

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛОТНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТУМОРАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

Черданцева Т.М.¹, Бобров И.П.^{1,2}, Климачев В.В.^{1,2}, Климачев И.В.¹, Казарцев А.В.¹, Попов В.А.¹, Ситникова Ж.И.¹

¹ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», Барнаул, e-mail: drakon@agmu.ru;

²Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, e-mail: aoc@ab.ru

В работе исследовано прогностическое значение подсчета интратуморальных стромальных опухолеассоциированных макрофагов (ТАМ) при почечно-клеточном раке. Материалом для исследования послужил операционный материал 63 больных раком почки. Средний возраст пациентов составил $58,2 \pm 1,2$ лет. Мужчин было 34 (54 %), женщин – 29 (46 %). Выявлены корреляционные взаимосвязи плотности распределения ТК в опухоли с клинической стадией ($r = 0,69$; $p = 0,0001$), размером опухолевого узла ($r = 0,58$; $p = 0,0001$), наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,48$; $p = 0,0001$), гистологическим типом опухоли по Fuhrman ($r = 0,89$; $p = 0,001$) и послеоперационной выживаемостью больных ($r = 0,40$; $p = 0,001$). Не было обнаружено взаимосвязи числа ТАМ в опухоли с полом ($r = -0,03$; $p = 0,8$), возрастом ($r = -0,15$; $r = 0,25$) больных и гистологическим вариантом опухоли ($r = 0,16$; $p = 0,19$). Возрастание числа интратуморальных стромальных ТАМ в опухоли можно рассматривать в качестве критерия вероятного возникновения метастазов. Высокое содержание ТАМ в опухоли – неблагоприятный фактор в предсказании выживаемости больных.

Ключевые слова: рак почки, опухолевые клетки, прогноз.

PROGNOSTIC VALUE OF THE STUDY OF THE DENSITY DISTRIBUTION TUMORASSOCIATED OF MACROPHAGES IN KIDNEY CANCER

Cherdantseva T.M.¹, Bobrov I.P.^{1,2}, Klimachev V.V.^{1,2}, Klimachev I.V.¹, Kazartsev A.V.¹, Popov V.A.¹, Sitnikova Z.I.¹

¹Altai state Medical University, Barnaul, e-mail: drakon@agmu.ru;

²Altai branch Russian Cancer Research Center. N.N. Blokhin, e-mail: aoc@ab.ru

We investigated the prognostic value of the counting of tumor-associated macrophages (TAM) in renal cell carcinoma. Tissue samples were obtained from 56 patients with renal cell carcinoma. The average age of patients was $58,8 \pm 1,1$ years. There were 27 (48,2 %) men and 29 (51,6 %) women in our study. We found, that the density of distribution of TAM in tumor was strongly associated with clinical stage ($r = 0,28$; $p = 0,04$), tumor nodule size ($r = 0,29$; $p = 0,03$), the presence of regional and distant metastases ($r = 0,46$; $p = 0,0001$), tumor grade according to the criteria of Fuhrman ($r = 0,58$; $p = 0,0001$), and postoperative survival of patients ($r = -0,31$; $p = 0,02$). There was no correlation between amount of TAM and gender ($r = -0,10$; $p = 0,45$), age ($r = -0,15$; $r = 0,27$), and histological types of tumor ($r = -0,02$; $p = 0,87$). The increase amount of TAM in carcinoma can be considered as a predictor of the possible metastasis. The high amount of TAM in tumor has been shown to correlate with a poor prognosis of the patients with renal cell carcinoma.

Keywords: renalcellcarcinoma, macrophages, prognosis.

Интерес к изучению микроокружения клеток злокачественных новообразований и в том числе к опухолеассоциированным макрофагам (tumor-associated macrophages) (ТАМ) сохраняется на протяжении последних десятилетий [1,2,4,7,12,13,14]. По современным представлениям ТАМ играют ключевую роль в опухоленезе и прогрессии рака. Посредством секреции многочисленных медиаторов, таких как: факторы роста (bFGF, GM-CSF, TGF- α , IGF-I, PDGF, VEGF/VPF, TGF- β), цитокины и монокины (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , субстанция Р, простагландины, интерфероны, тромбоспондин 1), протеазы (MMP-2, MMP-

9) ТАМ способны вызывать пролиферацию опухолевых клеток, ремоделировать строму, индуцировать ангиогенез, стимулировать инвазию и метастазирование опухоли [9].

В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных прогностическому значению ТАМ при ПКР. Высокое содержание ТАМ в опухоли, по данным некоторых авторов, при раке почки коррелирует с возникновением метастазов [5,8]. По данным TogeH. и соавт. [11] высокое число ТАМ в карциномах было взаимосвязано с развитием рецидивов. В то же время Hutterer G.C. и соавт. [6] показали, что присутствие ТАМ в опухоли было статистически значимо ассоциировано с благоприятными прогностическими параметрами, включая низкую клиническую стадию, малый размер опухолевого узла, негативные лимфатические узлы и низкую градацию опухоли по Fuhrman. При этом 5-летняя послеоперационная выживаемость пациентов с высокими значениями ТАМ в опухоли составляла 93,5 %, по сравнению с 72,5 % в группе больных с отсутствием ТАМ в опухоли.

Таким образом, работы, посвященные изучению прогностическому значению исследования ТАМ при ПКР, немногочисленны и противоречивы, и поэтому данный элемент микроокружения опухоли нуждается в дальнейшем изучении.

Целью работы стало исследование значения ТАМ при ПКР, поиск взаимосвязей с важными клинико-анатомическими факторами прогноза и послеоперационной выживаемостью больных.

Материал и методы исследования

Изучен операционный материал 56 больных ПКР. Средний возраст пациентов составил $58,8 \pm 1,1$ лет. Мужчин было 27 (48,2 %), женщин – 29 (51,6 %). Во всех наблюдениях ПКР был классифицирован в соответствии с классификацией ВОЗ 2004 г. По гистологическому строению опухоли были представлены следующим образом: светлоклеточный рак – 42; папиллярный рак – 3; хромофобный рак – 9; веретенноклеточный (саркоматоидный) рак – 2.

Степень распространенности опухолевого процесса оценивалась в соответствии с TNM классификацией злокачественных опухолей (TNM Classification of Malignant Tumors, edited by Sobin L.H., 2002) [10]. Среди больных I клинической стадии (T1N0M0) соответствовали 35 (62,5 %) наблюдений; II стадии (T2N0M0) - 10 (17,9 %) наблюдений; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) - 9 (16,1 %) и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, ЛюбаяN2M1, ЛюбаяNлюбаяM1) – 2 (3,5 %). Степень злокачественности опухолевых клеток оценивали по Fuhrman S.A. и соавт. [3]. Степени анаплазии G1 соответствовали 16 опухолей (28,6 %), степени анаплазии G2 – 20 (35,7 %) опухолей, степени анаплазии G3 - 14 (25 %) и степени анаплазии G4 – 6 (10,7 %).

Карцином с регионарными и отдаленными метастазами было 8 (14,3 %), локализованных опухолей было – 48 (85,7 %).

Средний размер опухолевого узла составил - $6,8 \pm 0,3$ см.

Контролем служила ткань почек, забранная из максимально удаленных от опухоли участков, без выраженных явлений воспаления и склероза.

Материал фиксировали в 10 % раствором нейтрального забуференного формалина в течение 12–24 часов. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и на кислые мукополисахариды коллоидным железом по Гале. ТАМ выявляли иммуногистохимическим методом с помощью моноклональных мышиных антител CD68 (клон PG-M1, DAKO) по рекомендованному производителем протоколу. Высчитывали среднее количество ТАМ в 3 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$.

Сведения о выживаемости больных получали по данным регистра злокачественных заболеваний и амбулаторных карт (за 2010–2016 гг.).

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0. При нормальном распределении данных при проверке статистических гипотез применяли методы параметрической статистики (t-test Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро – Уилка $W = 0,89$, $p < 0,01$), то применяли тест Колмогорова – Смирнова или U-тест Манна – Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$. Построение кривых выживаемости проводили по методу Kaplan-Meier, достоверность различий показателей выживаемости оценивали с помощью log-rank теста.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что в неизменной ткани почки макрофаги имели круглую, овальную или отросчатую форму и располагались в интерстициальной ткани, возле сосудов, между канальцами и в почечных клубочках. В среднем число макрофагов в интерстициальной ткани почки составило $1,6 \pm 0,3$ в 3 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$. В клубочках макрофаги имели отросчатую или вытянутую форму. В среднем содержание макрофагов в клубочках составило $5,3 \pm 1,2$.

Среди всех больных ПКР вне зависимости от пола, возраста, гистологического типа и других клинко-морфологических прогностических показателей разброс средних значений плотности распределения ТАМ колебался от 1 до 137. Среднее значение плотности распределения ТАМ при ПКР составило $14,8 \pm 1,2$.

Сопоставление среднего числа ТАМ в строме опухоли с прогностически важными клинко-анатомическими факторами ПКР позволило выявить некоторые корреляционные взаимосвязи. Плотность распределения ТАМ была взаимосвязана: с клинической стадией

заболевания ($r = 0,28$; $p = 0,04$), с размером опухолевого узла ($r = 0,29$; $p = 0,03$), с наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,46$; $p = 0,0001$), со степенью анаплазии опухоли по Fuhrman ($r = 0,58$; $p = 0,0001$) и с послеоперационной выживаемостью больных ($r = - 0,31$; $p = 0,02$). Не было обнаружено взаимосвязей с полом ($r = - 0,10$; $p = 0,45$), возрастом ($r = - 0,15$; $r = 0,27$) больных и гистологическим вариантом опухоли ($r = - 0,02$; $p = 0,87$) (табл. 1).

Таблица 1

Корреляционные взаимосвязи плотности распределения ТАМ с клинико-морфологическими параметрами ПКР

Клинико-морфологический параметр	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность (p)
Клиническая стадия	0,28	0,04
Размер опухолевого узла	0,29	0,03
Наличие регионарных и дистантных метастазов	0,46	0,0001
Степень анаплазии опухоли по Fuhrman	0,58	0,0001
Послеоперационная выживаемость больных	- 0,31	0,02
Пол пациентов	- 0,10	-
Возраст пациентов	- 0,15	-
Гистологический вариант опухоли	- 0,02	-

Среднее значение ТАМ в опухолях у мужчин составило $15,9 \pm 1,3$, у женщин – $13,5 \pm 2,1$ ($p = 0,3$).

В зависимости от возраста пациентов средние показатели числа ТАМ составили: у больных в возрасте от 30 до 39 лет – $8,3 \pm 1,45$; от 40 до 49 лет – $15,5 \pm 2,5$; от 50 до 59 лет – $16,4 \pm 2,7$; от 60 до 69 лет – $16,0 \pm 1,65$ и от 70 до 79 лет – $4,7 \pm 0,4$. Таким образом, самые высокие показатели ТАМ в строге опухоли наблюдали в возрастной группе больных от 50 до 59 лет, а самые низкие в группе от 70 до 79 лет.

При анализе содержания ТАМ в зависимости от клинической стадии заболевания по TNM получены следующие результаты: у пациентов с I стадией среднее число ТАМ составило $12,3 \pm 1,6$; при II стадии число ТАМ возросло до $14,1 \pm 1,9$ ($p = 0,3$); при III стадии количество ТАМ увеличивалось до $23,4 \pm 3,2$ ($p = 0,002$) и в IV стадии оно равнялось $21,5 \pm 2,7$ ($p = 0,18$). Таким образом, при III и IV клинических стадиях отмечали увеличение ТАМ по сравнению с I и II стадиями.

В зависимости от гистологического варианта ПКР наибольшее количество ТАМ было обнаружено в веретенноклеточной карциноме ($45,8 \pm 18,7$), а наименьшее значение имел хромофобный рак – $9,2 \pm 2,1$. Промежуточное положение занимали светлоклеточный ($14,6 \pm 1,2$) и папиллярный ($13,0 \pm 1,6$) раки. Таким образом, наибольшее число ТАМ выявляли в веретенноклеточном варианте рака, а наименьшее в хромофобном.

При сопоставлении степени ядерной атипии по Fuhrmanс числом ТАМ были получены следующие результаты: при GI число ТАМ составило $7,8 \pm 0,7$, при GII – $7,7 \pm 0,9$ ($p = 0,9$), при GIII оно возрастало до $26,2 \pm 3,2$ ($p = 0,0000001$) и при GIV равнялось $26,9 \pm 3,7$ ($p = 0,9$). Таким образом, обнаружена тенденция к возрастанию числа ТАМ при увеличении степени анаплазии клеток опухоли.

При размере опухолевого узла $< 7,0$ см число ТАМ в опухоли равнялось $12,5 \pm 1,5$, а при размере $\geq 7,0$ см оно достоверно увеличивалось до $19,1 \pm 1,9$ ($p = 0,01$).

В локализованных опухолях содержание ТАМ составило $11,6 \pm 0,9$, а при возникновении метастазов оно достоверно возрастало до $31,4 \pm 4,8$ ($p = 0,0000001$) (табл. 2) (рис.1; а,б).

Таблица 2

Содержание ТАМ в опухоли в зависимости от клинко-морфологических параметров ПКР

Клинко-морфологический параметр	Количество ТАМ	Достоверность (p)
Пол: мужчины	$15,9 \pm 1,3$	-
женщины	$13,5 \pm 2,1$	
Возраст: 30 – 39 лет	$8,3 \pm 1,45$	$p = 0,005$
40 – 49 лет	$15,5 \pm 2,5$	
50 – 59 лет	$16,4 \pm 2,7$	
60 – 69 лет	$16,0 \pm 1,65$	
70 – 79 лет	$4,7 \pm 0,41$	
Стадия TNM: I стадия	$12,3 \pm 1,61$	$p = 0,002$
II стадия	$14,1 \pm 1,9$	
III стадия	$23,4 \pm 3,2$	
IV стадия	$21,5 \pm 2,7$	
Гистологический вариант опухоли:		$P = 0,000005$
хромофобный	$9,2 \pm 2,11$	
папиллярный	$13,0 \pm 1,6$	
светлоклеточный	$14,6 \pm 1,2$	
веретенноклеточный	$45,8 \pm 18,7$	
Градация по Fuhrman: GI	$7,8 \pm 0,7$	$p = 0,0000001$
GI	$7,7 \pm 0,9$	
GIII	$26,2 \pm 3,2$	
GIV	$26,9 \pm 3,7$	
Размер опухолевого узла: $< 7,0$ см	$12,5 \pm 1,5$	$p = 0,01$
$\geq 7,0$ см	$19,1 \pm 1,9$	
Метастазы: отсутствуют	$11,6 \pm 0,9$	$p = 0,0000001$
имеются	$31,4 \pm 4,8$	

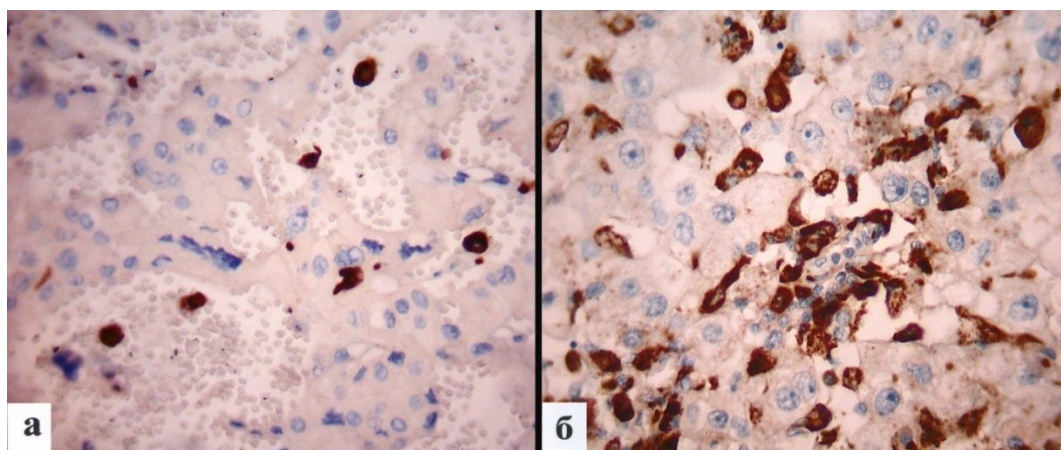


Рис. 1. Содержание ТАМ в строме опухоли в зависимости от наличия метастазов: а – локализованная опухоль; б – метастатическая опухоль. Иммуногистохимическое окрашивание на CD68, увеличение $\times 400$

Для оценки отдаленных результатов 5-летней послеоперационной выживаемости больных в зависимости от среднего числа ТАМ в опухоли, новообразования нами были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили карциномы с малым числом ТАМ (<13), 2-ю группу составили карциномы с большим числом ТАМ (≥ 13). При анализе по Каплан – Мейеру было обнаружено, что когда число ТАМ в опухоли составляло <13 , то кумулятивная доля выживших к 1800 дню составила 0,96 (96 %), а когда количество ТАМ в опухоли составляло ≥ 13 , то кумулятивная доля выживших к 1800 дню снижалась до 0,63 (63 %). При сравнении выживаемости групп больных с использованием логарифмического рангового критерия было получено, что различия данных достоверны ($\log\text{-rankp} = 0,001$) (рис. 2).

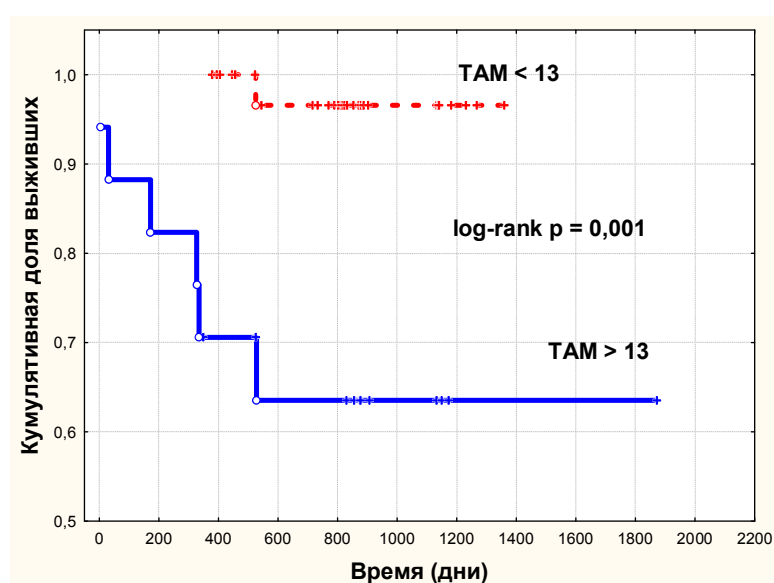


Рис. 2. Кумулятивная пропорция 5-летней выживаемости больных ПКР в зависимости от числа ТАМ в опухоли

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что число ТАМ в опухоли было взаимосвязано с рядом прогностически важных клинико-анатомических факторов ПКР и поэтому данный параметр может быть использован в качестве дополнительного фактора прогноза. Увеличение количества ТАМ в опухоли можно рассматривать как критерий вероятного возникновения метастазов. Выявлена взаимосвязь между числом ТАМ и выживаемостью больных. Высокий уровень содержания ТАМ является неблагоприятным фактором 5-летней послеоперационной выживаемости больных при ПКР.

Список литературы

1. al-Sarireh B., Eremin O. Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth // J. R. Coll. Surg. Edinb. – 2000. – Vol. 45, № 1. – P. 1–16.
2. Cook J., Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer // Curr Opin Pharmacol. – 2013. – Vol. 13, № 4. – P. 595–601.
3. Fuhrman S.A., Lasky L.C., Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. Am. J. Surg. Pathol. 1982; 6: 655–663.
4. Fukuda K., Kobayashi A., Watabe K. The role of tumor-associated macrophage in tumor progression // Front. Biosci. (Schol Ed). – 2012. – Vol. 4. – P. 787–98.
5. Hamada I., Kato M., Yamasaki T., Iwabuchi K., Watanabe T., Yamada T., Itoyama S., Ito H., Okada K. Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma // Anticancer Res. – 2002. – Vol. 22, № 6. – P. 4281–4284.
6. Hutterer G.C., Pichler M., Chromecki T.F., Strini K.A., Klatte T., Pummer K., Remzi M., Mannweiler S., Zigeuner R. Tumour-associated macrophages might represent a favourable prognostic indicator in patients with papillary renal cell carcinoma // Histopathology. – 2013. – Vol. 63, № 3. – P. 309–315.
7. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, № 2. – P. 605–612.
8. Santoni M., Massari F., Amantini C., Nabissi M., Maines F., Burattini L., Berardi R., Santoni G., Montironi R., Tortora G., Cascinu S. Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma // Cancer Immunol Immunother. – 2013. – Vol. 62, № 12. – P. 1757–1768.
9. Siveen K.S., Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression // Immunol Lett. – 2009. – Vol. 123, № 2. – P. 97–102.

10. Sobin L.H., Wittekind Ch. UICC – TNM Classification of malignant tumors. New York: Wiley-Liss, 2002; 193–195.
11. Toge H., Inagaki T., Kojimoto Y., Shinka T., Hara I. Angiogenesis in renal cell carcinoma: the role of tumor-associated macrophages // *Int. J. Urol.* – 2009. – Vol. 16, № 10. – P. 801–807.
12. Whitworth PW, Pak CC, Esgro J, Kleinerman ES, Fidler IJ. Macrophages and cancer // *Cancer Metastasis Rev.* – 1990. – Vol. 8, № 4. – P. 319–351.
13. Yuan A., Chen J.J., Yang P.C. Pathophysiology of tumor-associated macrophages // *Adv. Clin. Chem.* – 2008. – Vol. 45. – P. 199–223.
14. Zhang J., Yao H., Song G., Liao X., Xian Y., Li W. Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor-associated macrophages in cancer // *Am. J. Transl. Res.* – 2015. – Vol. 7, № 10. – P. 1699–1711.