

ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В ОПУХОЛИ ПРИ МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНОМ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ И РЕЦИДИВИРОВАНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Сагакянц А.Б.¹, Белякова Л.И.¹, Шевченко А.Н.¹, Бондаренко Е.С.¹, Златник Е.Ю.¹, Новикова И.А.¹, Филатова Е.В.¹, Хван В.К.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: asagak@rambler.ru

Цель: изучить особенности популяционного состава иммунокомпетентных клеток в опухоли при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря различной степени злокачественности и рецидивировании заболевания. **Материалы и методы.** Исследовались фрагменты опухоли 51 пациента с впервые выявленным немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря различного злокачественного потенциала. Через 6-9 месяцев у 24 пациентов диагностирован рецидив заболевания – в 48% у пациентов 1 группы (LG, n=15) и в 45% - 2 группы (HG, n=9). В клеточных суспензиях, полученных из фрагментов первичной и рецидивной опухолевой ткани (ОП) методом проточной цитометрии определяли относительное содержание иммунокомпетентных клеток. **Результаты.** Показано, что повышение злокачественного потенциала опухолевых клеток сопровождается увеличением лимфоидной инфильтрации, а также предшественников Т-лимфоцитов (ДП- и ДН-лимфоцитов) и В-лимфоцитов. Обнаруживается выраженное снижение относительного количества иммуноцитов с литическим потенциалом как врожденного, так и адаптивного звеньев иммунитета - CD8⁺ лимфоцитов, НКТ- и NK-лимфоцитов при высоком уровне последних в ткани рецидива. В первичных опухолях больных с HG папиллярной уротелиальной карциномой обнаруживается статистически значимое увеличение лимфоцитарной инфильтрации, обусловленной накоплением в опухоли лимфоцитов хелперно-индукторного типа (CD4⁺) и В-лимфоцитов. Результатом обозначенной особенности является значимое снижение литических клеток адаптивного (CD8⁺ Т-лимфоциты) и врожденного иммунитета (NK-лимфоциты). В рецидивных опухолях высокого злокачественного потенциала обнаруженные особенности первичной опухоли находят еще более выраженный характер, что сопровождается увеличением инфильтрации ткани опухоли регуляторными популяциями ИКК, снижающими эффективность созревания, накопления и реализации эффекторных функций цитотоксических лимфоцитов. **Заключение:** иммунное микроокружение первичных НМИРМП с рецидивирующим и нерецидивирующим течением, а также самих рецидивов, происходящих из них, имеет различия, ряд которых может быть прогностически значимым. Различия иммунного микроокружения между первичной опухолью и рецидивом могут способствовать более агрессивному течению последнего.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, локальный клеточный иммунитет, лимфоциты, рецидив.

FEATURES OF THE POPULATION COMPOSITION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN A TUMORS IN NON-INVASIVE MUSCLE BLADDER CANCER OF VARIOUS DEGREES OF MALIGNANCY AND RECURRENT DISEASE

Sagakyants A.B.¹, Belyakova L.I.¹, Shevchenko A.N.¹, Bondarenko E.S.¹, Zlatnik E.U.¹, Novikova I.A.¹, Filatova E.V.¹, Hvan V.K.¹

¹Federal State Budgetary Institution «National medical research centre for oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation («National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia»), Rostov-on-Don, e-mail: asagak@rambler.ru

The aim: to study the features of the population composition of immunocompetent cells in tumors in non-muscle-invasive bladder cancer of varying degrees of malignancy and disease recurrence. **Materials and methods.** Tumor fragments of 51 patients with newly diagnosed non-muscle-invasive bladder cancer of various malignant potential were studied. After 6-9 months, 24 patients were diagnosed with a relapse of the disease - in 48% in patients of group 1 (LG, n=15) and in 45% - in group 2 (HG, n=9). In cell suspensions obtained from fragments of primary and recurrent tumor tissue (TP), the relative content of immunocompetent cells was determined by flow cytometry. **Results.** It was shown that an increase in the malignant potential of tumor cells is accompanied by an increase in lymphoid infiltration, as well as the precursors of T-lymphocytes (DP- and DN-lymphocytes) and B-lymphocytes. There is a pronounced decrease in the relative number of immunocytes with lytic potential of both innate and

adaptive immunity - CD8+ lymphocytes, NKT- and NK-lymphocytes with a high level of the latter in the tissue of relapse. In the primary tumors of patients with HG papillary urothelial carcinoma, a statistically significant increase in lymphocytic infiltration is found, due to the accumulation of helper-inductor-type lymphocytes (CD4+) and B-lymphocytes in the tumor. The result of this feature is a significant decrease in lytic cells of adaptive (CD8+ T-lymphocytes) and innate immunity (NK-lymphocytes). In recurrent tumors of high malignant potential, the detected features of the primary tumor are even more pronounced, which is accompanied by an increase in tumor tissue infiltration by regulatory ICC populations, which reduce the efficiency of maturation, accumulation, and implementation of the effector functions of cytotoxic lymphocytes. Conclusion: the immune microenvironment of primary NMIBCs with recurrent and non-recurrent course, as well as the relapses themselves arising from them, has differences, some of which may be prognostically significant. Differences in the immune microenvironment between the primary tumor and relapse may contribute to a more aggressive course of the latter.

Keywords: bladder cancer, non-muscle-invasive bladder cancer, cancer immunology, local cellular immunity, lymphocytes, relapse

Рак мочевого пузыря (РМП) по-прежнему занимает 7-е место среди наиболее часто диагностируемых видов рака у мужчин, в то время как при рассмотрении обоих полов он занимает 10-е место [1; 2]. Уступает злокачественным новообразованиям почки в структуре общей онкоурологической заболеваемости и составляет 4,6% [3; 4].

На РМП, локализующийся в слизистой оболочке - немышечно-инвазивная форма (НМИРМП), по классификации TNM: Ta, T1, карциномы in situ (CIS), приходится около 75% всех случаев [2], у более молодых пациентов, возраст которых менее 40 лет, этот процент еще выше [5]. Особенностью уротелиальной карциномы низкого злокачественного потенциала low grade (по классификации ВОЗ от 2004) является то, что она имеет строение папиллярной опухоли, состоящей из тонких ветвящихся папилл; нарушенную полярность ядер. Частота рецидивирования, прогрессирования и летальных исходов у больных с данным типом опухоли составляет 50%, 18% и 7% соответственно. В отличие от карцином low grade, опухоль высокой степени злокачественности (high grade) также имеет папиллярное строение, но с выраженной атипией ядер, проявляющейся в нарушениях их полярности, как правило, данные клетки находятся на разных фазах деления (митоза). У больных данной формой РМП прогрессия и летальные исходы отмечаются в 65% [6].

Заболеваемость РМП в России продолжает расти, и следует отметить, что идет тенденция к омоложению диагностированных случаев РМП. Прирост заболеваемости для обоих полов за последние 10 лет составил 28,3% [7]. Растет число больных, диагноз которых устанавливается на поздних стадиях, что косвенно указывает на несвоевременное обращение больных ввиду неспецифических симптомов, а зачастую и бессимптомного течения заболевания, и на несвоевременную диагностику данной патологии [8].

На протяжении ряда последних лет особое внимание исследовательских групп в разных странах привлекает микроокружение опухоли, включающее как сами опухолевые клетки, так и стромальные и различные иммунокомпетентные клетки (ИКК), широкий спектр сигнальных молекул (цитокины, хемокины и др.) внеклеточного матрикса, кровеносных сосудов. Не вызывает сомнения, что изучение роли отдельных звеньев эффекторных и

регуляторных механизмов системы врожденного и адаптивного иммунитета в развитии, клиническом течении, прогрессировании опухолевого процесса имеет важное общебиологическое и прикладное значение [9]. Было показано, что наибольшее значение среди всех ИКК имеет число Т-лимфоцитов, которые инфильтрируют опухоль [10], при этом особое значение имеет не только преобладающий тип клеток, но и характер их распределения в опухоли. Следует отметить, что роль отдельных клеточных составляющих в развитии рецидивов опухоли мочевого пузыря различной степени злокачественности остается малоизученной и требует дополнительного исследования.

Цель исследования

В связи с вышеизложенным целью работы явилось изучение особенностей популяционного состава иммунокомпетентных клеток в опухоли при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря различной степени злокачественности при рецидивировании заболевания.

Материалы и методы исследования

В работе исследовались образцы тканей опухоли 51 пациента, преимущественно мужского пола (90%), средний возраст которых составил 61,6 года, с впервые выявленным немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (НМИРМП). После проведенного комплексного лечения в объеме: трансуретральная резекция мочевого пузыря + адъювантная внутривезикулярная химиотерапия № 6 (ТУР+ВПХТ), за всеми больными было установлено динамическое наблюдение. Согласно результатам гистологического анализа, пациенты с папиллярной уротелиальной карциномой были распределены на две группы: 1 группа – с опухолью низкого злокачественного потенциала (Low grade - LG), n=31, средний возраст 62,8 года; 2 группа – с опухолью высокого злокачественного потенциала (High grade - HG), n=20, средний возраст больных 63,5 года. Каждые 3 месяца больные проходили контрольное обследование, в том числе – цистоскопическое исследование мочевого пузыря, в результате которого через 6-9 месяцев у 24 пациентов был диагностирован рецидив заболевания – в 48% у пациентов 1 группы (n=15) и в 45% - 2 группы (n=9).

На основании выявления рецидивов или их отсутствия больные были разделены на подгруппы: 1 – LG без рецидива (n=16), первичные не рецидивирующие; 2 – LG с рецидивом (n=15), первичные рецидивирующие; 3 - LG рецидивные (n=15), рецидив; 4 – HG без рецидива (n=11), первичные не рецидивирующие; 5 – HG с рецидивом (n=9), первичные рецидивирующие; 6 - HG рецидивные (n=9), рецидив.

Все пациенты давали письменное согласие на участие в исследовании.

Первичным больным интраоперационно производился забор материала, вследствие ТУР мочевого пузыря, а также аналогичный забор осуществлялся больным после

диагностирования рецидива заболевания. Материалом для исследования послужили фрагменты опухоли (ОП), которые доставлялись в лабораторию, где подвергались механическому дроблению с последующей гомогенизацией ткани с использованием гомогенизатора BD Medimachine, США (к фрагментам ОП добавляли 2 мл буфера для отмывания клеток Cell Wash, гомогенизировали 30 сек., клеточную суспензию фильтровали с использованием 50 μ m Medicons, США). Клетки осаждались с помощью рефрижераторной центрифуги Eppendorf Centrifuge 5702R (Eppendorf AG, Germany) при 250 g в течение 5 минут. Удаляли надосадочную жидкость, клетки ресуспензировали в 100 мкл буфера Cell Wash.

Суспензия клеток обрабатывалась панелью моноклональных антител: CD3 FITC/CD15+56 PE/CD45 PerCP-Cy5.5/CD4 PE-Cy7/CD19 APC/CD8 APC-Cy7 в соответствии с инструкциями фирмы-производителя (BD, USA). Оценку результатов осуществляли на проточном цитометре FACS Canto II (BD, USA). В каждом образце для анализа данных накапливали не менее 100 000 клеток. Оценивали относительное (процентное) содержание клеток искомого фенотипа к общему числу живых клеток.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета Statistica 13 (StatSoft Inc., США). Оценивали характер распределения полученных данных с использованием критерия Шапиро-Уилка. Ввиду того что полученные результаты характеризовались ненормальным распределением, они представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха - 25 и 75 процентиля (Me [LQ; UQ]). Достоверность отличий между выборками оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время оценка инфильтрирующих опухоль иммунокомпетентных клеток может предполагать определение различных их функциональных популяций и субпопуляций. В проведенном нами исследовании осуществлялось определение следующих популяций клеток:

Лимф. – общее число лимфоцитов, CD45⁺-клеток, определяемых по морфологическим и физическим характеристикам на скатерограммах распределения клеток методом проточной цитометрии;

CD3⁺ - общее количество Т-лимфоцитов, CD45⁺CD3⁺ клетки;

CD4⁺ - общее число Т-лимфоцитов хелперно-индукторной группы, CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клетки;

CD8⁺ - общее число цитотоксических Т-лимфоцитов, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ клетки;

CD3⁺CD4⁺CD8⁺ - общее число двойных позитивных Т-лимфоцитов, CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ клетки;

CD3⁺CD4⁺CD8⁻ - общее число двойных негативных Т-лимфоцитов, CD45⁺ CD3⁺CD4⁻ CD8⁻ клетки;

CD16⁺CD56⁺ - общее число NK-лимфоцитов (натуральных киллеров), CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки;

CD3⁺CD16⁺CD56⁺ - общее число Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры NK-клеток, CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки;

CD19⁺ - общее число В-лимфоцитов, CD45⁺CD3⁺CD19⁺ клетки.

ИРИ – иммунорегуляторный индекс, представляющий собой соотношение Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺).

Накоплен обширный экспериментальный и клинический материал, позволяющий говорить о том, что изучение особенностей популяционного состава опухолей различной локализации, в том числе и перечисленных типов клеток, имеет важное диагностическое и прогностическое значение. Несмотря на то что характер и направление изменения отдельных популяций при различных опухолях и способах их лечения достаточно часто неоднозначен, тем не менее использование комплексного анализа иммунологических показателей позволяет определить профили иммунологической реактивности при «иммуночувствительных» и «не чувствительных» к иммунологическим воздействиям опухолях и влияния этих профилей на эффективность лечебных подходов [11].

В таблицах 1 и 2 приведены показатели локального иммунитета в первичных и рецидивных опухолях больных сравниваемых групп.

Из представленных результатов видно, что в первичной опухоли в случае образования в дальнейшем рецидива (2 подгруппа) наблюдается ряд отличий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов без образования рецидива (1 подгруппа). В частности, в ОП первичных рецидивных больных выявлено статистически значимое увеличение относительного содержания двойных позитивных Т-лимфоцитов (ДП, CD3+CD4+CD8+), а также В-лимфоцитов, соответственно на 67% и 69%. На этом фоне обращает на себя внимание снижение на 40% количества NKT-лимфоцитов (CD3+CD16+CD56+).

Таблица 1

Параметры локального клеточного иммунитета
в тканях опухоли НМИРМП пациентов 1 группы LG, Me (LQ; UQ)

Показатели, отн. содержание	1 Первичные (нерецидивирующие), n=16	2 Первичные (рецидивирующие), n=15	3 Рецидивные (рецидив), n=15	Уровень значимости, р
Лимф.	18,6 (17,2;39,2)	16,6 (8,8;21,1)	13,6 ¹ (8,6;18,6)	p ₍₃₋₁₎ =0,044

CD3+	83,4 (67,5;89)	74,3 (71,3;83)	78,8 (72,1;85,4)	
CD4+	35,1 (33,7;41,2)	27,0 (24,5;31,9)	24,8 ¹ (16,1;33,4)	p ₍₃₋₁₎ =0,038
CD8+	37,9 (18,3;58,1)	41,0 (37,2;44,9)	30,7 ² (25,8;35,7)	p ₍₃₋₂₎ =0,046
CD3+ CD4+CD8+	0,3 (0,2;0,5)	0,5 ¹ (0,45;1,25)	0,3 ² (0,25;0,35)	p ₍₂₋₁₎ =0,039 p ₍₃₋₂₎ =0,041
CD3+ CD4-CD8-	3,2 (2,4;3,9)	3,7 (2,4;15)	23,0 ^{1,2} (18,5;30)	p ₍₃₋₁₎ =0,0008 p ₍₃₋₂₎ =0,001
CD16+CD56+	6,7 (5,8;10,6)	7,6 (5,8;10,2)	17,2 ^{1,2} (10;24,3)	p ₍₃₋₁₎ =0,019 p ₍₃₋₂₎ =0,028
CD3+ CD16+CD56+	8,4 (7,4;11,5)	5,0 ¹ (3,9;7,3)	25,5 ^{1,2} (20,4;30,5)	p ₍₂₋₁₎ =0,036 p ₍₃₋₁₎ =0,0018 p ₍₃₋₂₎ =0,001
CD19+	5,9 (2,8;7,3)	10,0 ¹ (7,9;17,2)	2,5 ^{1,2} (2,3;2,6)	p ₍₂₋₁₎ =0,027 p ₍₃₋₁₎ =0,04 p ₍₃₋₂₎ =0,037
ИРИ	0,83 (0,4;1,2)	0,65 (0,5;0,8)	0,7 (0,5;0,85)	

Примечание: приведены значения *p* только для статистически значимых отличий (*p*<0,05).

Несмотря на то что остальные определяемые параметры не имели значимых отличий, обращает на себя внимание тенденция к снижению Т-лимфоцитов хелперов с небольшим увеличением содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).

Образование рецидивной опухоли сопровождается появлением ряда особенностей относительного количества определяемых ИКК (3 подгруппа), причем как по отношению к соответствующим показателям в ОП без рецидива (подгруппа 1), так и по отношению к первичной опухоли данных больных (2 подгруппа).

Так, в рецидивной ОП по сравнению с первичной ОП отмечается статистически значимое снижение CD8+ ЦТЛ, ДП лимфоцитов и В-лимфоцитов, соответственно на 25%, 40% и 75%. Снижение в опухоли ЦТЛ практически без изменения содержания CD4+Т-хелперов не сопровождается значимым изменением иммунорегуляторного индекса (ИРИ). На фоне отмеченных изменений в рецидивной ОП выявлено существенное увеличение относительного количества двойных негативных Т-лимфоцитов (ДН, CD3+CD4-CD8-), а также НКТ- и НК -лимфоцитов, соответственно на 522%, 410% и 126% (табл. 1). Учитывая особенности функциональной нагрузки данных клеток, можно предположить, что в случае накопления в опухоли ДН формируются условия, обуславливающие ингибирование миграции клеток адаптивного иммунитета и снижение их литического (противоопухолевого) потенциала, компенсаторным ответом при этом может выступать повышение инфильтрации опухоли клетками врожденного иммунитета - НКТ- и НК -лимфоцитами.

В рецидивной ОП по сравнению с первичной ОП без прогрессирования заболевания

отмечено статистически значимое снижение общей лимфоидной инфильтрации, CD4+ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, соответственно на 27%, 29% и 57% (табл. 1), а также тенденция к снижению CD8+. В данном случае также обнаруживается значительное увеличение на 618% количества ДН лимфоцитов, что сопровождается инфильтрацией опухолевой ткани НКТ- и NK-лимфоцитами, содержание которых оказалось больше на 204% и 156%, что указывает на сохранившуюся в случае рецидивирования особенность микроокружения опухолевых клеток.

Процесс рецидивирования – сложно организованный процесс, предполагающий закономерные изменения биологических свойств опухолевых клеток, а также их микроокружения. Учитывая особую роль ИКК как важнейших факторов, влияющих на свойства ОП, логичным является изучение их популяционного состава.

Полученные в ходе работы результаты определения выбранных показателей в случае опухолей высокого злокачественного потенциала представлены в таблице 2.

В первичных ОП высокого злокачественного потенциала при дальнейшем выявлении рецидива отмечается статистически значимое повышение общего числа лимфоцитов и В-лимфоцитов, содержание которых по сравнению с первичными ОП без рецидива оказалось выше на 62% и 79%. При этом отмечается значимое снижение на 29% НКТ-лимфоцитов, на фоне отсутствия изменения остальных параметров локального клеточного иммунитета (табл. 2). Однако следует отметить, что обнаруживается тенденция к снижению в ОП при дальнейшем рецидивировании количества ДН- и NK-лимфоцитов, что указывает на определенные особенности микроокружения опухоли. Обращает на себя внимание значимое снижение ИРИ на 40%, что происходит на фоне снижения количества CD8+ ЦТЛ.

Таблица 2

Параметры локального клеточного иммунитета
в тканях опухоли НМИРМП пациентов 2 группы, НГ, Ме (LQ; UQ)

Показатели, отн. содержание	4 Первичные (нерецидивирующие), n=11	5 Первичные (рецидивирующие), n=9	6 Рецидивные (рецидив), n=9	Уровень значимости р	Уровень значимости, р (между группами)
Лимф.	26,3 ¹ (14,6;36,9)	42,7 ^{2,4} (34,3;61,7)	45,2 ^{3,4} (32;48,7)	p ₍₅₋₄₎ =0,031 p ₍₆₋₄₎ =0,027	p ₍₄₋₁₎ =0,041 p ₍₅₋₂₎ =0,002 p ₍₆₋₃₎ =0,001
CD3+	68,1 (64;84,6)	74,0 (63,4;84,9)	80,9 (79,7;86,4)		
CD4+	39,8 (35,4;47,9)	39,8 ² (30,6;48,2)	50,2 ^{3,4,5} (38,5;53,2)	p ₍₆₋₄₎ =0,047 p ₍₆₋₅₎ =0,044	p ₍₅₋₂₎ =0,042 p ₍₆₋₃₎ =0,024
CD8+	22,6 ¹ (16,4;25,8)	18,7 ² (12,7;26,6)	20,4 ³ (11,2;24,5)		p ₍₄₋₁₎ =0,043 p ₍₅₋₂₎ =0,037 p ₍₆₋₃₎ =0,043
CD3+ CD4+CD8+	0,4 ¹ (0,25;1,45)	0,35 ² (0,23;0,43)	0,2 ^{3,4,5} (0,1;0,24)	p ₍₆₋₄₎ =0,038 p ₍₆₋₅₎ =0,04	p ₍₄₋₁₎ =0,046 p ₍₅₋₂₎ =0,045 p ₍₆₋₃₎ =0,045

CD3+ CD4-CD8-	4,7 ¹ (4,1;6,9)	3,6 (2,5;8,4)	12,2 ^{3,4,5} (7,0;15,3)	p ₍₆₋₄₎ =0,028 p ₍₆₋₅₎ =0,016	p ₍₄₋₁₎ =0,039 p ₍₆₋₃₎ =0,039
CD16+CD56+	3,7 ¹ (2,6;5,5)	2,9 ² (2,1;4,7)	6,5 ^{3,4,5} (5,5;8,9)	p ₍₆₋₄₎ =0,039 p ₍₆₋₅₎ =0,03	p ₍₄₋₁₎ =0,039 p ₍₅₋₂₎ =0,035 p ₍₆₋₃₎ =0,032
CD3+ CD16+CD56+	5,9 ¹ (3,4;6,6)	4,2 (2,9;5,1)	6,2 ^{3,5} (3,6;6,1)	p ₍₆₋₅₎ =0,041	p ₍₄₋₁₎ =0,045 p ₍₆₋₃₎ =0,027
CD19+	11,7 ¹ (10,5;16,4)	21,0 ^{2,4} (18,9;30)	5,5 ^{3,4,5} (3,7;6,05)	p ₍₅₋₄₎ =0,035 p ₍₆₋₄₎ =0,04 p ₍₆₋₅₎ =0,037	p ₍₄₋₁₎ =0,034 p ₍₅₋₂₎ =0,012 p ₍₆₋₃₎ =0,02
ИРИ	1,68 ¹ (1,4;2,0)	1,0 ^{2,4} (0,9;1,3)	2,8 ^{3,4,5} (2,3;4,4)	p ₍₅₋₄₎ =0,043 p ₍₆₋₄₎ =0,036 p ₍₆₋₅₎ =0,022	p ₍₄₋₁₎ =0,025 p ₍₅₋₂₎ =0,034 p ₍₆₋₃₎ =0,0001

Примечание: приведены значения *p* только для статистически значимых отличий (*p*<0,05).

Формирование рецидива опухоли НМИРМП в случае папиллярной уротелиальной карциномы высокого злокачественного потенциала сопровождается следующими изменениями в определяемых параметрах локального клеточного иммунитета.

Так, по сравнению с первичной опухолью у данных пациентов обнаружено значимое увеличение относительного количества ДН-, НК-, НКТ-и CD4+ Т-лимфоцитов, соответственно на 239%, 124%, 48% и 26% (табл. 2). Увеличение содержания Т-хелперов без изменения количества ЦТЛ приводит к выраженному увеличению на 180% ИРИ, что в совокупности с другими отмеченными особенностями лимфоцитарной инфильтрации может указывать на реализацию процессов ингибирования активности клеток адаптивного иммунитета, на фоне чего происходит компенсаторное увеличение инфильтрации опухоли клетками врожденного иммунитета. Кроме того, обнаруженной особенностью клеточной инфильтрации рецидивной опухоли по сравнению с первичной является статистически значимое снижение ДП- и В-лимфоцитов, количество которых оказалось ниже, соответственно на 43% и 74% (табл. 2).

В опухоли рецидива по сравнению с первичными опухолями в отсутствие дальнейшего прогрессирования заболевания отмечено значимое увеличение лимфоидной инфильтрации, а также числа Т-лимфоцитов хелперно-индукторного типа, ДН- и НК-лимфоцитов, количество которых было выше соответственно на 72%, 26%, 160% и 76%. Увеличение содержания CD4+ клеток без изменения количества ЦТЛ закономерно сопровождается увеличением на 67% ИРИ, отражающим вероятный функциональный сдвиг клеток адаптивного иммунитета в сторону превалирования ингибиторных условий в опухоли, что может вносить определенный вклад в процесс рецидивирования.

Сравнение особенностей параметров локального клеточного иммунитета в опухоли НМИРМП низкого и высокого злокачественного потенциала

По данным EAU (Европейского общества урологов) и NCCN, у больных с НМИРМП

высокого риска частота рецидивирования за первые 3 месяца после проведенного хирургического лечения достигает 45%, в связи с чем применяются комплексные подходы к лечению больных с НМИРМП [12]. В настоящее время актуальным является поиск маркеров, которые позволили бы с высокой степенью вероятности предсказать прогрессирование заболевания. С этой точки зрения, особенность внутриопухолевой инфильтрации ИКК может вносить существенный вклад в описываемые явления.

Выявлено, что в первичной ОП высокой степени злокачественности статистически значимо увеличивается лимфоидная инфильтрация, относительное количество ДП-, ДН- и В-лимфоцитов, данные показатели превышали соответствующие значения в случае опухолей низкой степени злокачественности на 41%, 33%, 47% и 98%.

На этом фоне обнаруживается значимое снижение относительного количества эффекторных клеток - CD8+ ЦТЛ, NK- и NKT-лимфоцитов лимфоцитов, число которых оказалось ниже, соответственно на 40%, 45% и 30%. Увеличение ЦТЛ на фоне отсутствия изменения содержания Т-лимфоцитов хелперов приводит к увеличению ИРИ на 102%, что также может указывать на соответствующий функциональный сдвиг в клетках адаптивного иммунитета, указывающий на снижение противоопухолевой активности.

Как было отмечено ранее, в обеих группах больных МНИРМП с опухолями низкого (1 группа) и высокого (2 группа) злокачественного потенциала наблюдали прогрессирование заболевания, что сопровождалось образованием рецидивной опухоли.

Обнаружено значимое увеличение относительного количества опухолеинфильтрирующих лимфоцитов, CD4+ Т-лимфоцитов хелперов, а также В-лимфоцитов, соответственно на 157%, 47% и 110%. На этом фоне содержание цитотоксических CD8+ и NK-лимфоцитов, а также ДП-лимфоцитов оказалось значимо ниже в HG-опухолях, соответственно на 54%, 62% и 30%. Выявлено увеличение ИРИ на 54% в первичной опухоли высокой степени агрессивности, что является отражением сдвига в соотношении клеток адаптивного иммунитета в сторону преобладания клеток с ингибиторным потенциалом над цитолитическими лимфоцитами.

Показано, что в опухолевой ткани высокой степени злокачественности наблюдается значительное увеличение лимфоидной инфильтрации, что сопровождается увеличением количества хелперно-индукторных CD4+ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, соответственно на 232%, 102% и 120% (табл. 2). В то же время статистически значимым оказалось снижение ЦТЛ CD8+ клеток, а также ДП- и ДН-лимфоцитов, количество которых в опухоли больных второй группы превышало значения в первой, соответственно на 34%, 33% и 47%. Обнаруженные изменения инфильтрации опухолей высокой степени злокачественности могут указывать на то, что развитие рецидива сопровождается выраженным нарушением процессов созревания Т-

лимфоцитов, главным образом с цитотоксической функцией. Дисбаланс в соотношении CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов находит отражение в статистически значимом увеличении ИРИ на 300% у пациентов с НМИРМП высокой степени злокачественности.

Обращает на себя внимание также факт снижения инфильтрации HG опухоли цитотоксическими клетками врожденного иммунитета – выявлено снижение относительного числа как NKT-, так и NK-лимфоцитов, соответственно на 76% и 62% (табл. 2).

Данные, полученные ранее нами, а также другими исследователями, свидетельствуют о том, что иммунное микроокружение опухолей во многом способствует их прогрессированию, среди вариантов которого – метастазирование и рецидивирование. Последнее нередко рассматривается как хирургическая проблема, возникающая в связи с нерадикальностью операции. Однако накапливается все больше данных о том, что в рецидивировании участвует ряд клеточных факторов, таких как ОСК, а также клетки иммунного микроокружения. Так, в обзоре Yan Chen et al. (2022), представляющем собой метаанализ работ последних лет по изучению роли микроокружения в рецидивировании рака желудка, подчеркивается роль высокого количества CD8+, CD4+Tm, NK-лимфоцитов, макрофагов M1 и низкого содержания макрофагов M2, Tregs лимфоцитов, тучных клеток для длительной безрецидивной выживаемости больных [13].

Кроме этих клеток, в процессе рецидивирования могут играть роль некоторые минорные субпопуляции Т-лимфоцитов, в частности ДП и ДН. В результате исследования содержания уровня ДП Т-лимфоцитов в крови больных с урологическими раками, включая РМП, установлено повышение уровня этих клеток, а также их гетерогенность, представленная CD4^{high}CD8^{low} и CD4⁺CD8^{high} ДП субпопуляциями с Tem фенотипом и относящихся к Th2 [14].

Большое внимание привлекают к себе также ДН Т-клетки. В обзоре Zhiheng Wu et al. (2022), суммированы сообщения о разнонаправленных эффектах этих клеток на опухолевый рост – от стимуляции до антиген-независимого цитолиза и возможности использования их для адаптивной иммунотерапии [15]. При этом отмечается их фенотипическая и функциональная гетерогенность, а также изменение их активности в микроокружении опухоли [16]. Описанное в нашей работе обнаружение значительного содержания ДН Т-лимфоцитов в ткани рецидива НМИРМП подтверждает это, как и ранее полученные нами подобные результаты при изучении факторов локального иммунитета у больных саркома мягких тканей [17]. Кроме того, известно, что NKT-клетки, особенно 2-го типа, обладают иммуносупрессивным действием [18], и обнаружение их высокого содержания в ткани рецидива НМИРМП может характеризовать его более агрессивное течение.

Заключение

Итак, полученные данные говорят о том, что состав клеточных факторов локального иммунитета при НМИРМП различается в зависимости от степени злокачественности опухоли (в HG он более неблагоприятен, чем в LG), а также между нерецидивирующими и рецидивирующими опухолями (в последних он более неблагоприятен).

Интересной находкой оказалось то, что и в самих рецидивах найдены различия по содержанию лимфоцитарных субпопуляций в зависимости от того, из опухолей какой степени злокачественности они происходят. Общее для рецидивов обоих вариантов снижение уровня цитолитических клеток адаптивного иммунитета при нарастании врожденных характеризует их сниженную способность распознавать опухолевые антигены, представленные через МНС1. Если экспрессия данной молекулы в опухолевых клетках сохранна, что наблюдается обычно в высокодифференцированных опухолях, то это может объяснить один из иммунологических механизмов их рецидивирования. В качестве других возможных механизмов мы рассматриваем дисбаланс NK и NKT-клеток и значительное возрастание уровня ДН Т-лимфоцитов в ткани рецидива при снижении присутствия CD4⁺ и CD8⁺ клеток. Представляет несомненный интерес сравнительная характеристика клинического течения рецидивов у больных этих групп, которая, возможно, позволит выявить клинически и прогностически значимые различия.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания по теме «Разработка прогностических и предиктивных алгоритмов на основе выявления новых иммунологических и молекулярно-генетических характеристик злокачественных опухолей и их микроокружения», рег. №121031100251-9.

Список литературы

1. IARC, Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. [Электронный ресурс]. URL: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf> (дата обращения: 10.08.2022).
2. Белякова Л. И., Шевченко А. Н., Сагалянц А. Б., Филатова Е. В. Маркеры рака мочевого пузыря: их роль и прогностическая значимость (обзор литературы) // Онкоурология. 2021. №.17(2). С.145–56. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-2-145-156.
3. Кит О.И., Франциянц Е.М., Димитриади С.Н., Шевченко А.Н., Каплиева И.В., Трипитаки Л.К. Экспрессия маркеров неоангиогенеза и фибринолитической системы в динамике экспериментальной ишемии почки у крыс // Экспериментальная и клиническая урология. 2015. №(1). С.20-23.
4. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ

«НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 239 с.

5. Witjes, J. A. et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines. Eur. Urol. 2020. DOI: 10.1016/j.eururo.2020.03.055.
6. Ковылина М.В., Прилепская Е.А., Тупикина Н.В., Цыбуля О.А., Рева И.А. Новое в стадировании уротелиальной карциномы мочевого пузыря // Онкоурология. 2017. №13(2). С.87-95. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-2-87-95.
7. Министерство здравоохранения Российской федерации. Клинические рекомендации «Рак мочевого пузыря». [Электронный ресурс]. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/11_2 (дата обращения: 10.08.2022).
8. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) // Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
9. Сагакянц А.Б. Объединенный иммунологический форум: современные направления развития фундаментальной и прикладной онкоиммунологии (Новосибирск, 2019) // Южнороссийский онкологический журнал. 2020. Т. 1. № 2. С. 36-45.
10. Schreiber R.D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 2011. vol. 331. P. 1565–1570.
11. Новик А.В., Проценко С.А., Балдуева И.А. Использование оценки состояния адаптивной иммунной системы у больных со злокачественными солидными опухолями в качестве предиктивных или прогностических факторов: систематический обзор // Эффективная фармакотерапия. 2020. Т. 16. № 33. С. 58-75. DOI 10.33978/2307-3586-2020-16-33-58-75.
12. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, 2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://uroweb.org/eau-guidelines/citing-usage-republication> (дата обращения: 10.08.2022).
13. Chen Y, Sun Z, Wan L, Chen H, Xi T and Jiang Y (2022) Tumor Microenvironment Characterization for Assessment of Recurrence and Survival Outcome in Gastric Cancer to Predict Chemotherapy and Immunotherapy Response. Front. Immunol. 13:890922. DOI: 10.3389/fimmu.2022.890922.
14. Bohner, P., Chevalier, M. F., Cesson, V., Rodrigues-Dias, S. C., Dartiguenave, F., Burruni, R., Tawadros, T., Valerio, M., Lucca, I., Nardelli-Haeffliger, D., Jichlinski, P., & Derré, L. Double Positive CD4⁺CD8⁺ T Cells Are Enriched in Urological Cancers and Favor T Helper-2 Polarization. Frontiers in immunology. 2019. Vol.10, 622. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00622.
15. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H and Yao J. CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (Double-

- Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front. Immunol.* 2022. 13:816005. DOI: 10.3389/fimmu.2022.816005.
16. Fang, L., Ly, D., Wang, S. S., Lee, J. B., Kang, H., Xu, H., Yao, J., Tsao, M. S., Liu, W., & Zhang, L. Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 2019. Vol.38(1), 123. DOI: 10.1186/s13046-019-1126-y.
17. Златник Е.Ю., Непомнящая Е.М., Новикова И.А., Алиев Т.А., Закора Г.И., Селютина О.Н., Ващенко Л.Н., Андрейко Е.А., Аушева Т.В., Бондаренко Е.С. Характеристика факторов локального иммунитета у больных саркомами мягких тканей // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24621> (дата обращения: 10.08.2022).
18. Terabe M., Berzofsky J.A. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*. 2018. Vol.9. P.1838. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01838.