkin, M.N. Duritskiy, O.I. Kit, G.V. Zhukova, Y.A. Fomenko, D.S. Petrov // 2020 ASCO Annual Meeting J. Clin. Oncol. 38, 2020 (suppl; abstr e16697).

9. Characteristics of growth factors in the blood allowing determination of neuroendocrine component in pancreatic diseases / E.M. Frantsiyants, I.V. Kaplieva, E.I. Surikova, I.V. Neskubina, V.A. Bandovkina, L.K. Trepitaki, Y.A. Pogorelova, L.A. Nemashkalova, **V.I. Aleynov**, V.S. Trifanov, F.N. Grechkin, S.V. Sanamyants, O.I. Kit, E.M. Nepomnyashchaya, D.S. Petrov, Y.A. Fomenko // 2020 ASCO Annual Meeting J. Clin. Oncol. 38, 2020 (suppl; abstr e16693).

10. Prooxidant effect of α -tocopherol in pancreatic tumors / E.I. Surikova, E.M. Frantsiyants, I.A. Goroshinskaya, V.S. Trifanov, **V.I. Aleynov**, L.A.

Nemashkalova, I.V. Neskubina, M.N. Chernyak, S.V. Sanamyants, P.N. Gabrichidze, O.I. Kit, G.V. Zhukova, Y.A. Fomenko, D.S. Petrov // 2020 ASCO Annual Meeting J. Clin. Oncol. 38, 2020 (suppl; abstr e16698).

11. Diagnostic criteria of pancreatic pathology / I.V. Neskubina, E.M. Frantsiyants, I.V. Kaplieva, E.I. Surikova, V.A. Bandovkina, L.K. Trepitaki, L.A. Nemashkalova, **V.I. Aleynov**, V.S. Trifanov, S.S. Mezentsev, M.N. Chernyak, O.I. Kit, A.V. Snezhko, D.S. Petrov, Y.A. Fomenko // 2020 ASCO Annual Meeting J. Clin. Oncol. 38, 2020 (suppl; abstr e16696).

12. Levels of steroid hormones, their precursors and ACTH in the blood of patients with pancreatic diseases / O. I. Kit, E.M. Frantsiyants, V.A. Bandovkina, N.D. Cheryarina, **V.I. Aleynov** // Annals of Oncology. – 2020. – V. 31, №3. – P. 119-120. (+ПОСТЕР).

13. Functions of antioxidant enzymes in the blood of patients with pancreatic neuroendocrine tumors / I. A. Goroshinskaya, E.M. Frantsiyants, O. I. Kit, **V. I. Aleynov**, L. A. Nemashkalova, N. D. Cheryarina, S.V. Tumanyan // Annals of Oncology. – 2020. – V. 31, №3. – P. 121. (+ПОСТЕР).

14. Прооксидантное действие а-токоферола при опухолях поджелудочной железы / И.В. Нескубина, Е.И. Сурикова, Е.М. Франциянц, И.А. Горошинская, Л.А. Немашкалова, **В.И. Алейнов**, В.С. Трифанов, О.И. Кит // XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казань. Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 584.

15. Диагностические критерии патологии поджелудочной железы /И.В. Каплиева, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, И.В. Нескубина, Е.И. Сурикова, Л.К. Трепитаки, Л.А. Немашкалова, **В.И. Алейнов**, В.С. Трифанов, О.И. Кит // XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казань. Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 612-613.

16. Особенности факторов роста в крови при заболеваниях поджелудочной железы, позволяющие определить нейроэндокринный компонент / И.В. Каплиева, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, Е.И. Сурикова, И.В. Нескубина, Л.К. Трепитаки, Ю.А. Погорелова, Л.А. Немашкалова, **В.И. Алейнов**, О.И. Кит // XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казань. Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 613-614.

17. Наличие нейроэндокринного компонента в аденокарциноме поджелудочной железы оказывает влияние на содержание стероидных

гормонов в крови / И.В. Каплиева, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, Н.Д. Черярина, **В.И. Алейнов**, О.И. Кит // XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казань. Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 614.

18. Определение содержания в крови предшественников стероидных гормонов позволяет дифференцировать аденокарциному и нейроэндокринный рак поджелудочной железы / И.В. Каплиева, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, Н.Д. Черярина, **В.И. Алейнов**, В.С. Трифанов, О.И. Кит // XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казань. Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 615.

19. Показатели окислительного метаболизма в крови больных с разным гистотипом опухолей поджелудочной железы / Е.М. Франциянц, И.А. Горошинская, **В.И. Алейнов**, Л.А. Немашкалова, Н.Д. Черярина, В.С. Трифанов, О.И. Кит // XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казань. Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 624.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аденокарцинома

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АО – антиокислительная система

ГПО – глутатионпероксидаза

ГПО1 – цитозольная (клеточная) глутатионпероксидаза

ГПО3 – плазматическая (внеклеточная) глутатионпероксидаза

ДК – диеновые конъюгаты

ИГХ – иммуногистохимия

КТ – компьютерная томография

МДА – малоновый диальдегид

МРТ – магнитно-резонансная томография

НЭР – нейроэндокринная опухоль

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РПЖ – рак поджелудочной железы

СОД – супероксиддисмутаза

СРКТ – спиральная рентгеновская компьютерная томография

DGEA-S – дегидроэпиандростерон-сульфат

17-OHP – 17-оксипрогестерон

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

VEGF-R – рецептор фактора роста эндотелия сосудов

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IGFBP – IGF-связывающие белки

GSH – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион