

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ В-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИТУМОРОЗНОЙ ЗОНЕ РАКА ПОЧКИ

Бобров И.П.<sup>1</sup>, Черданцева Т.М.<sup>2</sup>, Долгатова Е.С.<sup>1</sup>, Долгатов А.Ю.<sup>1</sup>, Лепилов А.В.<sup>1</sup>,  
Лушникова Е.Л.<sup>3</sup>, Бакарев М.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, e-mail: ig.bobrov2010@yandex.ru;

<sup>2</sup>Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, e-mail: cherdan.morf@yandex.ru;

<sup>3</sup>Институт молекулярной патологии и патоморфологии «Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru

В работе проведен количественный анализ В-лимфоцитов в перитуморозной зоне (ПЗ) почечно-клеточного рака. Были исследованы парафиновые блоки послеоперационного материала 53 больных раком почки. Исследование включало 28 (54%) мужчин и 25 (46%) женщин. Возраст пациентов, в среднем, составил 56,7±1,2 года. С числом В-лимфоцитов в ПЗ опухоли коррелировали: стадия заболевания ( $r=0,62$ ;  $p=0,0001$ ), размер опухоли ( $r=0,58$ ;  $p=0,0001$ ), градация опухоли по Фурману ( $r=0,64$ ;  $p=0,0001$ ), наличие регионарных и дистантных метастазов ( $r=0,30$ ;  $p=0,03$ ) и послеоперационная выживаемость пациентов ( $r=0,31$ ;  $p=0,025$ ). Не были взаимосвязаны с количеством В-лимфоцитов в ПЗ карцином: пол ( $r=0,04$ ;  $p=0,79$ ), возраст ( $r=0,10$ ;  $r=0,46$ ) пациентов и гистологический тип новообразований ( $r=0,11$ ;  $p=0,43$ ). Содержание высокого числа В-лимфоцитов в ПЗ рака почки можно рассматривать в качестве критерия образования регионарных и дистантных метастазов. Высокое содержание В-лимфоцитов в ПЗ является неблагоприятным фактором послеоперационной выживаемости у пациентов с почечно-клеточным раком.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, перитуморозная зона, В-лимфоциты, прогноз.

## PREDICTIVE VALUE OF QUANTITATIVE ASSESSMENT B-LYMPHOCYTES IN THE PERITUMOROUS ZONE IN RENAL CELL CARCINOMA

Bobrov I.P.<sup>1</sup>, Cherdantseva T.M.<sup>2</sup>, Dolgatova E.S.<sup>1</sup>, Dolgатов A.Yu.<sup>1</sup>, Lepilov A.V.<sup>1</sup>,  
Lushnikova E.L.<sup>3</sup>, Bakarev M.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Altai State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Barnaul, e-mail: ig.bobrov2010@yandex.ru;

<sup>2</sup>Ryazan State Medical University named after Academician I. P. Pavlov, Ryazan, e-mail: cherdan.morf@yandex.ru;

<sup>3</sup>Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru

A quantitative analysis of B-lymphocytes in the peritumoral zone (PZ) of renal cell carcinoma was performed. Paraffin blocks of postoperative material from 53 patients with kidney cancer were examined. The study included 28 (54%) men and 25 (46%) women. The average age of the patients was 56.7±1.2 years. The number of B-lymphocytes in the PZ of the tumor was correlated with: the stage of the disease ( $r=0.62$ ;  $p=0.0001$ ), the size of the tumor ( $r=0.58$ ;  $p=0.0001$ ), the Fuhman grade of the tumor ( $r=0.64$ ;  $p=0.0001$ ), the presence of regional and distant metastases ( $r=0.30$ ;  $p=0.03$ ) and postoperative survival of patients ( $r=0.31$ ;  $p=0.025$ ). The following factors were not correlated with the number of B-lymphocytes in PZ carcinomas: gender ( $r=0.04$ ;  $p=0.79$ ), age ( $r=0.10$ ;  $r=0.46$ ) of patients, and histological type of neoplasms ( $r=0.11$ ;  $p=0.43$ ). The content of a high number of B-lymphocytes in the PZ of kidney cancer can be considered as a criterion for the formation of regional and distant metastases. The high content of B-lymphocytes in PZ is an unfavorable factor of postoperative survival in patients with renal cell carcinoma.

Keywords: renal cell carcinoma, peritumoral zone, B-lymphocytes, prognosis.

Микроокружение опухолевых клеток интересует исследователей на протяжении последних десятилетий, изучение касается: тучных клеток [1–3]; макрофагов [4–6]; ангиогенеза [7, 8] и др.

В мировой литературе прогностическому значению В-лимфоцитов в перитуморозной зоне (ПЗ) злокачественных новообразований посвящены единичные исследования. Короткое выживание пациентов после оперативного лечения было ассоциировано с увеличением числа перитуморозных CD20+ В-лимфоцитов при саркомах мягких тканей. При проведении многофакторного анализа высокое содержание CD20+ лимфоцитов в ПЗ сарком мягких тканей явилось независимым фактором неблагоприятного прогноза [9].

Для распространенного плоскоклеточного рака легкого с метастазами было характерно возрастание числа CD20+ лимфоцитов в ПЗ опухоли [10].

По данным М.А. Сенчуковой и соавт. (2015), ранние стадии рака желудка характеризовала невысокая очаговая плотность распределения CD20+ В-лимфоцитов в ПЗ, которая не была связана с отдаленными результатами оперативного лечения, а наличие в ПЗ выраженных инфильтратов с множественными лимфоидными фолликулами из CD20+ клеток ассоциировалось с диффузным типом рака желудка и плохим прогнозом [11]. Инфильтрация ПЗ В-лимфоцитами была взаимосвязана с распространенностью и размером опухолей. Так, О.Н. Томчук (2016) показала, что при раке желудка выраженные CD20+ В-лимфоцитарные инфильтраты отмечали в ПЗ крупных карцином (>5 см) и при множественных метастазах [12].

При раке молочной железы высокой степени злокачественности численность CD20+ В-лимфоцитов в ПЗ увеличивалась, при этом отмечали тенденцию к образованию фолликулоподобных структур без герминативных центров [13].

В ПЗ рака гортани плотность воспалительного инфильтрата была наибольшей в карциномах высокой степени злокачественности, при этом инфильтрат характеризовался большим количеством CD20+ В-лимфоцитов с наличием фолликулоподобных образований [14].

Таким образом, работы, где было изучено прогностическое значение количественного содержания В-лимфоцитов в ПЗ злокачественных новообразований, немногочисленны, а исследований, посвященных количественному анализу В-лимфоцитов в ПЗ почечно-клеточного рака (ПКР), в доступной литературе нами не обнаружено.

Целями исследования являлись проведение количественного анализа популяций В-лимфоцитов в ПЗ ПКР и выявление взаимосвязей с клинико-анатомическими факторами прогноза и 5-летней послеоперационной выживаемостью пациентов.

### **Материалы и методы исследования**

Всего был изучен послеоперационный материал 53 больных ПКР. Мужчин было 28 (52,8%), женщин – 25 (47,2%). Возраст пациентов в среднем составил 56,7±1,2 года.

Классификацию ПКР осуществляли в соответствии с классификацией ВОЗ 2016 г. [15]. Светлоклеточный рак был в 28 (52,8%) случаях, папиллярный рак – в 10 (18,9%) случаях, хромофобный рак – в 10 (18,9%) случаях и неклассифицируемый рак – в 5 (9,4%) случаях.

Пациентов с I клинической стадией (T1N0M0) в исследовании было 30 (56,6%); со стадией II (T2N0M0) – 6 (11,3%); со стадией III (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 10 (18,9%) и с IV стадией (T4N0M0, T4N1M0, ТлюбаяN2M1, ТлюбаяNлюбаяM1) – 7 (13,2%).

Степень анаплазии по Фурману GI была в 21 опухоли (39,6%), GII – в 10 (18,9%) опухолях, GIII – в 11 (20,75%) опухолях и GIV – в 10 (20,75%) новообразованиях.

Опухолей без метастазов было 40 (75,5%), с метастазами – 13 (24,5%).

Размер новообразований в среднем составил  $6,8 \pm 0,2$  см.

Материал фиксировали в 10%-ном р-ре нейтрального формалина в течение 24 ч. В-лимфоциты выявляли иммуногистохимическим методом с помощью моноклональных мышиных антител к CD97 $\alpha$  (клон HM47, Vector) по протоколу производителя. С помощью компьютерной морфометрической программы Image Tool. 3.0. при увеличении микроскопа  $\times 400$  подсчитывали среднее количество В-лимфоцитов в 3 полях зрения в ПЗ карцином.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета Statistica 10.0. Если полученные цифровые данные имели нормальное распределение, то для оценки достоверности применяли t-test Стьюдента, а если данные не соответствовали нормальному распределению, то использовали U-тест Манна–Уитни или Колмогорова–Смирнова. Достоверными данные считали при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ осуществляли расчетом коэффициента Пирсона.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Результаты исследования позволили выявить, что без учета клинических и анатомических особенностей новообразований число В-лимфоцитов в ПЗ ПКР составило  $55,7 \pm 6,9$  в 3 полях зрения при большом увеличении микроскопа. Очаговая инфильтрация ПЗ В-лимфоцитами отмечалась в 47,2% случаев, диффузную инфильтрацию В-лимфоцитами выявляли в 13,2% случаев и диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов определяли в 39,6% случаев.

При поиске корреляционных взаимосвязей выявлено, что с содержанием В-лимфоцитов в ПЗ были взаимосвязаны: стадия заболевания ( $r=0,62$ ;  $p=0,0001$ ); размер опухоли ( $r=0,58$ ;  $p=0,0001$ ); степень анаплазии по Фурману ( $r=0,64$ ;  $p=0,0001$ ); возникновение метастазов ( $r=0,30$ ;  $p=0,03$ ) и послеоперационная выживаемость пациентов ( $r=0,31$ ;  $p=0,025$ ). Не было обнаружено взаимосвязей с полом, возрастом больных и гистологическим вариантом опухолей (табл. 1).

Корреляционные взаимосвязи содержания В-лимфоцитов в ПЗ с клинико-анатомическими особенностями карцином

Клинико-анатомический параметр	Коэффициент корреляции (r)	p
Пол больных	0,04	0,79
Возраст больных	0,10	0,46
Гистологический вариант опухоли	0,11	0,43
Стадия заболевания	0,62	0,0001
Размер опухоли	0,58	0,0001
Степень анаплазии опухоли по Фурману	0,64	0,0001
Наличие метастазов	0,30	0,03
Послеоперационная выживаемость больных	0,31	0,025

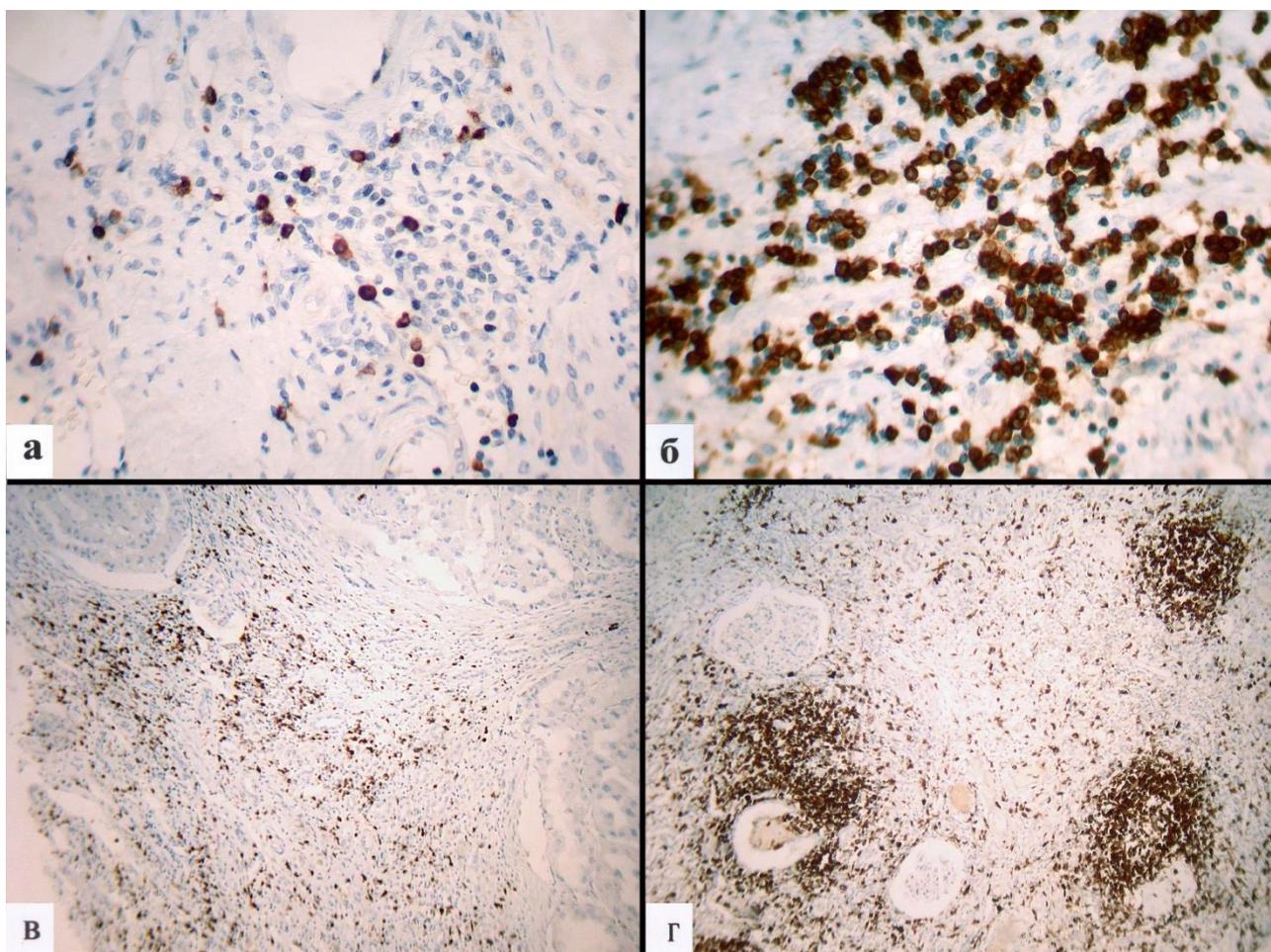
Число В-лимфоцитов в ПЗ у мужчин было равно  $60,4 \pm 8,3$ , у женщин –  $50,9 \pm 11,2$  ( $p=0,5$ ) (табл. 2). У мужчин среднее число В-лимфоцитов в ПЗ составило  $60,4 \pm 8,3$ , у женщин –  $50,9 \pm 11,2$  ( $p=0,5$ ) (табл. 2). Очаговую инфильтрацию В-лимфоцитами в ПЗ у мужчин отмечали в 39,3% случаев, диффузную инфильтрацию – в 10,7% случаев, диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов – в 50% случаев, а у женщин очаговую, диффузную и диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов инфильтрацию отмечали в 56%, 16% и 28% случаев соответственно.

Возраст влиял на содержание В-лимфоцитов в ПЗ. Наибольшее содержание В-лимфоцитов в ПЗ отмечали в возрастной группе от 40 до 49 лет ( $73,7 \pm 17,5$ ), а наименьшее – в возрасте от 30 до 39 лет ( $5,0 \pm 0,6$ ) (табл. 2). При возрасте пациентов 30–39 лет в 100% случаев в ПЗ присутствовала очаговая инфильтрация В-лимфоцитами. При возрасте 40–49 лет очаговая инфильтрация В-лимфоцитами в ПЗ присутствовала в 50% случаев, диффузная инфильтрация – в 20% случаев и диффузная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов – в 30% случаев.

На содержание В-лимфоцитов в ПЗ оказывал влияние гистологический тип опухоли. Наиболее высокое количество В-лимфоцитов в ПЗ было при неклассифицируемом раке ( $62,8 \pm 10,7$ ), а наиболее низкое – при папиллярном раке –  $5,6 \pm 0,6$  (табл. 2). При неклассифицируемом раке в ПЗ в 100% случаев отмечали диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов, а при папиллярном раке в 100% случаев присутствовала очаговая инфильтрация.

При ранних стадиях (I–II стадия заболевания) количество В-лимфоцитов в ПЗ равнялось  $15,05 \pm 1,08$  (табл. 2). Очаговую инфильтрацию В-лимфоцитами в ПЗ при ранних стадиях отмечали в 69,4% случаев, диффузную инфильтрацию – в 8,4% случаев и диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов – в 22,2% случаев. При III–IV стадиях содержание В-лимфоцитов в ПЗ возрастало в 8,5 раза и составило  $128,6 \pm 14,8$  (табл. 2). При

этом диффузная инфильтрация возрасла в 2,8 раза (до 23,5%), диффузная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов – в 3,45 раза (до 76,5%), а очаговая инфильтрация отсутствовала.



*Рис. 1. Экспрессия В-лимфоцитов в ПЗ ПКР: а – небольшое количество В-лимфоцитов в ПЗ при I степени анаплазии по Фурману, ув. x400; б – большое количество В-лимфоцитов в ПЗ при IV степени анаплазии по Фурману, ув. x400; в – диффузная инфильтрация ПЗ В-лимфоцитами при большом размере опухолевого узла, ув. x100; г – диффузная инфильтрация В-лимфоцитами с образованием лимфоидных фолликулов в ПЗ местнораспространенных карцином, ув. x100. Иммуногистохимическая окраска на CD97a*

При степени анаплазии карцином по Фурману GI–GII содержание В-лимфоцитов в ПЗ составило  $14,1 \pm 1,7$ , а при GIII–GIV оно было больше в 8,6 раза (табл. 2) (рис. 1а, 1б). Очаговую инфильтрацию В-лимфоцитами ПЗ карцином степени анаплазии GI–GII наблюдали в 75% случаев, диффузную – в 9,4% случаев и диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов – в 15,6% случаев. Очаговая инфильтрация В-лимфоцитами в ПЗ при GIII–GIV степени анаплазии уменьшалась в 15,6 раза (4,8%), диффузная инфильтрация

возрастала в 2,8 раза (до 19%) и диффузная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов снижалась в 4,9 раза (до 76,2%).

Таблица 2

Плотность распределения В-лимфоцитов в ПЗ в зависимости от клинико-анатомических особенностей ПКР

Клинико-анатомический параметр	Количество В-лимфоцитов в ПЗ	p
Пол: мужской женский	60,4±8,3 50,9±11,2	p=0,5
Возраст: 30–39 лет (1) 40–49 лет (2) 50–59 лет (3) 60–69 лет (4) 70–79 лет (5)	5,0±0,6 73,7±17,5 58,3±9,6 50,2±14,8 38,3±11,2	P <sub>1-4</sub> =0,05
Гистологический вариант карцином: папиллярный (1) хромофобный (2) светлоклеточный (3) неклассифицируемый (4)	5,6±0,6 40,2±17,7 60,2±8,1 62,8±10,7	P <sub>1-4</sub> =0,00002
Стадия TNM: I–II III–IV	15,05±1,8 128,6±14,8	p=0,0000001
Степень анаплазии по Фурману: GI–II GIII–IV	14,1±1,7 122,4±14,5	p=0,0000001
Размер опухоли: <7,0 см ≥7,0 см	14,7±1,9 113,6±13,6	p=0,0000001
Распространенность опухолевого процесса: N0 N+	42,1±7,9 97,7±12,2	p=0,00045

Когда размер опухоли был <7,0 см, число В-лимфоцитов в ПЗ составило 14,7±1,9, а при размере ≥7,0 см оно достоверно возрастало в 7,7 раза (табл. 2, рис. 1в). Очаговую инфильтрацию В-лимфоцитами в ПЗ при размере опухолевого узла <7,0 см отмечали в 71% случаев, диффузную инфильтрацию – в 6,4% случаев и диффузную инфильтрацию с образованием лимфоидных фолликулов – в 22,6% случаев. Если размер опухоли был >7,0 см, диффузная инфильтрация ПЗ В-лимфоцитами возрастала в 3,5 раза (до 22,7%), диффузная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов возрастала в 2,8 раза (до 63,6%), а очаговая инфильтрация уменьшалась в 5,2 раза (13,6%).

У пациентов с локализованными опухолями количество В-лимфоцитов в ПЗ составило 42,1±7,9, а в ПЗ карцином с метастазами оно достоверно увеличивалось в 2,3 раза (табл. 2, рис. 1г). Очаговую инфильтрацию ПЗ В-лимфоцитами локализованных карцином наблюдали в 62,5% случаев, диффузную – в 5% случаев и диффузную инфильтрацию с образованием

лимфоидных фолликулов – в 32,5% случаев. В ПЗ местнораспространенных карцином диффузная инфильтрация В-лимфоцитами возрастала в 7,7 раза (38,5%), диффузная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов возрастала в 1,9 раза (до 61,5%), очаговая инфильтрация отсутствовала.

При проведении анализа 5-летней послеоперационной выживаемости больных по Каплану–Майеру обнаружено, что если число В-лимфоцитов в ПЗ было  $<56$ , то через 5 лет доля выживших была равна 0,84 (84%), а если содержание В-лимфоцитов в ПЗ было  $\geq 56$ , то доля выживших снижалась до 0,54 (54%). Применение log-rank-критерия показало, что различия между кривыми выживания были достоверны ( $p=0,03$ ) (рис. 2).

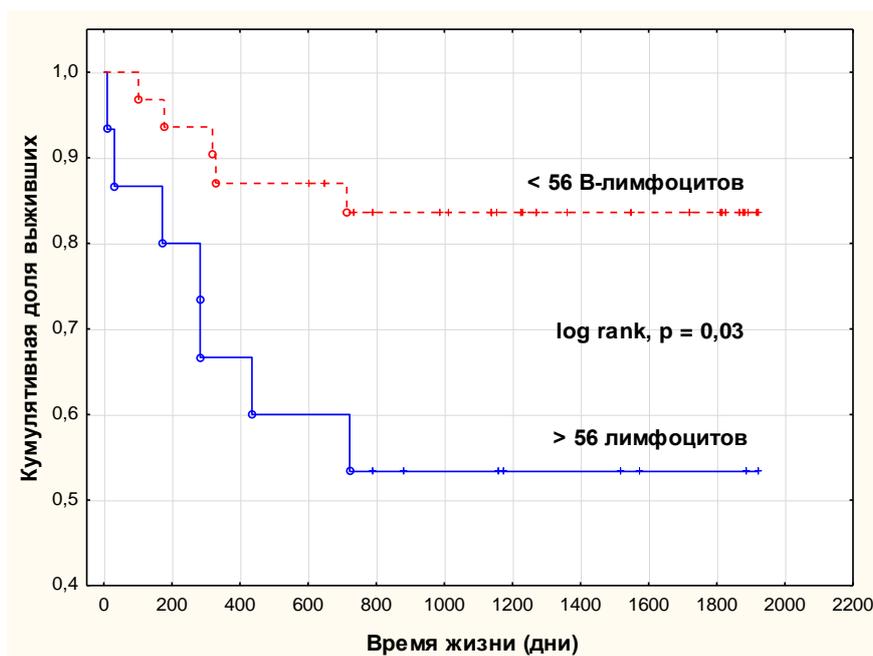


Рис. 2. Доля выживших пациентов через 5 лет наблюдения в зависимости от плотности распределения В-лимфоцитов в ПЗ карцином

### Заключение

Таким образом, результаты исследования позволяют заключить, что количество В-лимфоцитов в ПЗ зависело от клинко-анатомических характеристик карцином. Число В-лимфоцитов в ПЗ увеличивалось при III–IV стадиях заболевания, GIII–IV степенях анаплазии по Фурману, в неклассифицируемом раке, при увеличении размера опухоли и возникновении метастазов. Количественную оценку содержания В-лимфоцитов в ПЗ можно использовать в качестве дополнительного прогностического фактора при почечно-клеточном раке.

### Список литературы

1. Лазарев А.Ф., Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Брюханов В.М., Авдалян А.М., Лубенников В.А., Гервальд В.Я. Тучные клетки и опухолевый рост // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 4. С. 59-63.
2. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В., Казарцев А.В., Крючкова Н.Г., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Лепилов А.В., Лушникова Е.Л., Молодых О.П. Тучные клетки при раке почки: клинико-морфологические взаимосвязи и прогноз // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 6. С. 768-773.
3. Бобров И.П., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Черданцева Т.М., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А., Молодых О.П. Прогностическое значение количественной оценки числа тучных клеток (CD117+) в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки // Вестник научных конференций. 2020. № 4-2. С. 20-22.
4. Бобров И.П., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Черданцева Т.М., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А., Молодых О.П. Количественная оценка числа макрофагов (CD68+) в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки: клинико-морфологические сопоставления // Вестник научных конференций. 2020. № 4-2. С. 17-20.
5. Грачев А.Н., Самойлова Д.В., Рашидова М.А., Петренко А.А., Ковалева О.В. Макрофаги, ассоциированные с опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования // Успехи молекулярной онкологии. 2018. № 4. С. 20-28.
6. Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжишковска Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии // Бюллетень сибирской медицины. 2017. № 4. С. 42-60.
7. Hollemann D., Yanagida G., Rüger B.M., Neuchrist C., Fischer M.B. New vessel formation in peritumoral area of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2012. Vol. 34. № 6. P. 813-820.
8. Zhang B.C., Guan S., Zhang Y.F., Yao G.Q., Yang B., Zhao Y., Rao Z.G., Gao J.F. Peritumoral lymphatic microvessel density is related to poor prognosis in lung adenocarcinoma: A retrospective study of 65 cases. *Exp. Ther. Med*. 2012. Vol. 3. № 4. P. 636-640.
9. Sorbye S.W., Kilvaer T.K., Valkov A., Donnem T., Smeland E., Al-Shibli K., Bremnes R.M., Busund L.T. Prognostic impact of peritumoral lymphocyte infiltration in soft tissue sarcomas. *BMC Clin. Pathol*. 2012. Vol. 29. № 2. P. 5.
10. Баударбекова М.М., Калмыкова А.В. Иммуногистохимическая характеристика иммунноклеточного микроокружения плоскоклеточного рака легкого // Патология. 2017. № 2. С. 136-141.

11. Сенчукова М.А., Рябов А.Б. Особенности В-лимфоцитарной инфильтрации прилежащей к опухоли слизистой оболочки желудка при раке. Клинико-морфологические аспекты // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2015. № 5. С. 8-11.
12. Томчук О.И. Морфологическая характеристика реактивных изменений околоопухолевых участков слизистой оболочки желудка и регионарных лимфоузлов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2016. 22 с.
13. Казачков Е.Л., Семенова А.Б., Шаманова А.Ю. Структурные особенности воспалительно-клеточного инфильтрата в параканкрозной и дистантной зонах инвазивных карцином неспецифического типа молочной железы различных степеней злокачественности // Уральский медицинский журнал. 2014. № 8. С. 33-36.
14. Шаманова А.Ю., Казачков Е.Л., Семенова А.Б. Сосуды и лимфоцитарный инфильтрат как компоненты микроокружения опухоли при местнораспространенном раке гортани // Уральский медицинский журнал. 2014. № 8. С. 62-64.
15. Бежанова С.Д. Опухоли почек. Новая классификация опухолей урогенетальной системы Всемирной организации здравоохранения 2016 г. // Архив патологии. 2017. № 2. С. 48-52.