

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.345-006-097.1

**ШТАБИНСКАЯ**  
**Татьяна Тадеушевна**

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ  
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА  
В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия

Минск 2017

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Басинский Виктор Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Черствый Евгений Давыдович**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, профессор кафедры патологической анатомии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Рогов Юрий Иванович**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры хирургии с курсом патологической анатомии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 30 июня 2017 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.02 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, тел.: (017)272 55 98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «    » мая 2017 года.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций  
кандидат медицинских наук, доцент



А. И. Герасимович

## ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак занимает особое место в структуре онкологических заболеваний. В 2012 г. в мире зарегистрировано более 1,3 миллиона случаев опухоли данной локализации и 700 тысяч умерших от нее, что составляет до 15% от общего числа первично диагностированных злокачественных новообразований [Ferlay J. et. al., 2012]. По данным канцер-регистра Республики Беларусь, в течение последних пятнадцати лет количество ежегодно выявляемых пациентов, страдающих раком ободочной кишки, в Беларуси увеличилось в 2 раза и в 2015 г. составило 30,8 на 100 000 населения, а число заболевших раком прямой кишки незначительно колебалось – от 13,9 до 15,7 на 100 000 населения в год. И если количество умерших от рака легких, молочной железы и желудка снижается, то число умерших от колоректального рака растет: за последние 15 лет увеличилось с 22,5 до 25,6 на 100 000 мужчин, и с 19,8 до 23,0 на 100 000 женщин.

Многие работы посвящены изучению молекулярных маркеров для диагностики и прогнозирования течения опухолей. Одним из наиболее перспективных направлений современной онкоморфологии является оценка ангиогенеза, оказывающего влияние на скорость роста опухоли и развитие метастазов при многих типах рака [Bouck N. et. al., 1996; Foss A. J. et. al., 1996; Hanahan D., 1997]. Изучению роли ангиогенеза в прогнозе колоректального рака также посвящено множество работ. Однако опубликованные результаты в большинстве своем носят противоречивый характер, практически отсутствуют данные о прогностической роли комплексной оценки экспрессии маркеров ангиогенеза (МА), значимости их определения в паренхиматозном и стромальном компонентах, на разных стадиях развития и при разной степени дифференцировки рака, их влияния на эффективность проводимой терапии [Martins S. F. et. al., 2013; Wang W. et. al., 2016]. Несмотря на это, авторы единодушно признали, что сведения о путях управления ангиогенезом дают широкие возможности для изменения взглядов на стратегию лечения злокачественных опухолей.

Все вышеизложенное определяет актуальность работы, служит обоснованием ее цели.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Связь работы с крупными научными программами и темами**

Тема диссертации соответствует перечню приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Министерства здравоохранения Республики Беларусь (постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы» от 19.04.2010, № 585), раздел 4, пункты 4.1 «самоорганизация живых систем, закономерности течения патологических процессов, коррекция жизненно важных функций» и 4.2 «новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний».

Исследование по изучению прогностического значения экспрессии МА в аденокарциноме толстой кишки (АТК) выполнено в рамках задания научно-исследовательской работы «Оценка диагностической и прогностической значимости факторов иммунного ответа при дисгормональных состояниях, воспалительных и опухолевых процессах», № государственной регистрации 20111127 (01.01.2011 – 31.12.2015 гг.); «Состояние местного иммунитета при воспалительных, репаративных, дисгормональных и опухолевых процессах», № государственной регистрации 20161616 (01.01.2016 – 31.12.2020 гг.).

### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования:** определить прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки.

### **Задачи исследования:**

1. Дать клинико-морфологическую характеристику наблюдений АТК и определить особенности экспрессии комплекса МА в краях резекции и опухоли разной степени дифференцировки и клинической стадии.
2. Оценить значимость уровней МА в АТК для прогноза неблагоприятного исхода заболевания и продолжительности безрецидивного периода.
3. Определить связь экспрессии МА с эффективностью химиотерапии рака толстой кишки и на основании полученных результатов построить математические модели для прогнозирования сроков скорректированной безрецидивной выживаемости пациентов с послеоперационной химиотерапией.
4. Создать алгоритм оценки эффективности проведения стандартной химиотерапии АТК с учетом уровней МА.

**Объект исследования:** архивный операционный материал резецированной толстой кишки 72 пациентов с АТК, регистр пациентов областного онкологического диспансера учреждения здравоохранения «Гродненская областная клиническая больница».

**Предмет исследования:** клинические и гистологические параметры АТК, характер экспрессии МА в аденокарциноме и нормальной слизистой оболочке толстой кишки.

### **Научная новизна**

Впервые выполнено гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование АТК с использованием комплекса молекулярно-биологических маркеров, включающих фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), нейропиплин (NRP1), матриксные металлопротеиназы (MMP-2 и MMP-9), трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ), эндоглин (CD105), экстрацеллюлярно регулируемая киназа (Erk2), индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS). Осуществлен сравнительный анализ экспрессии МА в клетках нормальной слизистой толстой кишки и аденокарциноме. Показано, что при разной степени дифференцировки и инвазивных свойствах аденокарцином изменялась экспрессия маркеров. В высокогредных аденокарциномах выявлена гиперэкспрессия TGF- $\beta$ , MMP-9, в низкогредных – VEGF-A, NRP1 и MMP-2. При возрастании клинической стадии нарастала ИГХ гетерогенность новообразований, однако стабильно сохранялась прямая корреляционная связь между стадией заболевания и уровнем CD105. Разработан ИГХ метод прогнозирования скорректированной безрецидивной выживаемости (СБВ) пациентов с низкогредной АТК.

С помощью дискриминантного анализа разработана модель, позволяющая на основании экспрессии VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 с высокой чувствительностью и специфичностью прогнозировать трех- и пятилетнюю СБВ пациентов, которым показана химиотерапия в послеоперационном периоде. Это дает возможность выделить группу риска проявления химиорезистентности, требующую более углубленного обследования и корректировки схемы химиотерапии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В аденокарциноме толстой кишки экспрессия CD105, VEGF-A, NRP1 и MMP-9 значимо выше, чем в ткани краев операционных разрезов, в то время как экспрессия iNOS достоверно выше в краях резекции. При возрастании степени злокачественности в опухоли увеличиваются уровни TGF- $\beta$ , MMP-9, а VEGF-A, NRP1 и MMP-2 остаются значимо выше в низкогредных новообразованиях. При возрастании клинической стадии нарастает иммуногистохимическая гетерогенность новообразований, однако стабильно сохраняется прямая корреляционная связь между стадией заболевания и уровнем CD105.

2. Количественная оценка экспрессии VEGF-A, NRP1, MMP-2, TGF- $\beta$  в стромальном и паренхиматозном компонентах аденокарциномы толстой кишки позволяет прогнозировать неблагоприятный исход заболевания и сроки

безрецидивного периода. К факторам неблагоприятного исхода в течение 5 лет после операции у пациентов с низкоградной аденокарциномой на ранней стадии следует отнести высокие уровни VEGF-A в строме опухоли, TGF- $\beta$  в ее паренхиме, низкую паренхиматозную экспрессию NRP1; на поздних стадиях – общую гиперэкспрессию MMP-2. У пациентов с высокоградной аденокарциномой фактором риска неблагоприятного исхода является высокий уровень TGF- $\beta$  в паренхиматозном ее компоненте.

3. Применение дискриминантного анализа позволяет на основании уровней VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 с высокой чувствительностью и специфичностью прогнозировать трех- и пятилетнюю скорректированную безрецидивную выживаемость пациентов, которым планируется назначение химиотерапии и выделять группу риска проявления химиорезистентности, требующую более углубленного обследования и возможной корректировки схемы химиотерапии.

### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Соискателем совместно с научным руководителем выбрана тема исследования, сформулированы цель и задачи, положения, выносимые на защиту, определены пути достижения поставленных задач. Диссертантом лично проведен анализ специальной медицинской литературы по теме диссертации, разработан дизайн исследования.

Автором произведен отбор пациентов для включения в исследование, выполнена выборка медицинской документации, осуществлено изготовление тканевых мультблоков, ИГХ исследование гистологических препаратов. Соискателем лично проведена микросъемка гистологических препаратов и количественная оценка экспрессии при помощи компьютерной программы Aperio Image Scope v9.1.19.1567, создана компьютерная база, включающая данные пациентов, показатели морфологического и иммуногистохимического исследования.

Диссертантом лично выполнены обобщение, систематизация, статистический анализ и интерпретация всех результатов, полученных в ходе выполнения работы, результаты изложены в опубликованных статьях, материалах съездов и конференций, тезисах, постерах. Консультативно-методическую помощь на разных этапах работы оказывали соавторы публикаций, при этом долевое участие соискателя в совместных публикациях – от 75 до 90%.

### **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Результаты исследований, включенных в диссертацию, докладывались на научно-практической конференции, посвященной 55-летию ГрГМУ (Гродно,

2013); X Варшавском Международном Конгрессе молодых ученых (Варшава, Польша, 2014); VIII Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора А. П. Солодкова (Витебск, 2014); Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» и 23-й итоговой научной сессии университета (Гомель, 2014); Республиканской научно-практической конференции «Современные достижения молодых ученых в медицине» (Гродно, 2014); 23-й Международной студенческой научной конференции (Гданьск, Польша, 2015); конференции студентов и молодых ученых ГрГМУ, посвященной памяти Ю. Г. Бойко (Гродно, 2015); конференции студентов и молодых ученых ГрГМУ, посвященной 100-летию со дня рождения А. З. Нечипоренко (Гродно, 2016); III съезде патологоанатомов Республики Беларусь (Витебск, 2016).

Результаты исследования внедрены в работу учреждений здравоохранения Республики Беларусь (ГУЗ «Гродненское областное патологоанатомическое бюро», УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро», ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»), а также в учебный процесс учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

### **Опубликование результатов диссертации**

По теме диссертации опубликовано: 6 статей в научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (3,19 авторских листа), 8 работ в рецензируемых сборниках научных трудов и материалах конференций, 8 тезисов докладов в сборниках конференций. Поданы 2 заявки на выдачу патента на изобретение (получены положительные решения предварительной экспертизы).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 5 глав (аналитический обзор литературы, материал и методы исследования, 3 главы результатов собственных исследований), заключения, библиографического списка и приложений. Диссертация изложена на русском языке, иллюстрирована 21 таблицей, 62 рисунками и приложениями. Список использованной литературы включает 271 источник, в том числе 230 работ иностранных авторов; список публикаций соискателя состоит из 25 работ (22 публикации, 2 заявки на выдачу патента и 1 удостоверение на рационализаторское предложение). Полный объем диссертации – 136 страниц.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Материал и методы исследования

Исследование проведено на архивном гистологическом операционном материале 72 АТК, верифицированных и удаленных у 29 мужчин (40,3%) и 43 (59,7%) женщин в учреждении здравоохранения «Гродненская областная клиническая больница» в период с января 2001 г. по декабрь 2011 г. Медиана возраста на момент операции составила 65,06 (60,42-72,86) лет.

Клинические данные получены из историй болезни, амбулаторных карт, регистра пациентов областного онкологического диспансера учреждения здравоохранения «Гродненская областная клиническая больница». Колоректальный рак в подавляющем числе случаев (81,9%) локализовался в левых отделах толстой кишки. Категория pT распределилась следующим образом: 2 – 25%, 3 – 68,1%, 4 – 6,9%. Категория pN: 0 – 38,9%, 1 – 45,8%, 2 – 15,3%. Категория pM1 установлена в 16,7% случаев. Степень злокачественности (категория G) была представлена: 1 – 40,3%, 2 – 36,1%, 3 – 23,6%. Химиотерапия в послеоперационном периоде проводилась 27 пациентам с III-IV стадиями и по решению консилиумов – пациентам с I-II стадиями и низкой степенью дифференцировки рака. Препаратом выбора у всех пациентов был 5-фторурацил.

Длительность наблюдения составила от 1 до 180 месяцев. Наблюдение считалось завершенным по времени диагностики рецидива и/или метастазов или смерти от основного заболевания.

### Дизайн исследования

Структура научной работы состоит из проспективного поперечного (одномоментного) аналитического, продольного (динамического) и сравнительного исследований, включает следующие этапы:

1. Характеристика экспрессии CD105, VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , Erk2, iNOS в АТК была дана на основе проспективного поперечного сравнительного исследования 72 аденокарцином и 20 фрагментов краев резекции.

2. Значение экспрессии MA в АТК для прогноза СБВ пациентов было установлено с помощью проспективного продольного исследования 71 АТК.

3. Прогностическое значение экспрессии MA при АТК с послеоперационной химиотерапией установлено путем проспективного продольного сравнительного исследования 27 пациентов, прооперированных и прошедших курс химиотерапии в период с января 2001 г. по декабрь 2005 г. и 45 пациентов без химиотерапии (группы сравнения).

## Методы исследования

Для выполнения задач и достижения цели исследования нами применялись следующие методы: гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и статистический.

Для исследования выбирали блоки с сохраненной структурой ткани, без некрозов и геморагий. Гистологические срезы толщиной 4 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для обзорной микроскопии с последующей реклассификацией на основании критериев Международной гистологической классификации по патологии пищеварительной системы.

ИГХ исследование проводили на парафиновых срезах из изготовленных вручную тканевых мультиблоков с применением первичных антител к CD105 в разведении 1:100, VEGF-A (1:100), Erk2 (1:100), iNOS (1:100), TGF- $\beta$  (1:500) производства Abcam; MMP-2 (1:40) производства Novocastra; MMP-9 (1:50) производства Dako-Cytomation.

Результаты ИГХ исследования оценивали с помощью морфометрического метода: подсчитывали количество позитивных клеток в максимально возможном количестве неперекрывающихся полей зрения при увеличении микроскопа 100 с использованием компьютерной программы Aperio Image Scope v9.1.19.1567. Результаты оценивали исходя из показателя «позитивность» (в интерфейсе программы «positivity») – отношение положительных пикселей к общему количеству пикселей. В АТК определяли уровни общей, паренхиматозной и стромальной позитивности VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , Erk2, iNOS, стромальную экспрессию CD105; в слизистой краев резекции – общую позитивность всех изучаемых МА.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q). В связи с тем, что распределение количественных параметров отличалось от нормального ( $p < 0,05$ ), анализ провели с применением методов непараметрической статистики. При представлении числовых значений использована медиана, 25-75 процентиля: Me (Q25%-Q75%).

## Результаты исследования

Уровни общей позитивности изучаемых антигенов в опухоли и краях операционных разрезов представлены в таблице 1.

Нами выявлены различия экспрессии МА в паренхиматозном и стромальном компонентах опухоли. Так, уровень позитивности VEGF-A в клетках опухоли выше, чем в ее микроокружении – 0,990 (0,968-0,994) и 0,958 (0,925-0,986), соответственно;  $p=0,003$ . Уровень NRP1 в строме опухоли значимо выше, чем в паренхиме (0,811 (0,736-0,888) и 0,561 (0,520-0,674), соответственно;  $p < 0,001$ ).

Таблица 1. – Общая позитивность экспрессии VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS в опухоли и краях операционных разрезов

Антиген	Уровень общей позитивности		p
	Опухоль	Края резекции	
VEGF-A	0,978 (0,941-0,989)	0,911 (0,861-0,952)	0,004
NRP1	0,728 (0,611-0,801)	0,424 (0,297-0,583)	0,001
MMP-2	0,040 (0,022-0,075)	0,045 (0,019-0,127)	0,357
MMP-9	0,526 (0,381-0,651)	0,422 (0,363-0,532)	0,013
TGF- $\beta$	0,540 (0,279-0,738)	0,535 (0,132-0,820)	0,840
CD105	0,713 (0,486-0,815)	0,00086 (0,00048-0,0049)	<0,001
Erk2	0,017 (0,004-0,034)	0,026 (0,022-0,030)	0,793
iNOS	0,735 (0,660-0,880)	0,960 (0,910-0,980)	<0,001

Уровень MMP-2 в стромальном компоненте опухоли существенно выше, чем в паренхиматозном – 0,042 (0,018-0,087) и 0,025 (0,006-0,0516), соответственно;  $p < 0,001$ . Паренхиматозная экспрессия MMP-9 в опухоли достоверно выше, чем стромальная (0,665 (0,481-0,803) и 0,385 (0,258-0,492), соответственно;  $p < 0,001$ ).

В опухоли TGF- $\beta$  экспрессируется преимущественно в паренхиме (0,732 (0,426-0,930)) и в меньшей степени – в строме (0,376 (0,145-0,657)),  $p < 0,001$ . Уровень Erk2 в клетках опухоли существенно выше, чем в ее микроокружении – 0,016 (0,004-0,038) и 0,003 (0,002-0,011), соответственно;  $p < 0,001$ .

iNOS экспрессируется преимущественно опухолевыми клетками (0,795 (0,660-0,890)) и в меньшей степени – клетками стромы (0,755 (0,670-0,850)), однако эти различия недостоверны ( $p = 0,275$ ).

Возраст пациентов в 23,9% случаев был менее 60 лет (группа 1), в 63,4% – от 60 до 74 лет (группа 2), и в 12,7% – 75 лет и старше (группа 3). Статистически значимым оказался высокий уровень стромальной экспрессии TGF- $\beta$  у пациентов группы 3 по сравнению с группами 1 и 2 – 0,775 (0,565-0,825); 0,282 (0,102-0,480) и 0,327 (0,144-0,610), соответственно (во всех случаях сравнений  $p < 0,013$ ).

Экспрессия CD105, VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , Erk2, iNOS в опухоли у пациентов мужского и женского пола статистически значимо не различалась (во всех случаях сравнений  $p > 0,05$ ).

В дистально локализованном раке толстой кишки паренхиматозная и стромальная экспрессия VEGF-A, NRP1 и MMP-2 значимо выше (таблица 2).

Таблица 2. – Экспрессия VEGF-A, NRP1, MMP-2 в зависимости от локализации опухоли

Экспрессия антигена в опухоли		Локализация		p
		проксимальная (n=13)	дистальная (n=59)	
VEGF-A	паренхиматозная	0,906 (0,686-0,990)	0,992 (0,974-0,995)	0,008
	стромальная	0,927 (0,816-0,954)	0,966 (0,946-0,988)	0,004
NRP1	паренхиматозная	0,543 (0,505-0,550)	0,604 (0,538-0,689)	0,021
	стромальная	0,739 (0,694-0,792)	0,836 (0,758-0,898)	0,015
MMP-2	паренхиматозная	0,006 (0,004-0,015)	0,027 (0,010-0,053)	0,009
	стромальная	0,018 (0,012-0,033)	0,048 (0,029-0,108)	0,001

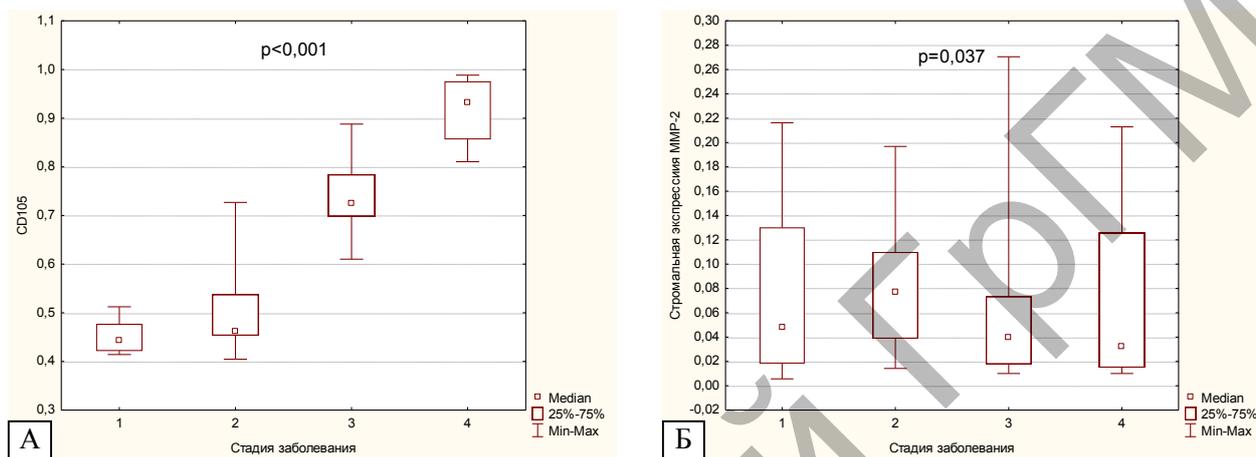
В высокогредных АТК (G3) медиана позитивности MMP-9 в стромальном компоненте опухоли и показатели экспрессии TGF- $\beta$  в обоих ее компонентах значимо выше, чем в аденокарциномах с низким грейдом (G1-2). В низкогредных аденокарциномах паренхиматозная и стромальная экспрессия VEGF-A, NRP1 и MMP-2 значимо выше, чем в аденокарциномах с высоким грейдом (таблица 3).

Таблица 3. – Экспрессия VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$  в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Экспрессия антигена в опухоли		Грейд		p
		G1-2 (n=55)	G3 (n=17)	
VEGF-A	паренхиматозная	0,992 (0,976-0,995)	0,719 (0,679-0,990)	<0,001
	стромальная	0,964 (0,946-0,988)	0,924 (0,809-0,986)	0,013
NRP1	паренхиматозная	0,622 (0,547-0,700)	0,532 (0,510-0,544)	<0,001
	стромальная	0,854 (0,758-0,920)	0,755 (0,699-0,791)	<0,001
MMP-2	паренхиматозная	0,029 (0,013-0,068)	0,007 (0,004-0,011)	<0,001
	стромальная	0,048 (0,029-0,093)	0,019 (0,012-0,051)	0,012
MMP-9	паренхиматозная	0,651 (0,462-0,762)	0,789 (0,520-0,899)	0,122
	стромальная	0,360 (0,245-0,466)	0,532 (0,371-0,651)	0,023
TGF- $\beta$	паренхиматозная	0,590 (0,412-0,847)	0,930 (0,748-0,960)	0,004
	стромальная	0,257 (0,106-0,406)	0,815 (0,590-0,850)	<0,001

С увеличением стадии заболевания уровень позитивности CD105 в строме опухоли значимо возрастает ( $r=0,826$ ,  $p<0,001$ ) (рисунок 1 А). При этом различия оказались значимыми между каждой из стадий: I и II – (0,444 (0,421-0,477) и 0,538 (0,457-0,710);  $p=0,009$ ), I и III – (0,444 (0,421-0,477) и

0,727 (0,699-0,789);  $p < 0,001$ ), I и IV – (0,444 (0,421-0,477) и 0,933 (0,856-0,976);  $p < 0,001$ ), II и III – (0,538 (0,457-0,710) и 0,727 (0,699-0,789);  $p < 0,001$ ), II и IV – (0,538 (0,457-0,710) и 0,933 (0,856-0,976);  $p < 0,001$ ), III и IV – (0,727 (0,699-0,789) и 0,933 (0,856-0,976);  $p < 0,001$ ). Уровень MMP-2 в строме опухоли достоверно отрицательно коррелирует со стадией заболевания ( $r = -0,249$ ;  $p = 0,037$ ) (рисунок 1 Б). Статистически значимые различия установлены между II и III стадиями – (0,077 (0,042-0,093) и 0,029 (0,016-0,053);  $p = 0,002$ ).



**Рисунок 1. – Экспрессия CD105 (А) и MMP-2 (Б) в строме опухоли в зависимости от стадии заболевания**

Выявлена также тенденция к достоверной связи стадии процесса и уровня VEGF-A в паренхиме опухоли ( $r = -0,226$ ;  $p = 0,075$ ): при II стадии он был незначительно выше, чем при IV (0,984 (0,965-0,991) и 0,966 (0,781-0,983);  $p = 0,056$ ).

За период наблюдения умерли 45 пациентов (62,5%). При этом прогрессирование заболевания стало причиной смерти у 37 пациентов (51,4%). Медиана СБВ составила 2,5 (1,6-4,2) года. Показатель СБВ пациентов для однолетнего временного интервала составил 88,1%, трехлетнего – 64,2% и пятилетнего – 47,8%. Принимая во внимание, что в первые пять лет наблюдения у большей части пациентов наступили рецидив заболевания или смерть от него, именно этот срок был принят для разделения пациентов на группы исследования – с низкой (39 пациентов) и высокой (32 пациента) выживаемостью. Один случай посчитали пропавшим (смерть пациента наступила спустя 3 месяца после операции от причин, не связанных с рецидивом заболевания).

Методом многофакторного регрессионного анализа установлено, что значимыми морфологическими факторами риска развития неблагоприятного исхода заболевания в течение пяти лет после хирургического удаления опухоли являются: высокий грейд и поздняя стадия заболевания. Для расчета относительного риска (ОР) возникновения неблагоприятного исхода проведен сравнительный анализ влияния их гипер- и гипоекспрессии (относительно точки разделения, определенной с помощью ROC-анализа) на исход заболевания.

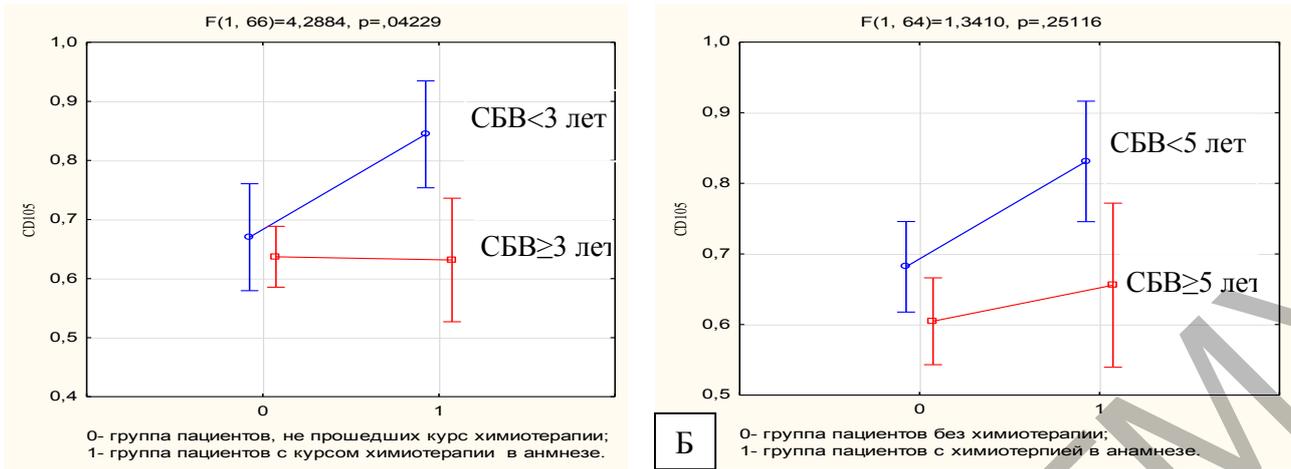
Пациенты были поделены на 3 группы: в группе 1 – 21 пациент с I-II стадиями (без лимфо- и гематогенных метастазов), во группе 2 – 28 пациентов с III стадией рака (с поражением лимфатических узлов метастазами), в группе 3 – 6 пациентов с IV стадией рака (с наличием гематогенных метастазов).

Нами установлено, что факторами риска неблагоприятного исхода у пациентов группы 1 являются: уровень VEGF-A в строме аденокарциномы выше 0,980 (ОР (95% ДИ)=4,8 (1,31-17,66);  $p=0,036$ ), уровень NRP1 в опухолевых клетках, равный или ниже 0,566 (ОР (95% ДИ)=4,8 (1,31-17,66);  $p=0,036$ ), уровень TGF- $\beta$  в паренхиматозном компоненте опухоли выше 0,830 (ОР (95% ДИ)=6,0 (1,01-39,75);  $p=0,047$ ). Расчет ОР возникновения неблагоприятного исхода в течение пяти лет у пациентов группы 2 прогнозируется при уровне общей позитивности MMP-2 выше 0,034 (ОР (95% ДИ)=6,1 (1,02-40,68);  $p=0,025$ ). В связи с небольшим количеством пациентов группы 3 (6 случаев) расчет ОР неблагоприятного исхода не производился.

Учитывая тот факт, что медиана СБВ у пациентов с высоким грейдом составляет 1,5 (1,0-2,3) года, расчет ОР неблагоприятного исхода заболевания проводили для двухлетнего временного интервала. Фактором риска неблагоприятного исхода у пациентов с высокогредной опухолью является гиперэкспрессия TGF- $\beta$  ( $>0,940$ ) в паренхиматозном компоненте опухоли (ОР (95% ДИ)=3,7 (1,39-9,63);  $p=0,045$ ). В связи с небольшим количеством пациентов с высокогредной АТК (16 случаев) расчет ОР неблагоприятного исхода в зависимости от стадии заболевания не представляется возможным.

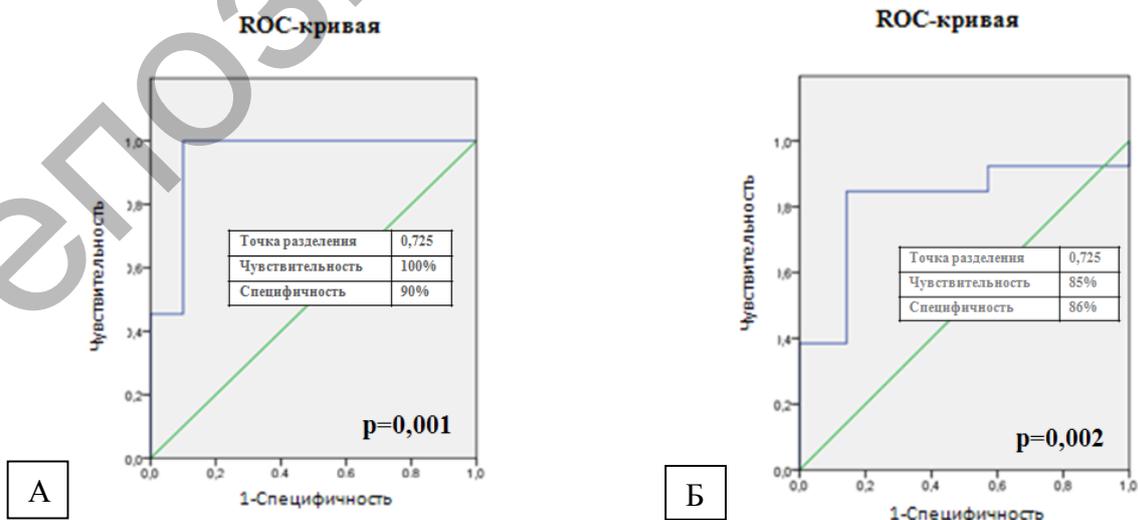
В настоящее время отсутствует математическое обоснование СБВ пациентов с послеоперационной химиотерапией с использованием комплекса ИГХ МА. Для разработки метода прогнозирования клинических исходов у пациентов, получавших химиотерапию после удаления АТК, из 27 наблюдений случайным образом было отобрано 5 случаев (контрольная выборка). Оставшиеся 22 наблюдения составили обучающую выборку (группа 1). В группу сравнения включены 45 пациентов с АТК без химиотерапии (группа 0). Группирующим признаком выбран исход рака через 3 и 5 лет от момента оперативного вмешательства, оцениваемый по СБВ.

Установлена статистическая значимость вкладов переменной трехлетняя СБВ ( $F=8,05$ ;  $p=0,006$ ), а также сочетания двух независимых переменных ( $F=4,29$ ;  $p=0,04$ ) в дисперсию уровня экспрессии CD105 (рисунок 2 А). При использовании в качестве группирующих переменных информации о пятилетней СБВ и наличии химиотерапии в анамнезе установлено, что на дисперсию показателя экспрессии CD105 статистически значимо влияют обе независимые переменные по отдельности ( $F=8,87$ ;  $p=0,004$  и  $F=5,58$ ;  $p=0,02$ , соответственно), но не их композиция ( $F=1,64$ ;  $p=0,25$ ) (рисунок 2 Б).



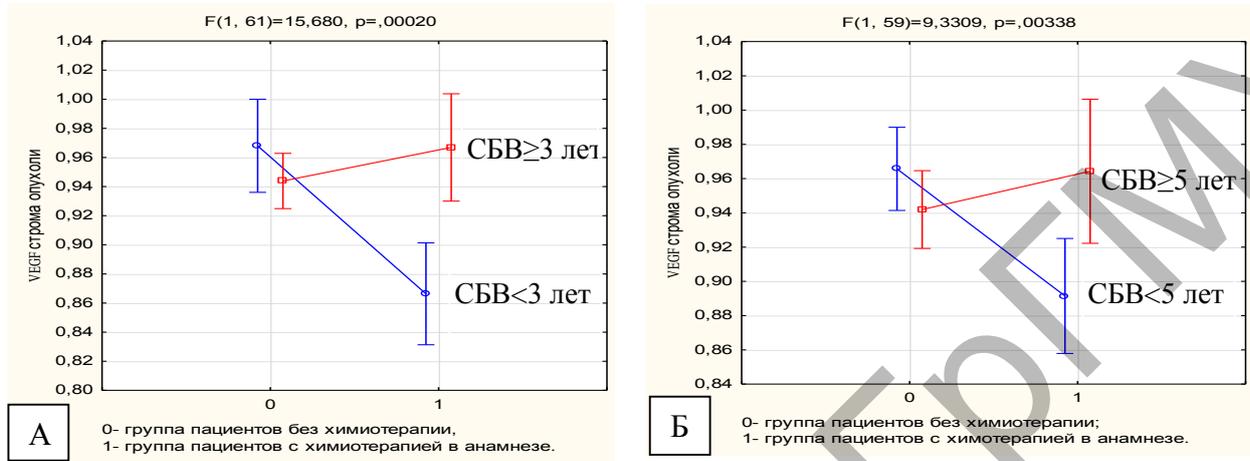
**Рисунок 2. – Экспрессия CD105 в зависимости от трех- (А) и пятилетней (Б) СБВ пациентов с послеоперационной химиотерапией и группы сравнения**

Статистически значимые различия экспрессии CD105 в группе пациентов без химиотерапии в зависимости от трех- и пятилетней СБВ отсутствуют: выживаемость менее трех лет – 0,70 (0,50-0,83), выживаемость более трех лет – 0,69 (0,46-0,76),  $p=0,88$ ; выживаемость менее пяти лет – 0,69 (0,46-0,82), выживаемость более пяти лет – 0,63 (0,46-0,72),  $p=0,93$ . В группе пациентов с послеоперационной химиотерапией, не перешагнувших рубеж трех- и пятилетней СБВ, уровень CD105 достоверно выше (0,86 (0,80-0,96) и 0,86 (0,77-0,94), соответственно), чем у пациентов, проживших более трех и пяти лет без рецидива и новых гематогенных метастазов (0,69 (0,48-0,70) и 0,70 (0,48-0,72), соответственно);  $p=0,003$  и  $p=0,023$ , соответственно. С помощью ROC-анализа определили точки разделения для прогнозирования трех- и пятилетней выживаемости у пациентов с химиотерапией в послеоперационном периоде в зависимости от уровня CD105 (рисунок 3).



**Рисунок 3. – ROC-кривая при прогнозировании трех- (А) и пятилетней (Б) СБВ в зависимости от уровня экспрессии CD105 у пациентов с химиотерапией**

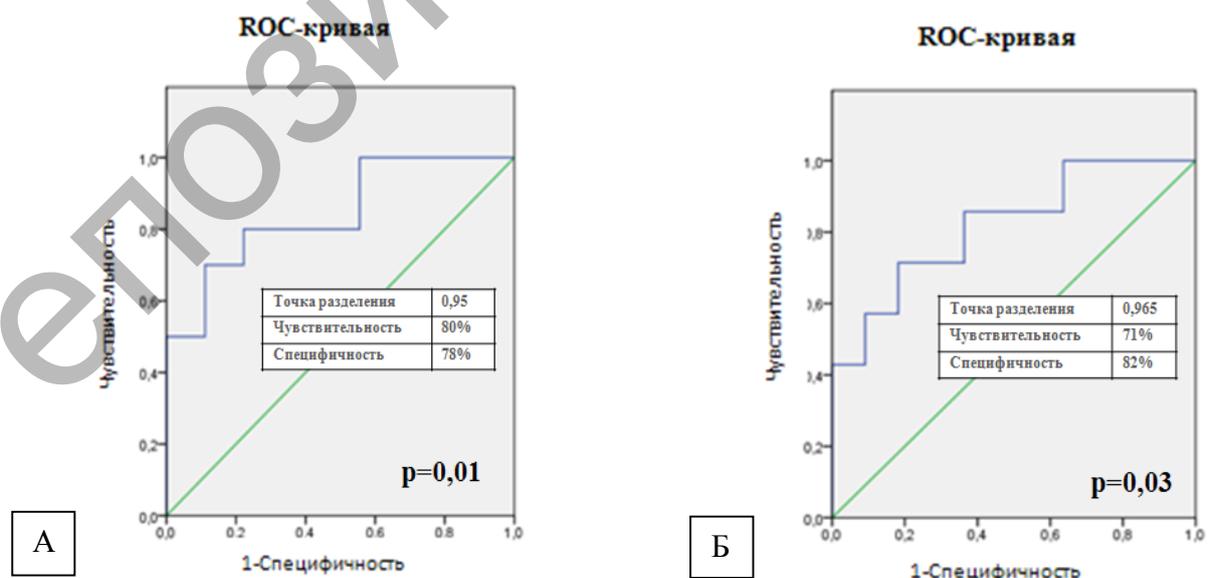
При оценке влияния группирующих переменных на уровень VEGF-A в строме установлено, что достоверен вклад как каждой из независимых переменных (для трехлетней СБВ –  $F=5,89$ ;  $p=0,02$ , для химиотерапии –  $F=6,24$ ;  $p=0,015$ ), так и их сочетания  $F=15,68$ ;  $p=0,0002$ ) (рисунок 4 А).



**Рисунок 4. – Стромальная экспрессия VEGF-A в зависимости от трех- (А) и пятилетней (Б) СБВ пациентов с химиотерапией и группы сравнения**

Аналогичные результаты были получены при анализе вклада пятилетней СБВ пациентов: влияние группирующих переменных по отдельности было недостоверным (в обоих случаях  $p>0,05$ ), а вклад их композиции статистически значим ( $F=9,33$ ;  $p=0,003$ ) (рисунок 4 Б).

ROC-анализ позволил определить точки разделения для прогнозирования трех- и пятилетней выживаемости у пациентов с химиотерапией в зависимости от уровня VEGF-A в опухолевой строме (рисунок 5).



**Рисунок 5. – ROC-кривая при прогнозировании трех- (А) и пятилетней (Б) СБВ в зависимости от уровня стромальной экспрессии VEGF-A у пациентов с химиотерапией**

При построении математической модели для прогнозирования исхода заболевания (дискриминантной функции) прямым пошаговым методом у пациентов с АТК и химиотерапией были использованы 59 клинико-анамнестических и морфологических показателей. Однако установлено, что достоверно влияют на СБВ только 4 из них. Анализ классификационной матрицы, значение лямбды Уилкса, равное 0,33, значения F-критерия (для трехлетней СБВ равного 9,90 при  $p < 0,00081$ , для пятилетней – 7,53 при  $p < 0,0052$ ) позволяют сделать вывод, что данная классификация является корректной.

Для прогнозирования СБВ при наличии химиотерапии в анамнезе необходимо определить уровни позитивности VEGF-A, CD105, MMP-9 в строме опухоли и Erk2 в ее паренхиме. Затем подставить полученные значения в дискриминантные уравнения:

$$y_1 = 8,7808 - 23,0247m_1 + 14,9021m_2 + 33,2538m_3,$$

$$y_2 = -25,7033 + 15,0461m_2 + 75,3570m_3 + 31,5051m_4,$$

где  $m_1$  – уровень стромальной позитивности VEGF-A;  
 $m_2$  – уровень стромальной позитивности CD105;  
 $m_3$  – уровень паренхиматозной позитивности Erk2;  
 $m_4$  – уровень стромальной позитивности MMP-9 в опухоли.

Если  $y_1 > 0$  и  $y_2 > 0$ , прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в течение трех лет: смерть от основного заболевания, выявление отдаленных метастазов или локорегионарного рецидива. Если  $y_1 \leq 0$ , а  $y_2 > 0$ , прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в период от трех до пяти лет. Если  $y_2 \leq 0$  (независимо от величины  $y_1$ ) – СБВ прогнозируют больше пяти лет.

Чувствительность дискриминантной модели для прогнозирования трехлетней СБВ ( $y_1$ ) составляет 100%, специфичность – 88,9%. Прогностическая значимость положительного результата (неблагоприятный прогноз трехлетней выживаемости) – 100%. Прогностическая значимость отрицательного результата (благоприятный прогноз) – 90,9%. Общая прогностическая значимость 94,7%.

Чувствительность дискриминантной модели для прогнозирования пятилетней СБВ ( $y_2$ ) составляет 83,3%, специфичность – 100%. Прогностическая значимость положительного результата (неблагоприятный прогноз пятилетней выживаемости) – 71,4%. Прогностическая значимость отрицательного результата (благоприятный прогноз) – 100,0%. Общая прогностическая значимость 88,2%.

Результаты прогноза СБВ в контрольной выборке в 100% случаев совпадали с катанестическими данными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. В аденокарциноме толстой кишки экспрессия CD105, VEGF-A, NRP1 и MMP-9 значимо выше, чем в ткани краев операционных разрезов ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,013$ , соответственно), в то время как экспрессия iNOS достоверно выше в краях резекции ( $< 0,001$ ). При этом уровни VEGF-A, MMP-9, Erk2, TGF- $\beta$  в опухолевой паренхиме выше, чем в строме ( $p < 0,01$ ), а стромальная экспрессия NRP1 и MMP-2 достоверно выше, чем паренхиматозная ( $p < 0,001$ ) [2, 3, 11, 13, 16-19, 21].

2. В высокогредной аденокарциноме уровни MMP-9 в строме ( $p = 0,023$ ) и TGF- $\beta$  в обоих ее компонентах ( $p < 0,004$ ) выше, чем в низкогредной, а уровни VEGF-A, NRP1 и MMP-2 значимо выше в паренхиме и строме низкогредной аденокарциномы (во всех случаях сравнений  $p < 0,025$ ). Установлены статистически значимые различия экспрессии изучаемых маркеров в зависимости от клинической стадии заболевания. Прямая корреляционная связь выявлена между стадией заболевания и уровнем CD105 в опухоли ( $r = 0,826$ ,  $p < 0,001$ ). Стромальная экспрессия MMP-2 максимально выражена у пациентов со II стадией заболевания ( $p = 0,037$ ) при глубине инвазии, соответствующей категории pT2 ( $p < 0,02$ ) [2, 3, 15, 22].

3. Иммуногистохимическими факторами риска неблагоприятного (в отношении пятилетней скорректированной безрецидивной выживаемости) исхода у пациентов с низкогредной аденокарциномой толстой кишки I-IIA стадий являются: уровень VEGF-A в строме выше 0,980 (OR (95% ДИ) = 4,8 (1,31-17,66);  $p = 0,036$ ), уровень NRP1 в опухолевых клетках, равный или ниже 0,566 (OR (95% ДИ) = 4,8 (1,31-17,66);  $p = 0,036$ ), уровень TGF- $\beta$  в паренхиматозном компоненте опухоли выше 0,830 (OR (95% ДИ) = 6,0 (1,01-39,75);  $p = 0,047$ ). У пациентов с низкогредной аденокарциномой толстой кишки IIIA-C стадии низкая скорректированная безрецидивная выживаемость наблюдается при уровне общей позитивности MMP-2 выше 0,034 (OR (95% ДИ) = 6,1 (1,02-40,68);  $p = 0,025$ ). Фактором риска неблагоприятного исхода в течение двух лет у пациентов с высокогредной опухолью является гиперэкспрессия TGF- $\beta$  ( $> 0,940$ ) в паренхиматозном компоненте опухоли (OR (95% ДИ) = 3,7 (1,39-9,63);  $p = 0,045$ ) [6, 9, 10, 14, 21].

4. Скорректированную безрецидивную выживаемость пациентов с аденокарциномой толстой кишки и послеоперационной химиотерапией с высокой степенью надежности можно прогнозировать по уровням VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9, согласно следующему алгоритму:

- Скорректированную безрецидивную выживаемость менее трех лет можно ожидать при уровнях VEGF-A  $< 0,95$  (чувствительность 80%, специфичность 78%) и CD105  $\geq 0,725$  (чувствительность 100%, специфичность 90%) в строме опухоли.

- Продолжительность жизни пациента от трех до пяти лет прогнозируется, если VEGF-A в строме опухоли будет  $<0,965$ , но  $\geq 0,95$  (чувствительность 71%, специфичность 82%), а CD105  $\geq 0,725$  (чувствительность 85%, специфичность 86%).
- Скорректированную безрецидивную выживаемость более пяти лет можно прогнозировать при уровнях VEGF-A в опухолевой строме  $\geq 0,965$  (чувствительность 71%, специфичность 82%), а CD105  $< 0,725$  (чувствительность 85%, специфичность 86%).
- В случае, когда ни одно из указанных выше условий не выполняется, для прогнозирования эффективности послеоперационной терапии следует использовать дискриминантные уравнения:

$$y_1 = 8,7808 - 23,0247m_1 + 14,9021m_2 + 33,2538m_3,$$

$$y_2 = -25,7033 + 15,0461m_2 + 75,3570m_3 + 31,5051m_4,$$

где  $m_1$  – уровень стромальной позитивности VEGF-A;  
 $m_2$  – уровень стромальной позитивности CD105;  
 $m_3$  – уровень паренхиматозной позитивности Erk2;  
 $m_4$  – уровень стромальной позитивности MMP-9 в опухоли.

Если  $y_1 > 0$  и  $y_2 > 0$ , прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в течение трех лет: смерть от основного заболевания, выявление отдаленных метастазов или локорегионарного рецидива. Если  $y_1 \leq 0$ , а  $y_2 > 0$ , прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в период от трех до пяти лет. Если  $y_2 \leq 0$  (независимо от величины  $y_1$ ), скорректированную безрецидивную выживаемость прогнозируют больше пяти лет. Чувствительность дискриминантной модели для прогнозирования трехлетней скорректированной безрецидивной выживаемости ( $y_1$ ) составляет 100%, специфичность – 88,9%, для пятилетней ( $y_2$ ) – 83,3% и 100%, соответственно [1, 4, 5].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Изменение экспрессии маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки необходимо учитывать при определении режима наблюдения за пациентом после удаления опухоли. Неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с верифицированной низкоградной аденокарциномой толстой кишки является увеличение экспрессии VEGF-A в строме опухоли, TGF- $\beta$  в ее паренхиме, а также уменьшение показателя паренхиматозной экспрессии NRP1 на I-IIA стадиях заболевания и общая гиперэкспрессия MMP-2 в опухоли на IIIA-C стадии [6, 9, 10, 24]. Неблагоприятный прогностический фактор у пациентов с верифицированной высокоградной аденокарциномой толстой кишки – паренхиматозная гиперэкспрессия TGF- $\beta$  [14, 21].

2. Уровни VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 в опухоли рекомендуется учитывать при определении химиотерапевтической тактики у пациентов с аденокарциномой толстой кишки. С помощью предложенного алгоритма можно прогнозировать эффективность послеоперационной химиотерапии [1, 4, 5, 23].

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ****Статьи в рецензируемых журналах**

1. Значение уровня позитивности CD105 в раке толстой кишки для прогноза эффективности химиотерапии / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Евраз. онкол. журн. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 35-42.

2. Оценка прогностической значимости уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 в раке толстой кишки / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – Т. 46, № 4. – С. 36-40.

3. Прогностическое значение уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в колоректальном раке / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Журн. ГрГМУ. – 2015. – № 3 (51). – С. 64-69.

4. Роль уровня экспрессии маркеров ангиогенеза в прогнозе эффективности послеоперационной химиотерапии колоректального рака / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Вестн. ВГМУ. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 84-92.

5. Прогноз эффективности послеоперационной химиотерапии пациентов с колоректальным раком по уровню экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в опухоли и микроокружении / Т.Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Евраз. онкол. журн. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 42-48.

6. Штабинская, Т. Т. Прогностическое значение экспрессии маркеров ангиогенеза в низкоккачественном раке дистального отдела толстой кишки / Т. Т. Штабинская // Журн. ГрГМУ. – 2016. – № 3 (55). – С. 62-65.

**Публикации в сборниках научных трудов  
и материалах конференций**

7. Оценка прогностической значимости уровня экспрессии индуцибельной NO-синтазы в раке толстой кишки / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Современные подходы в клинко-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека : сб. науч. тр. Всерос. конф. с междунар. участием памяти чл.-корр. РАМН, з.д.н. РФ, проф. О. К. Хмельницкого. – СПб., 2015. – С. 376-380.

8. Петрушко, М. Ю. Экспрессия металлопротеиназы-9 в раке толстой кишки / М. Ю. Петрушко, Т. Т. Штабинская, М. Боднар // Материалы 62-й Всероссийской межвузовской студенческой научной конференции с международным участием с проведением открытого конкурса на лучшую студенческую научную работу, 21 апр. 2016. – Тверь, 2016. – С. 384-385.

9. Штабинская, Т. Т. Прогностическое значение экспрессии маркеров ангиогенеза в низкоквалифицированных опухолях толстой кишки / Т. Т. Штабинская, С. А. Ляликов, В. А. Басинский // Прижизненная морфологическая диагностика наиболее частых и социально значимых заболеваний человека (современные направления, пути совершенствования и инновационные технологии) : материалы III Респ. съезда патологоанатомов с междунар. участием, Витебск, 20-21 окт. 2016 / ВГМУ ; ред.: А. Т. Щастный [и др.]. – Витебск, 2016. – С. 116-118.

10. Shtabinskaya, T. T. Influence of clinical, morphological and immunohistochemical parameters on the survival of patients with colorectal cancer / T. T. Shtabinskaya // Achievement of high school – 2016: материалы за XII Междунар. науч.-практ. конф, София, 17-25 Nov., 2016. – София, 2016. – P. 22-24.

11. Shtabinskaya, T.T. The prognostic significance of the expression of angiogenic markers in colon cancer depends on the stage of disease / T.T. Shtabinskaya // Modern European science – 2016: materials of the XII intern.sci. and practical conf. – Sheffield, June 30 – July 7, 2016. – P. 13-15.

12. Shtabinskaya, T.T. The prognostic significance of the expression of angiogenic markers in high-grade adenocarcinoma of the colon / T.T. Shtabinskaya, E.N. Kendysh // Conduct of modern science – 2016: materials of the XII intern. Sci. and practical conf., Sheffield, Nov. 30 – Dec. 7, 2016. – Sheffield, 2016. – P. 41-43.

13. Shtabinskaya, T. T. The prognostic significance of the expression of angiogenic markers in low-grade colon cancer in I-II stage of disease / T. T. Shtabinskaya // Научни потенциал на света – 2016 : материалы за XII Междунар. науч.-практ. конф, 17-15 Sept., 2016. – София, 2016. – P. 24-26.

14. Shtabinskaya, T. T. Expression of angiogenic markers depending on the degree of colon adenocarcinoma differentiation / T. T. Shtabinskaya, E. N. Kendysh // Наука и технологии: шаг в будущее – 2017: материалы XI Междунар. науч.-практ. конф., Прага, 22-28.02.2017. – Прага, 2017. – С. 10-13.

#### Тезисы докладов

15. Assessment of the predictive role of level of the expression of TGF- $\beta$  at the colon rectal cancer : 10<sup>th</sup> Warsaw intern. Med. Congr. for Young Sci., Warsaw, May 15-18, 2014/ E. N.Kendysh, T.T. Shtabinskaya, M. Bodnar, S.A. Lyalikov, V. A. Basinski, A. K. Marszalek // Arch. Med. Sci. – 2014. – P. 176-177.

16. Зависимость уровня экспрессии нейропиллина 1 в раке толстой кишки и его микроокружении от клинико-морфологических показателей / В. В. Живицкая, А. В. Говор, Т. Т. Штабинская, М. Боднар // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Бойко Ю. Г., [Гродно], 23-24 апр. 2015 г. [Электронный ресурс] / МЗ Респ. Беларусь, УО «ГрГМУ», Каф. патол. анатомии, СНО, Совет молодых ученых ; [редкол.: В. А. Снежицкий

(отв. ред. и др.)). – Гродно : ГрГМУ, 2015. – Электрон. текстовые дан. и прогр. (5,37 Мб). – С. 199-200. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

17. Равданович, А. Ю. Экспрессия ERK-2 в раке толстой кишки. Корреляция с метастазированием и прогнозом течения заболевания / А. Ю. Равданович, Т. Т. Штабинская, М. Боднар // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Бойко Ю. Г., [Гродно], 23-24 апр. 2015 г. [Электронный ресурс] / МЗ Респ. Беларусь, УО «ГрГМУ», Каф. патол. анатомии, СНО, Совет молодых ученых ; [редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред. и др.)]. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – Электрон. текстовые дан. и прогр. (5,37 Мб). – С. 482-483. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

18. Штабинская, Т. Т. Корреляция уровня экспрессии CD 105 в раке толстой кишки с прогнозом течения заболевания / Т. Т. Штабинская, Е. Н. Кендыш, М. Боднар // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Бойко Ю. Г., [Гродно], 23-24 апр. 2015 г. [Электронный ресурс] / МЗ Респ. Беларусь, УО «ГрГМУ», Каф. патол. анатомии, СНО, Совет молодых ученых ; [редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред. и др.)]. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – Электрон. текстовые дан. и прогр. (5,37 Мб). – С. 638-639. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

19. Comparative description of expression of neuropilin 1 in proximally and distally localized cancers / T. Shtabinskaya, M. Bodnar, W. Zivitskaya, A. Govor // 10<sup>th</sup> Bialystok International Medical Congress for Young Scientists : abstr. submission, 14-16 maja 2015. – Bialystok, 2015. – P. 187.

20. Shtabinskaya, T. Expression of transforming growth factor in the transition zone of cancer in normal colon mucosa / T. Shtabinskaya, E. Kendysh, M. Bodnar // 10<sup>th</sup> International Medical Students' Congress in Novi Sad : abstr. book, Serbia, July 16-17, 2015. – Novi Sad, 2015. – P. 38.

21. Significance of Neuropilin 1 expression in colorectal cancer for the prognosis of the disease course / T. Shtabinskaya, M. Bodnar, W. Zivitskaya, A. Govor // 23<sup>th</sup> International students scientific conference, April 23-25, 2015. – Gdansk, 2015. – P. 186.

22. Юхник, О. И. Выживаемость пациентов с колоректальным раком в зависимости от уровня экспрессии Erk2 / О. И. Юхник, А. Ю. Равданович, Т. Т. Штабинская // Мечниковские чтения-2016 : сб. материалов 89-й конф. СНО, Санкт-Петербург, 27-28 апр. 2016 г. – СПб., 2016. – С. 35.

### **Заявки на выдачу патентов**

23. Способ прогнозирования выживаемости пациентов с послеоперационной химиотерапией колоректального рака : заявка a20160037BY : МПК G 01N 33/48, A 61B 5/00 / Т. Т. Штабинская, С. А. Ляликов, В. А. Басинский ; дата публ.: 31.03.2016.

24. Способ прогнозирования выживаемости пациентов с низкоккачественным раком дистального отдела толстой кишки : заявка а 20160263 ВУ : МПК G 01N 33/48, А 61В 5/00 / Т. Т. Штабинская, С. А. Ляликов, В. А. Басинский ; дата публ.: 20.10.2016.

#### **Удостоверения о рационализаторских предложениях**

25. Удостоверение № 1689 на рационализаторское предложение. Способ изготовления парафиновых блоков для иммуногистохимических исследований / Т. Т. Штабинская ; ГрГМУ. – 17.11.2014.



Репозиторий ГрГМУ

## РЭЗІЮМЭ

Штабінская Таццяна Тадэвушаўна

## Прагнастычнае значэнне экспрэсіі малекулярна-біялагічных маркераў ангіягенэзу ў адэнакарцыноме тоўстай кішкі

**Ключавыя словы:** адэнакарцынома тоўстай кішкі (АТК), ангіягенэз, прагноз, пасляоперацыйная хіміятэрапія, фактар росту эндатэлію сасудаў (VEGF-A), нейрапілін 1 (NRP1), матрыксныя металапратэазы 2 і 9 (MMP-2, MMP-9), трансфармуючы фактар росту бэта (TGF- $\beta$ ), эндаглін (CD105), экстрацэлюлярна-рэгуляваная кіназа 2 (Erk2), індцыбельная NO-сінтаза (iNOS).

**Мэта працы:** вызначыць прагнастычнае значэнне экспрэсіі імунагістахімічных маркераў ангіягенэза ў адэнакарцыноме тоўстай кішкі.

**Аб'ект і метады даследавання.** Архіўны аператыўны матэрыял рэзекцый тоўстай кішкі пацыентаў з АТК. Выкарыстоўваўся імунагістахімічны (ІГХ) метады афарбоўкі гісталагічных прэпаратаў антыцэламі да VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS з далейшай марфаметрычнай ацэнкай.

Прааналізавана сувязь паміж экспрэсіяй маркераў ангіягенэзу і клініка-марфалагічнымі характарыстыкамі АТК, вызначана іх значнасць для прагнозу захворвання.

**Вынікі.** Устаноўлен спектр экспрэсіі VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS у клетках нармальнай слізистой тоўстай кішкі, парэнхіматозным і стромальным кампанентах АТК рознай ступені дыферэнцыявання.

У высокагрэйдных АТК выяўлена гіперэкспрэсія TGF- $\beta$ , MMP-9, у нізкагрэйдных – VEGF-A, NRP1 і MMP-2. Распрацаваны ІГХ метады прагназавання выжывальнасці пацыентаў з нізкагрэйднай АТК.

Пры ўзрастанні клінічнай стадыі нарасталі ІГХ гетэрагеннасць наватвораў, аднак стабільна захоўвалася прамая карэляцыйная сувязь паміж стадыяй захворвання і ўзроўнем экспрэсіі CD105.

Прымяненне метадаў шматфактарнага аналізу з ацэнкай ўзроўню экспрэсіі VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 дазволіла з высокай адчувальнасцю і спецыфічнасцю прагназаваць тэрміны безрэцыдыўнай выжывальнасці пацыентаў, якім паказана хіміятэрапія, а таксама вылучыць групу рызыкі праявы хіміярэзістэнтнасці, якая патрабуе больш паглыбленага абследавання і карэкціроўкі схемы хіміятэрапіі.

**Галіна прымянення:** паталагічная анатомія, анкалогія.

## РЕЗЮМЕ

**Штабинская Татьяна Тадеушевна**

### **Прогностическое значение экспрессии молекулярно-биологических маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки**

**Ключевые слова:** аденокарцинома толстой кишки (АТК), ангиогенез, прогноз, послеоперационная химиотерапия, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), нейропинин 1 (NRP1), матриксные металлопротеазы 2 и 9 (MMP-2, MMP-9), трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ), эндоглин (CD105), экстрацеллюлярно-регулируемая киназа 2 (Erk2), индуцибельная NO-синтаза (iNOS).

**Цель исследования:** определить прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки.

**Объект и методы исследования.** Архивный операционный материал резецированной толстой кишки пациентов с АТК. Использован иммуногистохимический (ИГХ) метод окраски гистологических препаратов антителами к VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS с последующей морфометрической оценкой.

Выполнен анализ связи между экспрессией маркеров ангиогенеза и клиничко-морфологическими характеристиками АТК, определена их значимость для прогноза заболевания.

**Результаты.** Установлен спектр экспрессии VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS в клетках нормальной слизистой толстой кишки, паренхиматозном и стромальном компонентах АТК разной степени дифференцировки.

В высокоградных аденокарциномах выявлена гиперэкспрессия TGF- $\beta$ , MMP-9, в низкоградных – VEGF-A, NRP1 и MMP-2. Разработан ИГХ метод прогнозирования выживаемости пациентов с низкоградной АТК.

При возрастании клинической стадии нарастала ИГХ гетерогенность новообразований, однако стабильно сохранялась прямая корреляционная связь между стадией заболевания и уровнем экспрессии CD105.

Применение методов многофакторного анализа с оценкой уровня экспрессии VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 позволило с высокой чувствительностью и специфичностью прогнозировать сроки безрецидивной выживаемости пациентов, которым показана химиотерапия, а также выделить группу риска проявления химиорезистентности, требующую более углубленного обследования и корректировки схемы химиотерапии.

**Область применения:** патологическая анатомия, онкология.

## SUMMARY

**Shtabinskaya Tatyana Tadeushevna**

### **Prognostic Expression Significance of Molecular-Biological Markers of Angiogenesis in Colon Adenocarcinoma**

**Key words:** colon adenocarcinoma (CA), angiogenesis, prognosis, postoperative chemotherapy, vascular endothelial growth factor (VEGF-A), neuropiline 1 (NRP1), matrix metalloproteases 2 and 9 (MMP-2, MMP-9), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), endoglin (CD105), extracellularly-regulated kinase 2 (Erk2), inducible NO-synthase (iNOS).

**Aim:** to establish prognostic expression significance of immunohistochemical angiogenic markers in colon adenocarcinoma.

**Object and methods.** Archival operating material of colon resection with adenocarcinoma. An Immunohistochemical (IHC) stain of histological slides with antibodies to VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS, followed by a morphometric evaluation, was used.

We analysed the relationship between the expression of angiogenic markers and the clinical, morphological characteristics of CA, their significance for prognosis of the disease was determined.

**Results.** The range of changes in the expression of VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ , CD105, Erk2, iNOS in cells of colon normal mucosa, parenchymal and stromal components of low- and high-grade CA was established.

High-grade adenocarcinomas have been shown to overexpress TGF- $\beta$ , MMP-9, in low-grade – VEGF-A, NRP1 and MMP-2. IHC method for predicting the survival of patients with a low-grade CA has been designed.

The heterogeneity of the neoplasms has been increasing with the intensity in the clinical stage however the direct correlation between the stage of the disease and the level of CD105 expression was stably maintained.

The use of multivariate analysis methods with the estimation of the expression level of VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 allowed for predicting the disease-free survival periods of patients with postoperative chemotherapy with high sensitivity and specificity, as well as isolating a group of risk with manifestations of chemoresistance, requiring more in-depth examination and chemotherapy regimen correction.

**Field of application:** pathology, oncology.

Научное издание

**Штабинская** Татьяна Тадеушевна

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ  
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА  
В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия

Подписано в печать 23.05.2017.

Формат 60x84/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Таймс. Ризография.

Усл.-печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,23. Тираж 80 экз. Заказ 104.

Издатель и полиграфическое исполнение  
учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет».

ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно.