

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

Бобров И.П.^{1,2}, Черданцева Т.М.¹, Крючкова Н.Г.¹, Лепилов А.В.¹, Лазарев А.Ф.^{1,2}, Авдалян А.М.², Климачев В.В.^{1,2}, Климачев И.В.¹, Мяделец М.Н.¹, Казарцев А.В.¹, Малинина Е.И.³

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

²Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Барнаул;

³КГБУЗ «Алтайское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», Барнаул

В работе исследовано прогностическое значение подсчета интратуморальных стромальных тучных клеток (ТК) при почечно-клеточном раке. Материалом для исследования послужил операционный материал 63 больных раком почки. Выявлены корреляционные взаимосвязи плотности распределения ТК в опухоли с клинической стадией ($r = 0,69$; $p = 0,0001$), размером опухолевого узла ($r = 0,58$; $p = 0,0001$), градацией опухоли по Fuhrman ($r = 0,89$; $p = 0,001$), наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,48$; $p = 0,0001$) и послеоперационной выживаемостью больных ($r = 0,40$; $p = 0,001$). Не было обнаружено взаимосвязи числа ТК 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 ТК в опухоли можно рассматривать в качестве критерия вероятного возникновения метастазов. Высокое содержание ТК в опухоли – неблагоприятный фактор послеоперационной выживаемости больных.

Ключевые слова: рак почки, тучные клетки, прогноз.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE RESEARCH OF MAST CELLS IN RENAL CELL CARCINOMA

Bobrov I.P.^{1,2}, Cherdantseva T.M.¹, Kryachkova N.G.¹, Lepilov A.V.¹, Lazarev A.F.^{1,2}, Avdalyan A.M.², Klimachev V.V.^{1,2}, Klimachev I.V.¹, Myadelets M.N.¹, Kazartsev A.V.¹, Malinina E.I.³

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

²Altai branch Russian Cancer Research center N.N. Blokhin, Barnaul;

³Altai regional Bureau of a forensic medical examination, Barnaul

In this study was investigated predictive value of intratumoral stromal mast cells calculation in renal cell cancer. Material for research was taken from postoperative tissues of 63 patients with kidney cancer. We had identified correlational relationship of mast cells distribution density in tumor with clinical stage ($r = 0,69$; $p = 0,0001$), node size ($r = 0,58$; $p = 0,0001$), gradation on Fuhrman ($r = 0,89$; $p = 0,001$), the presense of regional and distant metastasis ($r = 0,48$; $p = 0,0001$) and postoperative survival ($r = 0,40$; $p = 0,001$). There was no found of correlational relationship of mast cell amount with sex ($r = -0,03$; $p = 0,8$), age ($r = -0,15$; $r = 0,25$) and hystological type of tumor ($r = 0,16$; $p = 0,19$). Enchancing of intratumoral stromal mast cells amount can be interpreted like a criterion of possible metastasis. High content level of mast cells in tumor is an adverse factor of postoperative patient survival.

Keywords: mast cells, renal cell carcinoma, prognosis.

В клинической практике хорошо известны случаи различного течения опухолевого процесса и его исхода у больных РП (раком почки), которые имели идентичные морфологические формы и стадию заболевания. Причины этого нередко наблюдаемого в клинической практике явления остаются неясными. Понимание механизмов, задействованных в процессах прогрессирования ПКР - один из возможных путей совершенствования методов прогноза и его рационального лечения.

Среди разнообразных направлений исследований в фундаментальной онкологии последние два десятилетия большое внимание уделяют изучению микроокружения (МкО) опухоли и вопросу о его морфологических составляющих. К таковым относят экстрацеллюлярный матрикс и клетки соединительной ткани (стромы органа), клетки системы иммунитета, кровеносные и лимфатические сосуды. Основными клетками, определяющими особенности МкО, являются фибробласты, миофибробласты, перициты, муральные клетки (формируют внутренний слой сосудов), многочисленные клетки системы иммунитета, в первую очередь нейтрофилы, макрофаги, тучные клетки (ТК) и др., а в некоторых случаях адипоциты [3; 7].

Интерес к изучению микроокружения клеток злокачественных новообразований, и в том числе к стромальным интратуморальным тучным клеткам (ТК), сохраняется на протяжении последних десятилетий [2; 4; 6; 10; 11]. Известно, что подобно другим клеткам системы иммунитета, их роль в опухолевом процессе может быть двойной - усиление или торможение роста опухоли [1].

ТК присутствуют в нормальной и патологически измененной почке [6; 13]. Имеется небольшое количество работ, посвященных исследованию прогностического значения ТК при почечно-клеточном раке (ПКР). По данным Tune В. и соавт. [15], содержание интратуморальных ТК было значительно выше при раке почки (РП), чем в нормальной почечной ткани, что, по заключению данных авторов, объясняется их участием в туморогенезе. Но в то же время авторами не было найдено взаимосвязей между числом ТК в опухоли ПКР и клинической стадией, размером опухолевого узла, градацией по Fuhrman, кроме гистологического типа. Авторы отмечают, что количество ТК значительно возрастало в светлоклеточных карциномах. Более высокое число интратуморальных ТК в светлоклеточных карциномах авторы объясняют значительной метаболической потребностью клеток данного гистологического варианта РП. Аналогичные данные получили и другие авторы [12]. В то же время Guldur М.Е. и соавт. [9] нашли значимые взаимосвязи между числом ТК в опухоли и стадией, градацией по Fuhrman, размером и гистологическим типом опухоли. Этими авторами также было показано, что число ТК значительно возрастало в светлоклеточном варианте рака, по сравнению с другими гистологическими типами ПКР.

Таким образом, данные исследователей о роли ТК, при злокачественных новообразованиях довольно противоречивы, а исследований, посвященных изучению ТК при ПКР, незначительное количество, и поэтому ТК опухоли при ПКР нуждаются в дальнейшем изучении.

Цель исследования – изучить частоту встречаемости интратуморальных ТК при почечно-клеточном раке и поиск взаимосвязей с важными клинико-анатомическими факторами прогноза и послеоперационной выживаемостью больных

Материал и методы исследования

Изучен операционный материал 63 больных ПКР. Сведения о выживаемости больных получали по данным канцер-регистра злокачественных заболеваний и амбулаторных карт КГБУЗ АКОД «Алтайский краевой онкологический диспансер» (за 2010-2016 гг.).

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

После фиксации в 10%-ном нейтральном забуференном формалине на протяжении 12-24 часов и заливки в парафин срезы окрашивали гематоксилин-эозином и изучали под световым микроскопом. ТК выявляли иммуногистохимическим методом с помощью моноклональных антител С-kit (CD117) (клон А4052, разведение 1:200, ДАКО) по рекомендованному производителем протоколу. В каждом случае высчитывали среднее количество ТК в 3 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$.

Средний возраст пациентов составил $58,2 \pm 1,2$ года. Мужчин было 34 (54%), женщин - 29 (46%). По гистологическому строению опухоли были представлены следующим образом: светлоклеточный рак - 48; зернистоклеточный рак - 4; папиллярный рак – 5; хромофобный рак – 3 и веретенклеточный (саркоматоидный) рак – 3.

Степень распространенности опухолевого процесса оценивалась в соответствии с TNM-классификацией злокачественных опухолей (TNM Classification of Malignant Tumors, edited by Sobin L.H., 2002) [14]. Среди наших больных I клинической стадии (T1N0M0) соответствовали 47 (74,6%) наблюдений; II стадии (T2N0M0) - 3 (4,8%); III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) - 8 (12,7%) и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, ЛюбаяN2M1, ЛюбаяNлюбаяM1) - 5 (7,9%).

Степень злокачественности опухолевых клеток оценивали по Fuhrman S.A. и соавт., (1982) [5; 8]. Степени анаплазии G1 соответствовала 31 опухоль (49,2%), степени анаплазии G2 – 14 (22,2%) опухолей, степени анаплазии G3 - 13 (20,6%) и степени анаплазии G4 – 5 (8%).

Карцином с регионарными и отдаленными метастазами было 11 (17,5%), локализованных опухолей – 52 (82,5%).

Средний размер опухолевого узла составил - $7,1 \pm 0,3$ см.

Статистическая обработка материала проводилась при помощи статистического пакета Statistica 6.0, с использованием методов непараметрической статистики: U-критерий Манна-Уитни, коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r), при сравнении нескольких

независимых групп - критерий Краскела-Уоллиса. Построение кривых выживаемости проводили по методу Kaplan-Meier, достоверность различий показателей выживаемости оценивали с помощью log-rank теста. Данные считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что в неизменной ткани почки ТК располагались поодиночке или группами. Они имели круглую, овальную или отросчатую форму и располагались преимущественно в интерстициальной ткани, около сосудов и между канальцами. В среднем число ТК в ткани почки составило $2,3 \pm 0,2$ в 3 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$. Во фрагментах, взятых из центральных отделов опухоли, ТК имели округлую, овальную, реже отросчатую форму. Среди всех больных ПКР вне зависимости от пола, возраста, гистологического типа и других клинико-морфологических показателей разброс средних значений плотности распределения ТК колебался от 0 до 10. Среднее значение плотности распределения ТК при ПКР составило $2,5 \pm 0,2$.

Сопоставление среднего числа интратуморальных ТК в строме опухоли с прогностически важными клинико-анатомическими факторами ПКР позволило выявить некоторые важные корреляционные взаимосвязи. Плотность распределения ТК была взаимосвязана: с клинической стадией заболевания ($r = 0,69$; $p = 0,0001$), с размером опухолевого узла ($r = 0,58$; $p = 0,0001$), со степенью анаплазии опухоли по Fuhrman ($r = 0,89$; $p = 0,001$), с наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,48$; $p = 0,0001$) и с послеоперационной выживаемостью больных ($r = 0,40$; $p = 0,001$). Не было обнаружено взаимосвязей с полом ($r = - 0,03$; $p = 0,8$), возрастом ($r = - 0,15$; $r = 0,25$) больных и гистологическим вариантом опухоли ($r = 0,16$; $p = 0,19$) (табл. 1).

Таблица 1

Корреляционные взаимосвязи плотности распределения ТК с клинико-морфологическими параметрами ПКР

Клинико-морфологический параметр	Коэффициент корреляции (r)	Значение (p)
Клиническая стадия	0,69	0,0001
Размер опухолевого узла	0,58	0,0001
Степень анаплазии опухоли по Fuhrman	0,89	0,001
Наличие регионарных и дистантных метастазов	0,48	0,0001
Послеоперационная выживаемость больных	0,40	0,001
Пол пациентов	0,03	-
Возраст пациентов	- 0,15	-
Гистологический вариант опухоли	0,16	-

Среднее значение интратуморальных ТК в опухолях у мужчин составило $2,6 \pm 0,2$, у женщин - $2,4 \pm 0,2$ ($p = 0,6$).

В зависимости от возраста пациентов средние показатели числа ТК составили у больных в возрасте от 30 до 39 лет – $1,0 \pm 0,4$; от 40 до 49 лет - $3,7 \pm 0,4$; от 50 до 59 лет - $2,5 \pm 0,3$; от 60 до 69 лет - $2,4 \pm 0,3$ и от 70 до 79 лет - $1,8 \pm 0,25$. Таким образом, наиболее высокие показатели интратуморальных ТК в строме опухоли наблюдали в возрастной группе больных от 40 до 49 лет, а наиболее низкие в группе от 30 до 39 лет.

При анализе содержания ТК в опухоли в зависимости от клинической стадии заболевания по TNM получены следующие результаты: у пациентов с I клинической стадией среднее число ТК составило $1,85 \pm 0,15$; со II стадией число ТК возрастало до $2,7 \pm 0,4$ ($p = 0,2$); при III стадии количество ТК увеличивалось до $4,3 \pm 0,4$ ($p = 0,003$), и при IV стадии оно равнялось $6,3 \pm 0,6$ ($p = 0,005$). Таким образом, в III и IV стадиях отмечали достоверное увеличение ТК по сравнению с I стадией, а в IV стадии число ТК значимо возрастало по сравнению с III стадией патологического процесса.

В зависимости от гистологического варианта ПКР наибольшее среднее количество интратуморальных ТК обнаружено в веретеноклеточной карциноме ($6,3 \pm 0,6$), а наименьшее значение имел папиллярный рак $1,05 \pm 0,4$. Промежуточное положение занимали светлоклеточный ($2,2 \pm 0,2$) и хромофобный ($2,4 \pm 0,4$) раки и зернистоклеточный вариант светлоклеточного рака ($6,1 \pm 0,8$). Таким образом, наибольшее число ТК выявляли в веретеноклеточном варианте ПКР, а наименьшее значение в папиллярном.

При сопоставлении степени ядерной атипии по Fuhrman с числом интратуморальных ТК получены следующие данные: при GI число ТК составило $1,1 \pm 0,1$, при GII оно возрастало до $2,0 \pm 0,2$ ($p = 0,000006$), при GIII оно составило - $4,8 \pm 0,3$ ($p = 0,0000001$) и при GIV - $6,3 \pm 0,5$ ($p = 0,007$). Таким образом, обнаружено достоверное возрастание числа интратуморальных стромальных ТК при увеличении степени анаплазии клеток опухоли.

При размере опухолевого узла $< 7,0$ см число стромальных ТК равнялось $1,9 \pm 0,15$, а при размере $\geq 7,0$ см количество ТК в опухоли достоверно увеличивалось до $4,7 \pm 0,4$ ($p = 0,0000001$).

В опухолях больных без регионарных и отдаленных метастазов содержание ТК составило $2,0 \pm 1,2$, а при наличии метастазов оно достоверно возрастало до $4,7 \pm 0,4$ ($p = 0,0000001$) (табл. 2, рис. 1 а, б).

Таблица 2

Содержание интратуморальных стромальных ТК в опухоли в зависимости от
клинико-морфологических параметров ПКР

Клинико-морфологический параметр	Количество ТК	Значение (p)
Пол: мужчины	2,6±0,2	-
женщины	2,4±0,2	
Возраст: 30 – 39 лет	1,0±0,4	p = 0,005
40 – 49 лет	3,7±0,4	
50 – 59 лет	2,5±0,3	
60 – 69 лет	2,4±0,3	
70 – 79 лет	1,8±0,25	
Стадия TNM: I стадия	1,85±0,15	-
II стадия	2,7±0,4	
III стадия	4,3±0,4	
IV стадия	6,3± 0,6	
Гистологический вариант опухоли:		p = 0,01
папиллярный	1,05±0,4	
светлоклеточный	2,2±0,2	
хромофобный	2,4±0,4	
зернистоклеточный	6,1±0,8	
веретенноклеточный	6,3±0,6	-
Градация по Fuhrman: GI	1,1±0,1	p = 0,000006
GII	2,0±0,2	
GIII	4,8±0,3	
GIV	6,3±0,5	
		p = 0,007
Размер опухолевого узла: < 7,0 см	1,9±0,15	p = 0,0000001
≥ 7,0 см	4,7±0,4	
Метастазы: N0	2,0±1,2	p = 0,0000001
N+	4,7±0,4	

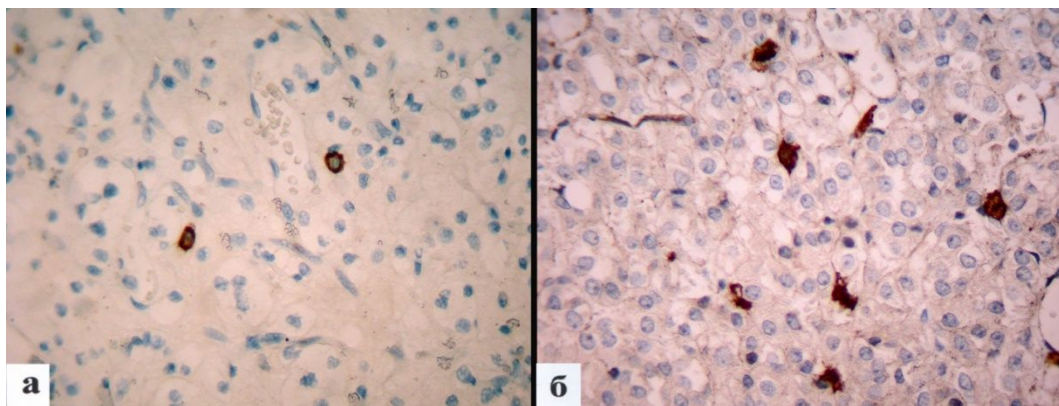


Рис. 1. Плотность распределения интратуморальных тучных клеток в строме рака почки в зависимости от наличия метастазов: а – локализованная опухоль; б – опухоль с метастазами. Иммуногистохимическое окрашивание на CD117. Увеличение x 400

Для оценки отдаленных результатов 5-летней послеоперационной выживаемости больных, в зависимости от плотности распределения интратуморальных ТК в опухоли, наблюдения были разделены на 2 группы. Первую группу составили карциномы с малым числом ТК (< 3), вторую группу составили карциномы с большим числом ТК (≥ 3). При анализе выживаемости больных по Каплан-Мейеру было обнаружено, что когда число ТК в

опухоли было < 3 , то кумулятивная доля выживших к 1800 дню составила 1 (100%), а когда количество ТК в опухоли было ≥ 3 , то кумулятивная доля выживших к 1800 дню снижалась до 0,62 (62%). При сравнении показателей выживаемости в группах больных с использованием логарифмического рангового критерия было получено, что различия данных были достоверными ($\log\text{-rank} p = 0,00015$) (рис. 2).

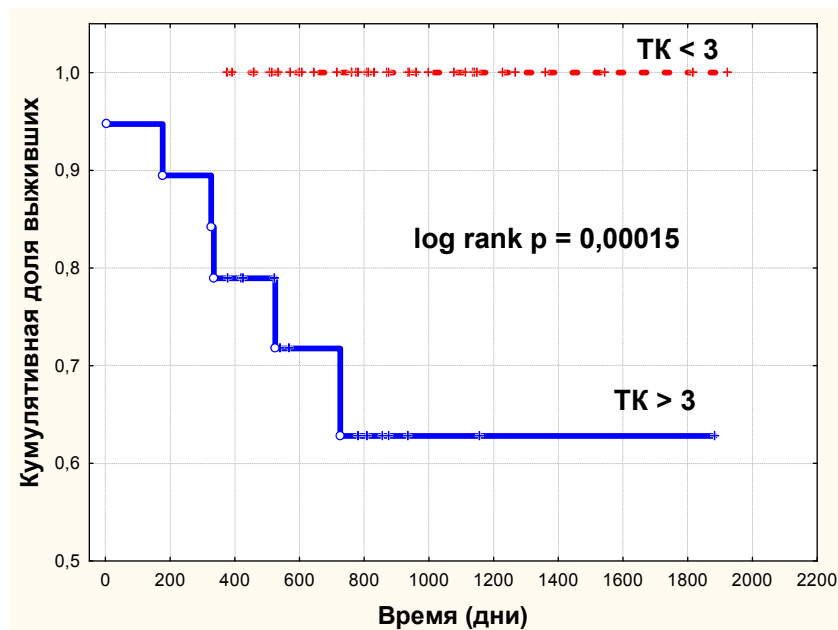


Рис. 2. Кумулятивная пропорция 5-летней послеоперационной выживаемости больных ПКР в зависимости от числа интратуморальных ТК в опухоли

Заключение. Результаты проведенного исследования показали, что выявлены корреляционные взаимосвязи плотности распределения ТК в опухоли с клинической стадией ($r = 0,69$; $p = 0,0001$), размером опухолевого узла ($r = 0,58$; $p = 0,0001$), градацией опухоли по Fuhrman ($r = 0,89$; $p = 0,001$), наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,48$; $p = 0,0001$) и послеоперационной выживаемостью больных ($r = 0,40$; $p = 0,001$).

Так, наибольшее число интратуморальных тучных клеток отмечается: при III и IV стадии заболевания, степени анаплазии GIII и IV, размере опухолевого узла ≥ 7 см и в опухолях с наличием отдаленных метастазов, поэтому данный морфологический феномен может быть использован в качестве дополнительного неблагоприятного фактора прогноза течения данного заболевания. Высокий уровень содержания ТК в опухоли является неблагоприятным фактором 5-летней послеоперационной выживаемости больных при ПКР.

Таким образом, проведенное исследование указывает на важное значение интратуморальных стромальных ТК рака почки для прогрессии опухолевого процесса, а увеличение количества ТК ≥ 3 в опухолевой ткани можно рассматривать как критерий вероятного возникновения метастазов.

Список литературы

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины — участники воспаления // Онкология. - 2009. - Т. 11, № 1. - С. 6-17.
2. Лазарев А.Ф. Тучные клетки и опухолевый рост / А.Ф. Лазарев, И.П. Бобров, Т.М. Черданцева и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 59-63.
3. Николаев А.А. Особенности стромообразования и паренхиматозно-стромальные взаимоотношения в эпителиальных опухолях легкого, желудка и молочной железы: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – М., 1975. - 31 с.
4. Черданцева Т.М. Тучные клетки при раке почки: клинико-морфологические параллели / Т.М. Черданцева, И.П. Бобров, В.В. Климачев и др. // Медицина в Кузбассе. – 2011. – № 2. – С. 48-51.
5. Черданцева Т.М. Прогностическое значение микроспектрофотометрического исследования ДНК при почечно-клеточном раке / Т.М. Черданцева, И.П. Бобров, В.В. Климачев и др. // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 4 [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=6543> (дата обращения: 28.06.2017).
6. Ehara T. Mast cell in kidney / T. Ehara, H. Shigematsu // Nephrology. – 2003. – № 8. – P. 130-138.
7. Fidler I.J., Kim S.J., Langley R.R. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis // Journal of cellular biochemistry. – 2007. – Т. 101. – №. 4. – С. 927-936.
8. Fuhrman S.A. Prognostic significance of morfologic parameters in renal cell carcinoma / S.A. Fuhrman, L.C. Lasky, C. Limas // Am. J. Surg. Pathol. – 1982. – № 6. – P. 655-663.
9. Guldur M.E. The relationship of mast cells and angiogenesis with prognosis in renal cell carcinoma / M.E. Guldur, S. Kocarslan, H.I. Ozardali et al. // J. Pak. Med. Assoc. – 2014. – № 3. – P. 300-303.
10. Liu J. Mast cell: insight into remodeling a tumor microenvironment / J. Liu, Y. Zhang, J. Zhao et al. // Cancer Metastasis Rev. – 2011. – № 2. – P. 177-184.
11. Maltby S. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immunomodulation. Biochim / S. Maltby, K. Khazaie, K.M. McNagny // Biophys. Acta. – 2009. – № 1. – P. 19-26.
12. Mohseni M.G. The lack of correlation between mast cells and microvessel density with pathologic feature of renal cell carcinoma / M.G. Mohseni, A. Mohammadi, A.S. Heshmat et al. // Int. Urol. Nephrol. – 2010. – № 1. – P. 109-112.

13. Roberts I.S. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis / I.S. Roberts, P.E. Brenchley // J. Clin. Pathol. – 2000. – № 11. – P. 858-862.
14. Sobin L.H. UICC – TNM Classification of malignant tumors / L.H. Sobin, Ch. Wittekind. – N.Y.: Wiley-Liss, 2002. – P. 193-195.
15. Tuna B. Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinomas / B. Tuna, K. Yorukoglu, M. Unlu et al. // Eur. Urol. – 2006. - № 3. – P. 530-534.