

## ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С НЕИНВАЗИВНО-МЫШЕЧНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

А. Б. Сагалянц<sup>1</sup>, Л. И. Белякова<sup>1✉</sup>, А. Н. Шевченко<sup>1</sup>, Е. С. Бондаренко<sup>1</sup>, Е. Ю. Златник<sup>1</sup>, И. А. Новикова<sup>1</sup>, Е. В. Филатова<sup>1</sup>, В. К. Хван<sup>1</sup>, И. А. Хомутенко<sup>1</sup>, Д. В. Бурцев<sup>2</sup>

1. НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

2. Областной консультативно-диагностический центр, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ [drlbelyakova@yandex.ru](mailto:drlbelyakova@yandex.ru)

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Изучить особенности локального распределения популяций клеток иммунной системы у пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря различной степени злокачественности.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 51 пациент с впервые выявленным немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (гистологическая верификация папиллярной уротелиальной карциномы), после комплексного лечения и динамического наблюдения в течение 9 мес. в онкоурологическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Пациенты были распределены на две группы: 1 группа – с опухолью низкого злокачественного потенциала (Low grade – LG),  $n = 31$ ; 2 группа – с опухолью высокого злокачественного потенциала (High grade – HG),  $n = 20$ . Через 6–9 мес. у 24 пациентов был диагностирован рецидив заболевания – в 48,4 % у пациентов 1 группы ( $n = 15$ ) и в 45 % – 2 группы ( $n = 9$ ). В клеточных суспензиях, полученных из первичной и рецидивной опухоли, а также перифокальной зоны с использованием проточной цитометрии, оценивали относительное содержание иммунокомпетентных клеток. Проводили сравнение содержания отдельных популяций лимфоцитов в ткани опухоли, перифокальной зоны первичных и рецидивных образований различной степени злокачественности. Статистическая обработка выполнялась с использованием Statistica 13.0.

**Результаты.** Развитие рецидивной опухоли низкого злокачественного потенциала сопровождается привлечением в её микроокружение клеток врожденного иммунитета (NK- и NKT-лимфоцитов), что сопряжено с дисбалансом в количестве основных клеток адаптивного иммунитета – отмечено достаточно выраженное снижение в опухоли Т-лимфоцитов хелперно-индукторного типа при неизменном содержании цитотоксических Т-лимфоцитов, а также разнонаправленном характере изменения ДП- (снижение) и ДН-лимфоцитов (увеличение). Особенностью развития рецидивной опухоли высокого злокачественного потенциала является то, что оно сопровождается привлечением в её микроокружение клеток врожденного иммунитета (NK- и NKT-лимфоцитов), а также разнонаправленным изменением ДП- (снижение) и ДН-лимфоцитов (увеличение).

**Заключение.** Проведенные исследования популяционного состава опухолей, так и их перифокальных тканей немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря позволили выявить особенности, отражающиеся в перераспределении цитолитических клеток, формированием иммуносупрессивных условий, отражающихся как на проявлении биологических свойств опухолевых клеток, так и на изменении клеточного состава тканей мочевого пузыря, вовлеченного в процесс развития и прогрессирования онкологического заболевания.

### Ключевые слова:

рак мочевого пузыря, немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, локальный клеточный иммунитет, лимфоциты, рецидив

### Для корреспонденции:

Белякова Любовь Игоревна – аспирант, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

E-mail: [drlbelyakova@yandex.ru](mailto:drlbelyakova@yandex.ru)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7955-3473>

SPIN: 3382-8559, AuthorID: 1080471

ResearcherID: AAN-7729-2020

**Финансирование:** 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.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Для цитирования:

Сагалянц А. Б., Белякова Л. И., Шевченко А. Н., Бондаренко Е. С., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Филатова Е. В., Хван В. К., Хомутенко И. А., Бурцев Д. В. Особенности локального иммунитета у пациентов с неинвазивно-мышечным раком мочевого пузыря различной степени злокачественности. Южно-Российский онкологический журнал. 2022; 3(4): 58-66. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2022-3-4-6>

Статья поступила в редакцию 08.08.2022; одобрена после рецензирования 15.10.2022; принята к публикации 12.12.2022.

© Сагалянц А. Б., Белякова Л. И., Шевченко А. Н., Бондаренко Е. С., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Филатова Е. В., Хван В. К., Хомутенко И. А., Бурцев Д. В., 2022

## LOCAL IMMUNITY FEATURES IN PATIENTS WITH NON-INVASIVE MUSCULAR BLADDER CANCER OF VARIOUS DEGREES OF MALIGNANCE

A. B. Sagakyants<sup>1</sup>, L. I. Belyakova<sup>1✉</sup>, A. N. Shevchenko<sup>1</sup>, E. S. Bondarenko<sup>1</sup>, E. Yu. Zlatnik<sup>1</sup>, I. A. Novikova<sup>1</sup>, E. V. Filatova<sup>1</sup>, V. K. Hvan<sup>1</sup>, I. A. Khomutenko<sup>1</sup>, D. V. Burtsev<sup>2</sup>

1. National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

2. Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ [drlbelyakova@yandex.ru](mailto:drlbelyakova@yandex.ru)

### ABSTRACT

**Purpose of the study.** To study the features of the local distribution of populations of immune system cells in patients with non-invasive muscular bladder cancer of various degrees of malignancy.

**Materials and methods.** The study included 51 patients with newly diagnosed non-muscle-invasive bladder cancer (papillary urothelial carcinoma) who received complex treatment and follow-up after 9 months at the oncological department of the National Medical Research Center of Oncology. Patients were divided into two groups: group 1 – with a tumor of low malignant potential (Low grade – LG),  $n = 31$ ; group 2 – with a tumor of high malignant potential (High grade – HG),  $n = 20$ . After 6–9 months, 24 patients were diagnosed with a relapse of the disease – in 48,4 % in patients of group 1 ( $n = 15$ ) and in 45 % – in group 2 ( $n = 9$ ). In cell suspensions obtained from the primary and recurrent tumors, as well as the perifocal zone, the relative number of populations of immunocompetent cells was estimated using flow cytometry. A comparison was made of the content of individual populations of lymphocytes in the tumor tissue, the perifocal zone of primary and recurrent lesions of various degrees of malignancy. Statistical processing was performed using Statistica 13.0.

**Results.** The development of a recurrent tumor of low malignant potential is accompanied by the involvement of cells of innate immunity (NK- and NKT-lymphocytes) into its microenvironment, which is associated with an imbalance in the number of main cells of adaptive immunity – a fairly pronounced decrease in the tumor of T-lymphocytes of the helper-inductor type was noted with a constant content cytotoxic T-lymphocytes, as well as the multidirectional nature of changes in DP- (decrease) and DN-lymphocytes (increase). A feature of the development of a recurrent tumor of high malignant potential is that it is accompanied by the involvement of innate immunity cells (NK- and NKT-lymphocytes) into its microenvironment, as well as multidirectional changes in DP- (decrease) and DN-lymphocytes (increase).

**Conclusion.** Studies of the population composition of tumors and their perifocal tissues of NMIBC revealed a number of features that are reflected in the redistribution of cytolytic cells, the formation of immunosuppressive conditions, which are reflected both in the manifestation of the biological properties of tumor cells and in changes in the cellular composition of bladder tissues involved in the process. development and progression of cancer.

### Keywords:

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

### For correspondence:

Lyubov I. Belyakova – PhD student, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: [drlbelyakova@yandex.ru](mailto:drlbelyakova@yandex.ru)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7955-3473>

SPIN: 3382-8559, AuthorID: 1080471

ResearcherID: AAH-7729-2020

**Funding:** the study was performed as part of the state assignment on the topic «Development of prognostic and predictive algorithms based on the identification of new immunological and molecular genetic characteristics of malignant tumors and their microenvironment», reg. No. 121031100251-9.

**Conflict of interest:** authors report no conflict of interest.

### For citation:

Sagakyants A. B., Belyakova L. I., Shevchenko A. N., Bondarenko E. S., Zlatnik E. Yu., Novikova I. A., Filatova E. V., Hvan V. K., Khomutenko I. A., Burtsev D. V. Local immunity features in patients with non-invasive muscular bladder cancer of various degrees of malignancy. South Russian Journal of Cancer. 2022; 3(4): 58-66. (In Russ.). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2022-3-4-6>

The article was submitted 08.08.2022; approved after reviewing 15.10.2022; accepted for publication 12.12.2022.

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Согласно последним данным GLOBOCAN, на злокачественные новообразования (ЗНО) мочевого пузыря приходится 3 % всех диагнозов рака в мире, высокая распространенность наблюдается в развитых странах [1]. По данным мировой статистики продолжает занимать 10 строчку в структуре общей онкологической заболеваемости [2]. Почти 75 % уротелиальных карцином являются неинвазивными карциномами с высокой частотой рецидива заболевания после хирургического лечения без инфильтрации стенки мочевого пузыря или отдаленных метастазов, остальные 25 % – это мышечно-инвазивная форма рака мочевого пузыря, которая является высокоинвазивной и с наличием отдаленных метастазов [3]. Среди пациентов с поверхностными папиллярными поражениями обычно наблюдаются множественные рецидивы и только у 10–30 % из них развиваются инвазивные опухоли высокой степени злокачественности [4].

Диагностические методы оценки немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП), а также рецидива и прогрессирования, имеют ряд недостатков: низкую чувствительность и специфичность, поэтому существует необходимость в исследовании данного направления для осуществления более тщательной диагностики и выявлению злокачественных новообразований (ЗНО) на ранних этапах развития рецидива заболевания для адекватного и своевременного лечения и выбора тактики ведения больных [5].

Общепринятым в настоящее время является представление о том, что развитие опухолей различной локализации сопровождается нарушением антигенного гомеостаза организма человека, что, на определенных стадиях развития патологического процесса, закономерно вызывает активацию различных эффекторных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Дальнейшее развитие неоплазмы сопровождается сложным её взаимодействием с остальными анатомо-физиологическими структурами организма, через реализацию ряда стадий, изучение которых с целью выявления новых диагностических и прогностических маркеров является актуальной задачей современной онкоиммунологии [6].

Показано, что характер распределения и плотность иммунных клеток в опухоли отражают активность иммунной системы в отношении опухолевых

клеток. В данном контексте российскими и зарубежными авторами были изучены различные популяции иммунных клеток. Тесное взаимодействие клеток микроокружения между собой и с опухолевыми клетками приводит к изменению их фенотипа, экспрессии генов и изменения функциональной активности. Предыдущие исследования позволили выявить, что плотность Т-лимфоцитарной инфильтрации CD3-, CD8- или CD45RO-позитивными лимфоцитами имеет высокую прогностическую ценность в отношении различных опухолей. Так, Sharma P. и соавторы продемонстрировали лучшую безрецидивную выживаемость и общую выживаемость у 69 больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП) с высоким содержанием CD8+ лимфоцитов [7]. Кроме того, было показано, что высокие уровни внутриопухолевой инфильтрации CD3- и CD8-позитивными лимфоцитами предполагают лучшие результаты общей выживаемости среди пациентов с РМП [8].

Однако, несмотря на имеющуюся информацию по изучению роли отдельных клеток иммунной системы в развитии опухолей, в частности, РМП остается много неясного, в том числе особенности распределения иммунокомпетентных клеток (ИКК) между опухолью и её перифокальной зоной, что может вносить определенный вклад в характер развития патологического процесса и эффективность применяемых способов лечения. В связи с вышеизложенным, изучение роли локального распределения клеток иммунной системы является актуальной задачей для выявления новых потенциальных маркеров развития РМП и вероятности её рецидивирования.

**Цель исследования:** изучить особенности локального распределения популяций клеток иммунной системы у пациентов с неинвазивно-мышечным раком мочевого пузыря различной степени злокачественности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовались образцы тканей опухоли 51 пациента с впервые выявленным НМИРМП. После проведенного комплексного лечения в объеме: трансуретральная резекция мочевого пузыря + адьювантная внутривезикулярная химиотерапия № 6 (ТУР+ВПХТ) – за всеми больными было установлено динамическое наблюдение в течение 9 мес. после проведенного комплексного лечения. Согласно

результатам гистологического анализа, пациенты с папиллярной уротелиальной карциномой были распределены на две группы: 1 группа – с опухолью низкого злокачественного потенциала (Low grade – LG),  $n = 31$ ; 2 группа – с опухолью высокого злокачественного потенциала (High grade – HG),  $n = 20$ . Каждые 3 мес. больные проходили контрольное обследование, в том числе, цистоскопическое исследование мочевого пузыря, в результате которого через 6–9 мес. у 24 пациентов был диагностирован рецидив заболевания – в 48,4 % у пациентов 1 группы ( $n = 15$ ) и в 45 % – 2 группы ( $n = 9$ ).

От всех пациентов получено письменное согласие на участие в исследовании.

Всем больным с впервые выявленным НМИРМП в качестве лечения было рекомендовано комплексное лечение, основываясь на системе EORTC (Европейская организация по исследованию и лечению рака): ТУР+ВПХТ. Интраоперационно производился забор материала – фрагменты опухоли (ОП) и перифокальной зоны (ПЗ), а также аналогичный забор осуществлялся при выявлении рецидива заболевания, который зафиксирован у больных в течение 6–9 мес. динамического наблюдения. Препараты 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 $\mu$ m Medicons, США). Клетки осаждалась в рефрижераторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5702R (Eppendorf AG, Germany) при 250g в течение 5 минут. После удаления надосадочной жидкости, 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 FacsCantoll (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. Проводили сравнение содержания отдельных популяций лимфоцитов (общее количество лимфоцитов (CD45+ клетки, Лимф); CD45+CD3+ клетки (общие CD3+ лимфоциты); CD45+CD3+CD4+ клетки (Т-лимфоциты)

хелперы (Th)); CD45+CD3+CD8+ клетки (цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ)); CD45+CD3+CD4+CD8+ клетки (двойные позитивные лимфоциты, ДП); CD45+CD3+CD4-CD8- клетки (двойные негативные лимфоциты, ДН); CD45+CD16+CD56+ клетки (НК-лимфоциты); CD45+CD3+CD16+CD56+ клетки (NKT-лимфоциты); CD45+CD19+ клетки (В-лимфоциты)) в ткани опухоли, перифокальной зоны первичных и рецидивных образований различной степени злокачественности.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета Statistica 13 (StatSoft Inc., США). Оценивали характер распределения полученных данных с использованием критерия Шапиро–Уилка. Так как полученные результаты оценки определяемых параметров не подчинялись закону нормального распределения, они представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха – 25 и 75 процентиля (Me [LQ; UQ]). Достоверность отличий оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе характера развития опухолевого процесса, вероятности прогрессирования заболевания и особенностями локального иммунологического статуса особая роль отводится выявлению распределения отдельных популяций ИКК между собственно опухолевой тканью и её перифокальной зоной.

Результаты подобного сравнения при опухолях низкой степени злокачественности представлены на рисунках 1, 2, 3.

Из представленных результатов видно, что по сравнению с опухолью в перифокальной зоне наблюдается увеличение содержания ряда лимфоцитов: CD4+, CD45+CD3+CD4+CD8+, CD45+CD3+CD4-CD8- и CD45+CD19+ клеток, соответственно на 30 % (45,8 (41,9; 46,9) против 35,1 (33,7; 41,2),  $p = 0,048$ ), 133 % (0,7 (0,49; 1,4) против 0,3 (0,2; 0,5),  $p = 0,041$ ), 93 % (6,2 (5,9; 8,1) против 3,2 (2,4; 3,9),  $p = 0,042$ ) и 85 % (10,9 (7,5; 14,3) против 5,9 (2,8; 7,3),  $p = 0,035$ ). Обращает на себя внимание тенденция к снижению в ПЗ относительного количества CD8+ Т-лимфоцитов и CD45+CD16+CD56+, что указывает на их накоплении в опухолевой ткани (рис. 1).

В случае рассмотрения особенностей распределения ИКК между первичной ОП и её ПЗ у пациентов

с последующим развитием рецидива (группа первичных рецидивирующих), то в этом случае выявлено увеличение лимфоидной инфильтрации ПЗ по сравнению с ОП, что, вероятно реализуется за счёт увеличения клеток с потенциальной цитолитической активностью – CD8+, CD45+CD16+CD56+ лимфоцитов

(рис. 2). Указанные показатели оказались выше в ПЗ по сравнению с ОП на 130 % (38,2 (24,2; 47,9) против 16,6 (8,8; 21,1),  $p = 0,037$ ), 23 % (50,4 (53,9; 67,6) против 41,0 (37,2; 44,9),  $p = 0,048$ ) и 316 % (20,8 (12,4; 25,8) против 5,0 (3,9; 7,3),  $p = 0,028$ ). На этом фоне выявлено значимое снижение в ПЗ с их вероятной аккумуляцией

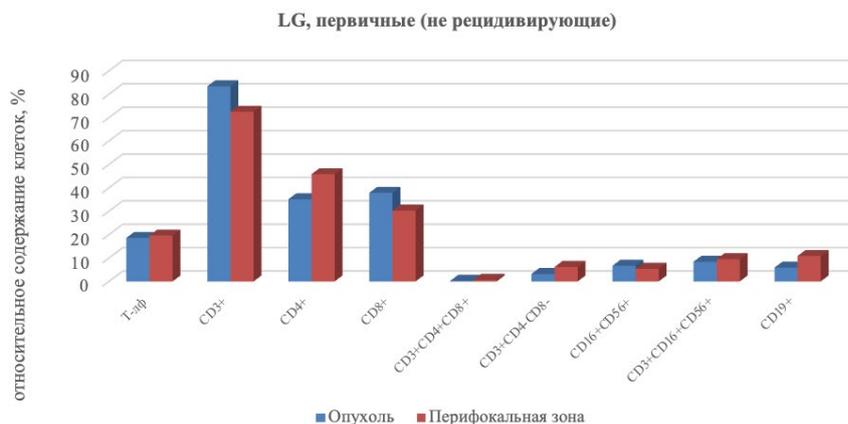


Рис. 1. Процентное содержание ИКК в опухоли и перифокальной зоне больных НМИРМП низкой степени злокачественности, 1 группа (LG) первичные (не рецидивирующие). Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

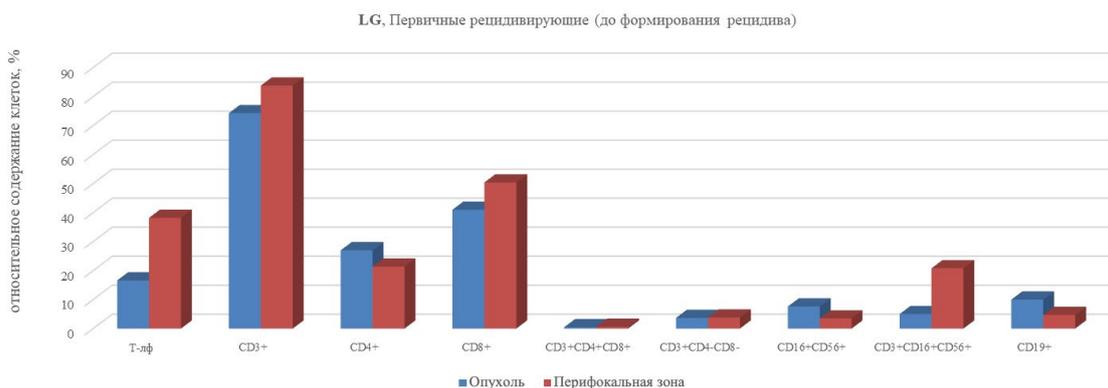


Рис. 2. Процентное содержание ИКК в опухоли и перифокальной зоне больных НМИРМП низкой степени злокачественности, 1 группа (LG) первичные рецидивирующие (до формирования рецидива). Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

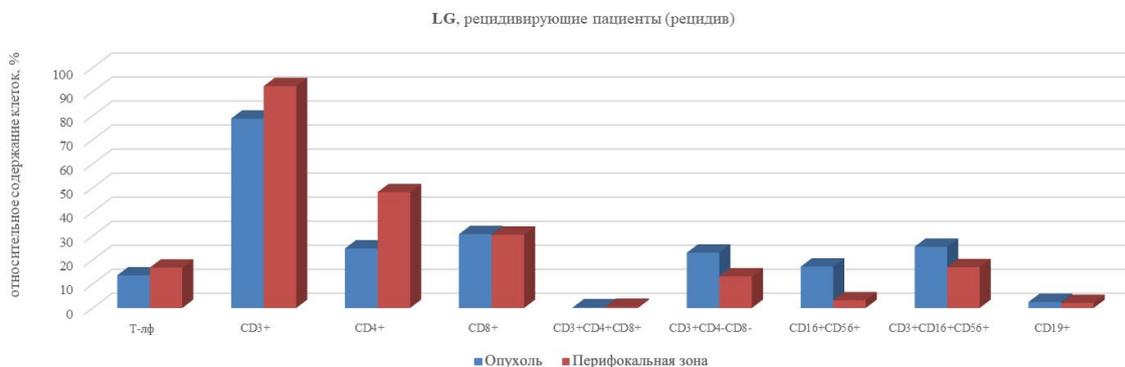


Рис. 3. Процентное содержание ИКК в опухоли и перифокальной зоне больных НМИРМП низкой степени злокачественности, 1 группа (LG) – рецидивирующие пациенты (рецидив). Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

муляцией в опухоли содержание CD45+CD16+CD56+ и CD45+CD19+ клеток (рис. 2). Данные показатели в ПЗ оказались ниже значений в опухоли на 54 % (3,5 (2,3; 4,5) против 7,6 (5,8; 10,2),  $p = 0,035$ ) и 53 % (4,7 (3,9; 8,3) против 10,0 (7,9; 17,2),  $p = 0,042$ ).

Вероятно, в условиях повышения вероятности образования в дальнейшем рецидива, наблюдается перераспределение ИКК между тканью опухоли и перифокальной зоны с увеличением в последней лимфоцитарной инфильтрации, CD8+ и CD45+CD3+CD16+CD56+, а также снижением CD4+, CD45+CD19+ и CD45+CD16+CD56+ клеток. При этом выявляется разнонаправленный характер распределения эффекторных клеток врожденного иммунитета – в опухоли накапливаются NK-лимфоциты, в то время как NKT-лимфоциты сосредотачиваются в перифокальной зоне.

Анализ полученных результатов определения особенностей распределения ИКК в рецидивной опухоли и её перифокальной зоны позволил выявить следующее (рис. 3).

При развитии рецидива в ПЗ опухоли наблюдается накопление CD4+ и CD45+CD3+CD4+CD8+ клеток, содержание которых превышало значения в ОП на 94 % (48,2 (40,3; 56) против 24,8 (16,1; 33,4),  $p = 0,021$ ) и 67 % (0,5 (0,41; 0,75) против 0,3 (0,25; 0,35),  $p = 0,045$ ). На фоне отмеченных изменений в ПЗ обнаружено снижение количества CD45+CD3+CD4-CD8- (ДН-лимфоцитов) и эффекторных клеток врожденного иммунитета – NK- и NKT-лимфоцитов, которые накапливаются в опухоли. Указанные параметры в ПЗ были ниже чем в ОП на 43 % (13,1 (8; 18,2) против 23,0 (18,5; 30),  $p = 0,046$ ), 81 % (3,2 (2,6; 3,7) против 17,2 (10; 24,3),  $p = 0,033$ ) и 33 % (17,0 (12; 21,9) против 25,5 (20,4; 30,5),  $p = 0,037$ ).

Таким образом, развитие рецидивной опухоли низкого злокачественного потенциала сопровождается привлечением в её микроокружение клеток врожденного иммунитета (NK- и NKT-лимфоцитов), что сопряжено с дисбалансом в количестве основных клеток адаптивного иммунитета – отмечено достаточно выраженное снижение в опухоли Т-лимфоцитов хелперно-индукторного типа при неизменном содержании цитотоксических Т-лимфоцитов, а также разнонаправленном характере изменения ДП- (снижение) и ДН-лимфоцитов (увеличение).

Результаты сравнения распределения популяций ИКК между ПЗ и ОП при опухолях мочевого пузыря высокой степени злокачественности представлены на рисунках 4, 5, 6.

Из представленных результатов видно, что по сравнению с опухолью в перифокальной зоне наблюдается увеличение содержания ряда лимфоцитов: CD8+, CD45+CD3+CD4+CD8+, CD45+CD16+CD56+ и CD45+CD3+CD16+CD56+ клеток, соответственно на 50 % (33,9 (27,1; 49,3) против 22,6 (16,4; 25,8),  $p = 0,026$ ), 350 % (1,8 (1,4; 3,6) против 0,4 (0,25; 1,45),  $p = 0,008$ ), 92 % (7,1 (4,9; 14,3) против 3,7 (2,6; 5,5),  $p = 0,031$ ) и 134 % (13,8 (10,6; 20,3) против 5,9 (3,4; 6,6),  $p = 0,017$ ). Выявлено снижение в ПЗ относительного количества CD4+ и CD45+CD19+ клеток, соответственно на 26 % (29,6 (16,8; 33,3) против 39,8 (35,4; 47,9),  $p = 0,045$ ) и 50 % (5,9 (2,5; 7,3) против 11,7 (10,5; 16,4),  $p = 0,042$ ), что указывает на их накопление в опухолевой ткани (рис. 4).

В случае рассмотрения особенностей распределения ИКК между первичной ОП и её ПЗ у пациентов с последующим развитием рецидива (группа первичных рецидивировующих), то в этом случае выявлено увеличение инфильтрации ПЗ по сравнению с ОП основными популяциями адаптивного и врожденного иммунитета (рис. 5). В ПЗ оказалось статистически значимо по сравнению с ОП содержание CD4+, CD8+ и CD45+CD3+CD4+CD8+ клеток, а также CD45+CD16+CD56+ и CD45+CD3+CD16+CD56+ клеток, соответственно на 26 % (50,0 (49; 51,6) против 39,8 (30,6; 48,2),  $p = 0,037$ ), 51 % (28,3 (27,9; 28,7) против 18,7 (12,7; 26,6),  $p = 0,046$ ), 57 % (0,55 (0,52; 0,57) против 0,35 (0,23; 0,43),  $p = 0,047$ ), а также на 117 % (6,3 (4,8; 9,3) против 2,9 (2,1; 4,7),  $p = 0,041$ ) и 52 % (6,4 (6,2; 8,6) против 4,2 (2,9; 5,1),  $p = 0,043$ ). На этом фоне выявлено значимое снижение в ПЗ с их вероятной аккумуляцией в опухоли содержание В-лимфоцитов. Данные показатели в ПЗ оказались ниже значений в опухоли на 46 % (11,4 (11,1; 19,3) против 21,0 (18,9; 30),  $p = 0,044$ ).

Вероятно, в условиях повышения вероятности образования в дальнейшем рецидива, наблюдается перераспределение ИКК между тканью опухоли и перифокальной зоны с увеличением в последней клеток адаптивного и врожденного иммунитета, потенциально обладающих цитолитической активностью, а также снижением количества В-лимфоцитов.

Анализ полученных результатов определения особенностей распределения ИКК в рецидивной опухоли и её перифокальной зоны позволил выявить следующее (рис. 6).

При развитии рецидива в ПЗ опухоли наблюдается накопление CD45+CD3+CD4+CD8+ клеток и CD45+CD19+ клеток, содержание которых превыша-

ло значения в ОП на 50 % (0,3 (0,25; 0,39) против 0,2(0,1; 0,24),  $p = 0,047$ ) и 396 % (27,3 (15,1; 32,4) против 5,5 (3,7; 6,05),  $p = 0,005$ ). На фоне отмеченных изменений в ПЗ обнаружено снижение количества общей лимфоидной инфильтрации, а также CD45+CD3+CD4-CD8- (ДН-лимфоцитов) и эффекторных клеток врожденного имму-

нитета – CD45+CD3+CD16+CD56+ (NKT-лимфоцитов), которые накапливаются в опухоли. Казанные параметры в ПЗ были ниже, чем в ОП на 54 % (20,8 (12,4; 29,2) против 45,2 (32; 48,7),  $p = 0,044$ ), 88 % (1,5 (1,1; 3,5) против 12,2 (7,0; 15,3),  $p = 0,039$ ) и 42 % (3,6 (2,1; 3,7) против 6,2 (3,6; 6,1),  $p = 0,042$ ).

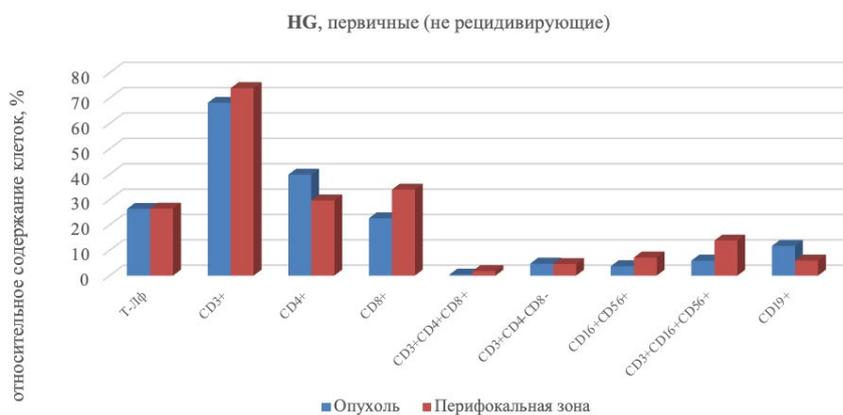


Рис. 4. Процентное содержание ИКК в опухоли и перифокальной зоне больных НМИРМП низкой степени злокачественности, 2 группа (HG) первичные (не рецидивирующие). Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

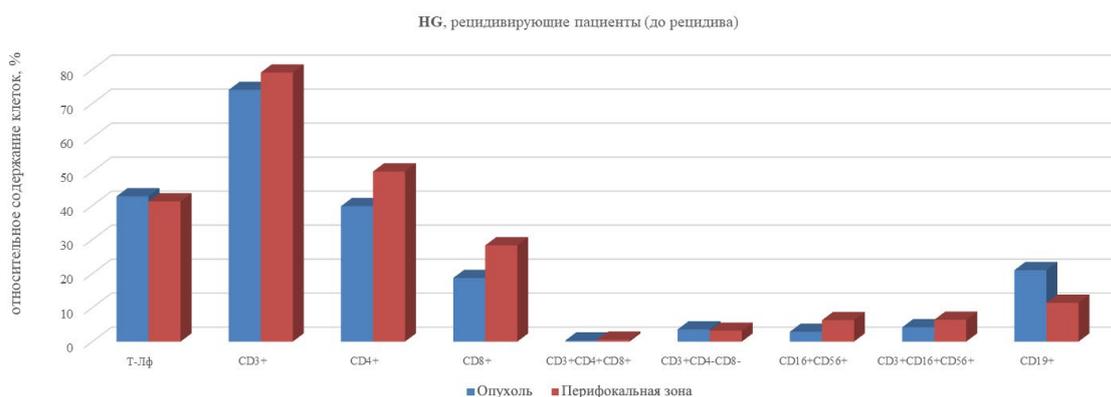


Рис. 5. Процентное содержание ИКК в опухоли и перифокальной зоне больных НМИРМП низкой степени злокачественности, 2 группа (HG) первичные рецидивирующие (до формирования рецидива). Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

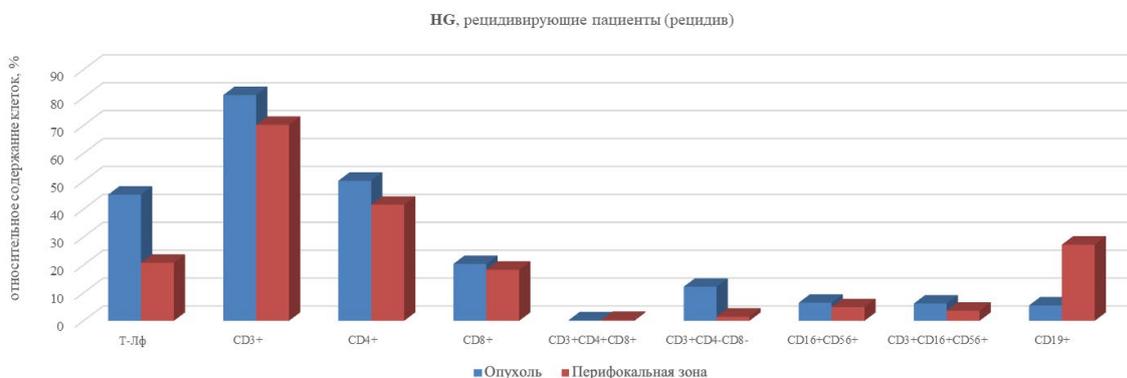


Рис. 6. Процентное содержание ИКК в опухоли и перифокальной зоне больных НМИРМП низкой степени злокачественности, 2 группа (HG) – рецидивирующие пациенты (рецидив). Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

Полученные ранее в нашей лаборатории данные, которые также согласуются с результатами аналогичных исследований, свидетельствуют о том, что иммунное микроокружение опухолей во многом способствует их прогрессированию, среди вариантов которого – метастазирование и рецидивирование [9]. Несмотря на то, что последнее нередко рассматривается как хирургическая проблема, возникающая в связи с нерадикальностью операции, накапливается все больше данных указывающих на то, что в рецидивировании участвует ряд клеточных факторов, таких как ОСК, а также клетки иммунного микроокружения. В частности, в обзоре Yan Chen и соавт. в 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 [10].

Предполагается, что в процессе рецидивирования могут играть важную роль некоторые минорные субпопуляции Т-лимфоцитов, в частности, ДП и ДН. По результатам исследования количества ДП Т-лимфоцитов в крови больных с опухолями урологической локализации, в том числе и РМП, установлено повышение уровня этих клеток, а также выявлена их гетерогенность, представленная

CD4highCD8low и CD4+CD8high ДП субпопуляциями с Тем фенотипом и относящихся к Th2 [11].

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 адоптивной иммунотерапии [12]. При этом отмечается их фенотипическая и функциональная гетерогенность, а также изменение их активности в микроокружении опухоли [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования популяционного состава опухолей, так и их перифокальных тканей НМИРМП позволили выявить некоторые особенности, которые характеризуются развитием рецидивной опухоли высокого злокачественного потенциала (HG) привлечением в её микроокружение клеток врожденного иммунитета (NK- и NKT-лимфоцитов), а также разнонаправленном характере изменения ДП- (снижение) и ДН-лимфоцитов (увеличение). Формирующиеся иммуносупрессивные условия отражаются как на проявлении биологических свойств опухолевых клеток, так и на изменении клеточного состава тканей мочевого пузыря, вовлеченного в процесс развития и прогрессирования онкологического заболевания.

## Список источников

1. Сальникова С. В., Славянская Т. А., Сепиашвили Р. И. Современные подходы к диагностике и прогнозированию течения уротелиального рака. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2018; 22(1):9–21. <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2018-22-1-9-21>
2. IARC, Cancer Today. Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. 2021. 2022. Доступно по: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>, Дата обращения: 30.10.2022.
3. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2022. ISBN 978-94-92671-16-5
4. Кит О. И., Шевченко А. Н., Комарова Е. Ф., Пакус Д. И., Максимов А. Ю. Влияние сопряжения полиморфизма генов матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов с активностью внеклеточного протеолиза компонентов базальной мембраны на раннее рецидивирование у больных поверхностным раком мочевого пузыря. Уральский медицинский журнал. 2015; 7(130):73–78.
5. Белякова Л. И., Шевченко А. Н., Сагакянц А. Б., Филатова Е. В. Маркеры рака мочевого пузыря: их роль и прогностическая значимость (обзор литературы). Онкоурология. 2021; 17(2):145–156. <https://doi.org/10.17650/17269776-2021-17-2-145-156>
6. Хакимова Г. Г., Трякин А. А., Заботина Т. Н., Хакимова Ш. Г. Комплексная оценка системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических показателей у больных раком желудка. Злокачественные опухоли. 2020; 10(4):5–15. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2020-10-4-5-15>
7. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjjatic S, Bajorin DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, Sato E. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 6; 104(10):3967–3972. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611618104>

8. Horn T, Laus J, Seitz AK, Maurer T, Schmid SC, Wolf P, et al. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol.* 2016 Feb; 34(2):181–187. <https://doi.org/10.1007/s00345-015-1615-3>
9. Златник Е. Ю., Непомнящая Е. М., Новикова И. А., Алиев Т. А., Загора Г. И., Селютина О. Н. и др. Характеристика факторов локального иммунитета у больных саркома ми мягких тканей. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 3:93. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24621>, Дата обращения: 30.10.2022.
10. Chen Y, Sun Z, Wan L, Chen H, Xi T, Jiang Y. Tumor Microenvironment Characterization for Assessment of Recurrence and Survival Outcome in Gastric Cancer to Predict Chemotherapy and Immunotherapy Response. *Front Immunol.* 2022 Apr 29; 13:890922. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.890922>
11. Bohner P, Chevalier MF, Cesson V, Rodrigues-Dias SC, Dartiguenave F, Burrini R, et al. Double Positive CD4+CD8+ T Cells Are Enriched in Urological Cancers and Favor T Helper-2 Polarization. *Front Immunol.* 2019 Mar 29; 10:622. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00622>
12. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol.* 2022 Feb 10; 13:816005. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>
13. Fang L, Ly D, Wang SS, Lee JB, Kang H, Xu H, et al. Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Mar 11; 38(1):123. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1126-y>

---

#### Информация об авторах:

Сагакянц Александр Борисович – к.б.н., доцент, заведующий лабораторией иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>, SPIN: 7272-1408, AuthorID: 426904, ResearcherID: M-8378-2019, Scopus Author ID: 24329773900

Белякова Любовь Игоревна – аспирант, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7955-3473>, SPIN: 3382-8559, AuthorID: 1080471, ResearcherID: AAN-7729-2020

Шевченко Алексей Николаевич – д.м.н., профессор, заведующий отделением онкоурологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-134X>, SPIN: 2748-2638, AuthorID: 735424, ResearcherID: Y-5387-2018, Scopus Author ID: 57192283096

Бондаренко Елена Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8522-1026>, SPIN: 3117-4040, AuthorID: 865798, Scopus Author ID: 57200132337

Златник Елена Юрьевна – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>, SPIN: 4137-7410, AuthorID: 327457, Scopus Author ID: 6603160432

Новикова Инна Арнольдовна – к.м.н., заместитель генерального директора по науке, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>, SPIN: 4810-2424, AuthorID: 726229, ResearcherID: E-7710-2018, Scopus Author ID: 7005153343

Филатова Елена Валерьевна – к.м.н., врач-онколог, научный сотрудник отделение онкоурологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7904-4414>, SPIN: 7517-1549, AuthorID: 794870, Scopus Author ID: 5719228349

Хван Виктор Кидюевич – к.м.н., врач-уролог отделения онкоурологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. SPIN: 2761-6281, AuthorID: 1033644

Хомутенко Ирина Анатольевна – к.м.н., врач-онколог, старший научный сотрудник отделения онкоурологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0003-8044>, SPIN: 5401-5810, AuthorID: 735408

Бурцев Дмитрий Владимирович – д.м.н., главный врач, ГАУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

---

#### Вклад авторов:

Сагакянц А. Б. – систематизация и анализ полученных данных, написание текста рукописи, консультация, итоговые выводы;

Белякова Л. И. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, сбор, систематизация и анализ полученных данных, написание текста рукописи, итоговые выводы;

Шевченко А. Н. – разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, консультация, итоговые выводы;

Бондаренко Е. С. – выполнение лабораторных исследований, анализ полученных данных;

Златник Е. Ю. – анализ полученных данных, консультация;

Новикова И. А. – анализ полученных данных, консультация;

Филатова Е. В. – сбор клинического материала, консультация;

Хван В. К. – сбор клинического материала;

Хомутенко И. А. – сбор клинического материала;

Бурцев Д. В. – консультация.