

## Изучение прогностической ценности клеток-эффекторов стромы переходноклеточных карцином мочевого пузыря

А.С. Аль-Шукри, И.А. Корнеев, С.Х. Аль-Шукри

Кафедра урологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

### STUDY OF THE PROGNOSTIC VALUE OF EFFECTOR CELLS OF THE STROMA OF TRANSITIONAL CELL BLADDER CARCINOMAS

A.S. Al-Shukri, I.A. Korneyev, S.Kh. Al-Shukri

Department of Urology, Acad. I.P. Pavlov Saint Petersburg State Medical University

*The prognostic value of number and composition of stromal effector cells in specimens removed during radical surgical treatment for transitional cell bladder carcinoma (Ta-4NxM0) was studied. Higher 5-year survival and less risk of recurrence corresponded to the lower count of effector cells ( $p = 0.007$ ): lymphocytes ( $p = 0.024$  and  $p = 0.057$ ) and segmented leukocytes ( $p = 0.037$  and  $p = 0.042$ ). In patients without progressive cancer, the independent predictors of 5-year survival were the degree of homogeneous mast cell distribution ( $p = 0.041$ ) and the count stromal lymphocytes ( $p = 0.070$ ) while in those with stage pTa-pT1, these were the number of segmented leukocytes ( $p = 0.009$ ) and lymphocytes ( $p = 0.025$ ) of the stroma ( $R^2 = 0.32$ ;  $p = 0.008$ ).*

Согласно современным представлениям, эффекторные механизмы противоопухолевого иммунитета отвечают за распознавание и ликвидацию мутировавших, обладающих неопластическим потенциалом клеток. Развитие новообразований сопровождается появлением у этих клеток антигенных свойств, вызывающих реакции иммунного ответа. Морфологическое проявление этих реакций — инфильтрация стромы опухоли и прилежащей к ней соединительной ткани свободными клетками-эффекторами [1]. Подсчет числа и анализ состава эффекторов стромы может служить дополнительным фактором, указывающим на принадлежность больных раком к группам риска прогрессирования заболевания [2].

В последние годы для переходноклеточного рака мочевого пузыря (РМП) были характерны высокие темпы ежегодного прироста заболеваемости. Большинство исследователей отмечали значимые различия выживаемости больных и частоты рецидивирования рака внутри подгрупп с одинаковой глубиной инвазии и степенью дифференцировки. Это затрудняет прогнозирование клинического течения болезни и выбор соответствующей тактики лечения [3, 4]. Проведено большое число исследований, направленных на поиск дополнительных факторов риска прогрессирования и рецидивирования РМП, однако мнения специалистов были неоднозначными, и универсальный прогностический критерий, который можно было бы рекомендовать для клинического применения, обнаружить не удалось. Одним из направлений изысканий в этой области явилось изучение стромальной инфильтрации карцином мочевого пузыря клетками-эффекторами. Выводы авторов опубликованных работ также оказались противоречивыми [5—7].

Данное исследование выполнено с целью изучения числа и состава клеток-эффекторов, инфильтрирующих строму карцином мочевого пузыря, сопоставления показателей их распределения с классическими морфологическими характеристиками новообразований — глубиной инвазии рака и степенью его дифференцировки, а также с рецидивирующим течением заболевания и выживаемостью больных в послеоперационном периоде.

#### Материалы и методы

В основу работы положен ретроспективный анализ материалов клинического обследования 60 больных с первично выявленными переходноклеточными карциномами мочевого пузыря (Ta—4NxM0), получивших радикальное хирургическое лечение. Соотношение мужчин и женщин 3:1, возраст — от 32 до 79 лет (в среднем  $63 \pm 1$  год). Минимальный размер опухолей составил 0,5 см, максимальный — 10 см, средний —  $3,7 \pm 2,3$  см. У 29 (48%) пациентов новообразования располагались в области мочепузырного треугольника, у 25 (48%) опухоль поражала боковые стенки и верхушку мочевого пузыря, у 16 (27%) пациентов обнаружены множественные опухоли. Больным с поверхностными карциномами выполняли трансуретральную резекцию стенки мочевого пузыря с опухолью, при инвазивном раке производили радикальную цистэктомию.

При гистологическом исследовании глубина инвазии рака pTa, pT1, pT2, pT3 и pT4 была определена у 9 (15%), 22 (37%), 14 (24%), 8 (13%) и 7 (11%) больных соответственно, а степень дифференцировки G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> и G<sub>3</sub> — в 39 (65%), 6 (10%) и 15 (25%) случаях.

В послеоперационном периоде все больные проходили регулярное контрольное обследование, после органосохраняющих вмешательств им выпол-

няли цистоскопии и цитологические исследования мочи. 5-летняя выживаемость без прогрессирования рака составила 63%, рецидивы в мочевом пузыре были обнаружены у 37 (62%) пациентов. Срок рецидивирования в среднем составил  $25 \pm 24$  мес.

**Приготовление препаратов.** Удаленную во время операции ткань фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. При гистологическом исследовании в соответствии с классификацией TNM [8] определяли стадию рака, а в соответствии с рекомендациями F. Mostofi и соавт. [9] оценивали степень дифференцировки опухолевых клеток.

Подсчет числа и идентификация клеток-эффекторов были произведены ув. 600. В 7 полях зрения определяли непосредственно прилежащие к опухоли участки соединительной ткани и подсчитывали свободные клетки стромы: лимфоциты, макрофаги, плазматические, тучные клетки, эозинофильные и нейтрофильные лейкоциты. Для каждого препарата рассчитывали следующие показатели распределения клеток-эффекторов: средние значения ( $M$ ), коэффициент вариации ( $CV$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ) и анализировали их связь с глубиной инвазии, степенью дифференцировки и рецидивированием рака, а также с выживаемостью больных без прогрессирования заболевания.

### Результаты

В табл. 1 приведены результаты подсчета стромальных клеток-эффекторов карцином мочевого пузыря; большую часть их составили лимфоциты.

Обнаружены зависимости между показателями распределения эффекторов, морфологическими характеристиками опухоли и клиническим течением заболевания. Так, общее число клеток в строме возрастало ( $p=0,057$ ) при нарастании глубины инвазии (рис. 1) рака. Несмотря на частичное совпадение значений, которое в основном наблюдалось в подгруппах больных раком с глубиной инвазии pT1 и pT3, эта закономерность была прослежена также между подгруппами пациентов с поверхностными опухолями pTa–pT1 и инвазив-

Таблица 1. Среднее количество клеток-эффекторов стромы в поле зрения у больных РМП

| Клетки-эффекторы стромы карцином мочевого пузыря | Среднее число клеток в поле зрения, $M \pm SD$ (%) |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Лимфоциты                                        | $61,9 \pm 35,6$ (75)                               |
| Макрофаги                                        | $10,0 \pm 11,7$ (12)                               |
| Плазматические клетки                            | $5,3 \pm 3,9$ (7)                                  |
| Тучные клетки                                    | $3,9 \pm 4,9$ (5)                                  |
| Эозинофильные лейкоциты                          | $0,9 \pm 1,8$ (0,9)                                |
| Сегментоядерные лейкоциты                        | $0,1 \pm 0,4$ (0,1)                                |
| Всего                                            | $82,1 \pm 45,2$ (100)                              |

ными карциномами pT2–pT3 ( $p=0,019$  и  $p=0,016$  соответственно). Тенденция к снижению числа стромальных эффекторов обнаружена в опухолях, получивших значительное местное распространение (pT4). По сравнению с папиллярными неинвазивными карциномами строма опухолей, врастающих в стенку мочевого пузыря (pT1 и pT2–3), содержала большее число лимфоцитов и макрофагов ( $p=0,020$ ,  $p=0,023$  и  $p=0,024$ ,  $p=0,068$  соответственно).

По сравнению с опухолями степени дифференцировки G2 инфильтрация эффекторами стромы высоко- и низкодифференцированных карцином оказалась несколько меньшей (рис. 2). При этом в строме высокодифференцированных опухолей были выявлены меньшие количества плазматических клеток и макрофагов ( $p<0,001$  и  $p=0,009$  соответственно), а в низкодифференцированных опухолях — большее число эозинофильных лейкоцитов ( $p=0,026$ ).

Обнаружены закономерности распределения клеток-эффекторов в строме новообразований различной локализации. При этом наибольшая степень стромальной инфильтрации была выявлена в опухо-

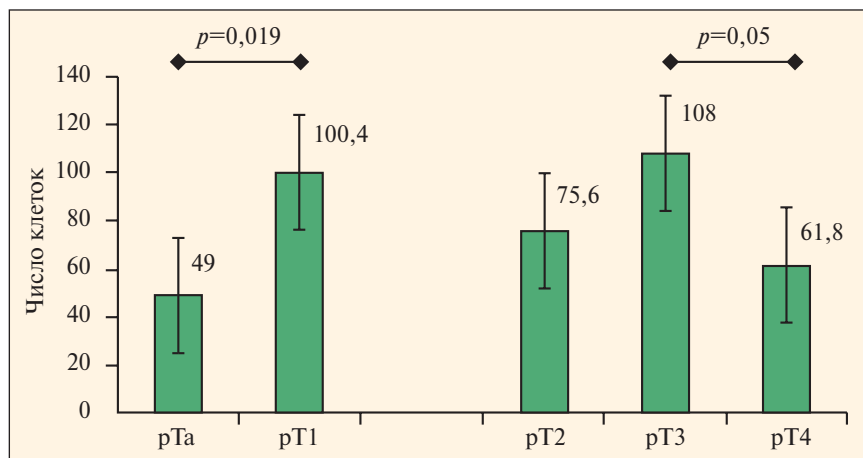


Рис. 1. Среднее количество клеток-эффекторов стромы карцином мочевого пузыря с различной глубиной инвазии ( $M \pm SEM$ )

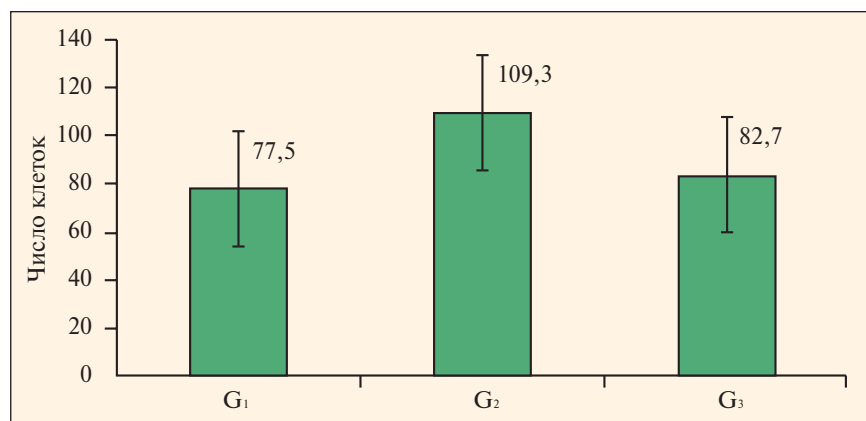


Рис. 2. Среднее количество клеток-эффекторов стромы карцином мочевого пузыря с различной степенью дифференцировки ( $M \pm SEM$ )

лях, расположенных на верхушке мочевого пузыря ( $p=0,016$ ). Кроме того, по сравнению с одиночными карциномами в строме множественных новообразований обнаружено большее число лимфоцитов ( $p=0,031$ ).

Большая степень инфильтрации стромы макрофагами была характерна для новообразований большего размера ( $p=0,062$ ) и несколько чаще наблюдалась у больных старшего возраста ( $p=0,080$ ).

Рецидивирующее течение поверхностного РМП чаще наблюдали у больных с опухолями, в строме которых было выявлено большее число лимфоцитов ( $p=0,057$ ) и меньшее количество сегментоядерных лейкоцитов ( $p=0,042$ ).

Меньшая инфильтрация стромы эффекторами, а также лимфоцитами, макрофагами, эозинофильными и сегментоядерными лейкоцитами ( $p=0,007$ ,  $p=0,024$ ,  $p=0,091$ ,  $p=0,064$  и  $p=0,037$  соответственно) обнаружена в новообразованиях больных, проживших после операции 5 лет без прогрессирования рака при сравнении с опухолями умерших за это время

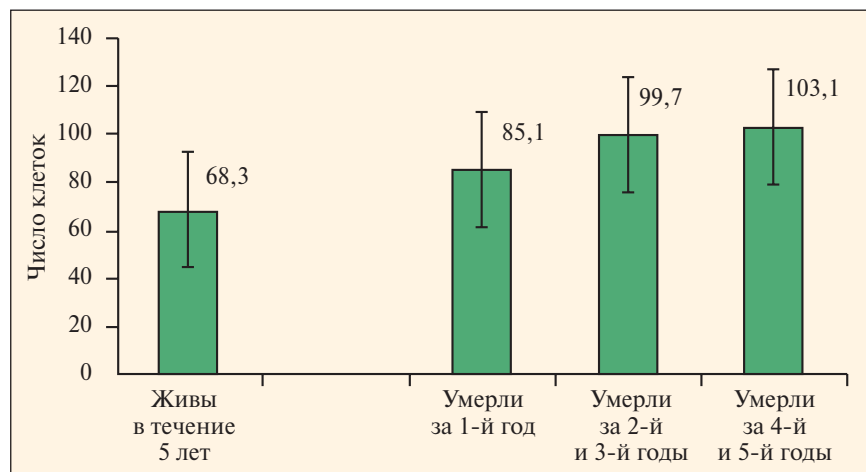


Рис. 3. Среднее количество клеток-эффекторов стромы карцином мочевого пузыря в зависимости от продолжительности жизни больных в течение 5-летнего периода послеоперационного наблюдения ( $M \pm SEM$ )

пациентов. При этом среди пациентов, умерших в течение пяти лет после операции от прогрессирования рака, более выраженная клеточная инфильтрация стромы опухоли соответствовала большей продолжительности жизни (рис. 3). Меньшее число эффекторов — сегментоядерных лейкоцитов — при поверхностных карциномах мочевого пузыря соответствовало большей вероятности 5-летней выживаемости без прогрессирования ( $p=0,042$ ). Кроме того, новообразования, имеющие большую стромальную

инфильтрацию лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами, чаще рецидивировали ( $t=1,94$ ;  $p=0,057$  и  $t=2,32$ ;  $p=0,030$  соответственно).

При помощи множественного регрессионного анализа было установлено, что категория рТ является ведущим фактором прогноза продолжительности жизни ( $p=0,0002$ ), а достоверность ее связи с дифференцировкой рака не достигает пороговой величины ( $p>0,1$ ). При этом связи между 5-летней выживаемостью больных без прогрессии, числом лимфоцитов ( $p=0,070$ ) и однородностью распределения ( $SD$ ) тучных клеток ( $p=0,041$ ) опухолевой стромы не зависели ни от глубины инвазии, ни от степени дифференцировки РМП. Кроме того, оказалось, что у пациентов с поверхностными карциномами рТ<sub>a</sub>—рТ<sub>1</sub> подсчет числа сегментоядерных лейкоцитов ( $p=0,009$ ) и лимфоцитов ( $p=0,025$ ) стромы позволяет определять принадлежность к группе низкого риска смерти от прогрессирования рака с большей достоверностью и точностью ( $R^2=0,32$ ;  $F=6,28$ ;  $p=0,008$ ), чем определение его глубины инвазии и степени дифференцировки ( $R^2=0,29$ ;  $F=4,81$ ;  $p=0,022$ ). Для этого было предложено следующее выражение, полученное при помощи дискриминантного анализа и позволяющее рассчитывать вероятность 5-летней выживаемости без прогрессирования РМП ( $P$ ):

$P = (1,68 \times \text{СЛ} + 0,02 \times \text{Л}) \times 100\%$ ,  
где СЛ и Л — средние количества сегментоядерных лейкоцитов и лимфоцитов соответственно в строме карцином мочевого пузыря при исследовании 7 полей зрения с ув. 600. Благоприятные и неблагоприятные значения входящих в выражение признаков отражены в табл. 2, из кото-

рой следует, что большая вероятность 5-летней выживаемости соответствует меньшей плотности распределения стромальных эффекторов.

### Обсуждение

Известно, что клеточные эффекторы реализуют механизмы врожденного и приобретенного противоопухолевого иммунитета, однако особенности их распределения в строме переходноклеточных карцином мочевого пузыря изучены недостаточно полно [1]. В настоящем исследовании было установлено, что количество иммунокомпетентных стромальных клеток в целом нарастало с увеличением глубины инвазии и снижением степени дифференцировки рака и лишь при достижении значительного местного его распространения имело тенденцию к уменьшению. Вероятно, эффекторный ответ был более выражен при значительном изменении специфической антигенной структуры уротелия, которая, как правило, наблюдается в низкодифференцированных и имеющих склонность к инвазивному росту новообразованиях. Снижение числа стромальных эффекторов в карциномах стадии pT4 и степени дифференцировки G<sub>3</sub> может быть обусловлено истощением ресурсов иммунокомпетентных реакций на поздних этапах канцерогенеза и следствием меньшей плотности распределения клеток в строме опухолей, имеющих большие размеры.

Существует мнение, что распределение числа стромальных эффекторов в подгруппах новообразований с глубиной инвазии pTa—pT1 и pT2—pT4 соответствует их пролиферативной активности [10]. Учитывая нелинейный характер связи между числом инфильтрирующих опухолевую строму клеток и традиционными классификационными признаками карцином — глубиной инвазии и степенью дифференцировки — представляется целесообразным рассматривать особенности распределения эффекторов в качестве самостоятельного фактора прогноза прогрессирования рака.

Полученные данные позволяют предположить, что у больных с благоприятным прогнозом имеется некоторое пороговое значение числа стромальных эффекторов, отражающее компетентность иммунного ответа или соответствующее менее выраженной экспрессии опухолевых антигенных детерминант.

При неблагоприятном прогнозе определяется большее количество клеток в строме опухолей, которое, вероятно, отражает функциональную недостаточность эффекторов. При этом продолжительность жизни больных, сопротивляющихся опухолевой агрессии, оказывается прямо пропорциональной выраженности степени стромальной инфильтрации иммунокомпетентными клетками, что, очевидно, свидетельствует о большей противоопухолевой активности. Не исключено, что обнаруженные закономерности отражают работу систем защиты организма против опухолей: естественного врожденного иммунитета, реализующегося некоторым стабильным числом эффекторов, и специфического противоопухолевого иммунитета, развивающегося по типу реакции гиперчувствительности замедленного типа [11].

Согласно современным представлениям, эффекторы обеспечивают защитные реакции в тесной кооперации, однако особенности межклеточных взаимодействий изучены недостаточно полно. В нашей работе на высокий риск прогрессии заболевания указывали высокая степень неоднородности распределения тучных клеток и большое число лимфоцитов и сегментоядерных лейкоцитов опухолевой стромы. Известно, что эти эффекторы взаимодействуют при распознавании раковых клеток и являются непосредственными участниками направленного против них цитотоксического действия [1].

В нашем исследовании была подтверждена ведущая роль классификационных категорий при определении риска прогрессирования РМП. В то же время по результатам множественного регрессионного анализа достоверность зависимости 5-летней выживаемости больных от дифференцировки новообразований не достигла порогового значения. Причина этого, вероятно, кроется в тесной связи этого показателя с глубиной инвазии рака ( $p < 0,001$ ) и отчасти может быть обусловлена субъективизмом специалистов, определяющих принадлежность карциномы к той или иной классификационной подгруппе. Очевидно, что количественные методы анализа, в частности, подсчет эффекторов стромы переходноклеточных карцином мочевого пузыря, позволяют получить более точную и воспроизводимую информацию.

Таблица 2. Средние значения признаков, входящих в формулу расчета  $P$ , в соответствии с принадлежностью больных поверхностным РМП к группам высокого и низкого риска смерти от опухолевой прогрессии в течение 5 лет после операции

| Категория больных                 | Средние значения числа клеток-эффекторов стромы |           | Значение $P$ 5-летней выживаемости больных без прогрессии |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|
|                                   | сегментоядерные лейкоциты                       | лимфоциты |                                                           |
| Прожили 5 лет без прогрессии рака | 0,03                                            | 52,08     | 1,15                                                      |
| Умерли от прогрессии рака         | 0,26                                            | 72,94     | 1,97                                                      |

**Заключение**

В нашем исследовании особенности распределения и состава клеток-эффекторов стромы карцином мочевого пузыря оказались связанными с глубиной инвазии и степенью дифференцировки рака. Кроме того, анализ иммунокомпетентных клеток дал возможность уточнить принадлежность больных к группам риска рецидивирования рака и 5-летней выживаемости без прогрессирования, что может

служить предпосылкой для рекомендации соответствующих режимов лечебных мероприятий и послеоперационного наблюдения.

**Благодарность**

Авторы выражают глубокую благодарность проф. М.Г. Рыбаковой и канд. мед. наук В.В. Козлову за консультации, а также за содействие в организации и применении методик, использованных в работе.

**Литература**

1. Дейчман Г.И. Опухолевые антигены и противоопухолевый иммунитет (врожденный и приобретенный). В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М., Медицина; 2004. с. 448—73.
2. Halapi E. Oligoclonal T cells in human cancer. *Med Oncol* 1998;15(4):203—11.
3. Аль-Шукри С.Х., Ткачук В.Н. Опухоли мочеполовых органов. С.-Пб., Питер; 2000. с. 100—220.
4. Матвеев Б.П. Клиническая онкоурология. М., Вердана; 2003. с. 197—270.
5. Аничков Н.М., Толыбеков А.С. Уро-тели: норма, воспаление, опухоль. Алма-Ата, Казахстан; 1987. с. 111—212.
6. Flamm J. Tumor-associated tissue inflammatory reaction and eosinophilia in primary superficial ladder cancer. *Urology* 1992;40(2):180—5.
7. Sanchez de la Muela P., Rosell D., Aguera L. et al. Superficial bladder cancer: survival and prognostic factors. *Eur Urol* 1991;20(3):184—91.
8. Sobin L.H., Wittekind C. Urinary bladder. TNM classification of malignant tumours. 5th ed. N Y, Wiley-Liss; 1997. p. 187—90.
9. Mostofi F.K., Sobin L.H., Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. 10th ed. Geneva, WHO; 1973. p. 3—118.
10. Корнеев И.А. Изучение ядрышкообразующих районов хромосом в карциномах мочевого пузыря. *Вопр онкол* 2004;(4):449—53.
11. Shreiber H. Tumor immunology. In: W.E. Paul (ed). *Fundamental immunology*, 3rd. N Y, Raven Press; 1993. p. 1143—78.

## Лечение и прогноз больных переходноклеточным раком мочевого пузыря с метастазами в регионарные лимфоузлы

Р.В. Хабалов, В.Б. Матвеев, М.И. Волкова, Д.А. Носов

Отделение урологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### TREATMENT AND PROGNOSIS IN PATIENTS WITH TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE URINARY BLADDER METASTASIZING TO REGIONAL LYMPH NODES

R.V. Khabalov, V.B. Matveev, M.I. Volkova, D.A. Nosov

Department of Urology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

**Objective:** to assess the results of treatment and to identify the predictors of survival in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder with regional lymph node metastasis.

**Material and methods.** A retrospective analysis of 56 patients with transitional cell carcinoma of the bladder (pT<sub>1</sub>—4aN<sub>1</sub>—2M<sub>0-1</sub>) who underwent radical cystectomy at the N.N. Blokhin Russian Cancer Center between 1980 and 2005 was performed. Their median age was 58.6 years; males and females were 85.7 and 14.3%, respectively. Studer's (19.7%), Bricker's (73.2%) procedures and ureterocutaneostomy (7.1%) were used for urinary diversion. Thirty-six (64.3%) of the 56 patients received additional treatment: neoadjuvant chemotherapy (CT) (n = 2 (3.6%)), adjuvant therapy (n = 32 (57.1%)); CT (n = 24 (42.8%)), and radiotherapy (n = 6 (10.7%)), chemoradiation therapy (n = 2 (3.6%)), and neo- and adjuvant CT (n = 2 (3.6%)). The median follow-up was 21.7 months (1-97.6 months).

**Results.** The effect of neoadjuvant CT was assessed as stabilization in all cases. Less than 15 lymph nodes were removed in 27 (48.2%), 15 lymph nodes or more were removed in 29 (51.8%) patients. The category pN+ was diagnosed in all cases: pN1 in 19 (33.9%), pN2 in 37 (66.1%). Involvement of nonregional (para-aortic) lymph nodes (pM+) was detected in 3 (5.4%) patients. Recurrences developed in 41 (71.9%) of the 56 patients on an average of 11.8 months after termination of treatment: localized regional and distant metastases in 3 (5.3%) and 35 (61.4%) patients, respectively; their combination in 3 (5.3%). In all 56 patients, overall, tumor-specific, and relapse-free 5-year survival was 32.1, 34.0, and 17.9%, respectively. Univariate analysis indicated that a history of superficial carcinoma (p = 0.036), as well as nonregional lymphogenic metastases (p = 0.036), and additional treatment (p = 0.020) were significant predictors. There was a trend for better survival in patients with pT < 3a (p = 0.056), after removal of more than 15 lymph nodes (p = 0.084), Bricker's operation (p = 0.055), and adjuvant therapy (p = 0.065).

**Conclusion.** Multimodal approach for transitional cell carcinoma of the urinary bladder with regional metastases improves tumor-specific 5-year survival as compared with that after radical cystectomy alone.