

Прогностическая значимость sPD-1/sPD-L1 при раке почки в зависимости от фенотипа опухолевых и стромальных клеток

О.В. Ковалева, А.Н. Грачев, Э.И. Макарова, С.Д. Бежанова, И.С. Стилиди, В.Б. Матвеев, Н.Е. Кушлинский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Владимировна Ковалева ovkovaleva@gmail.com

Введение. Поиск новых прогностических маркеров почечно-клеточного рака является актуальной проблемой онкоурологии. Современные исследования демонстрируют необходимость комплексной оценки клинической и прогностической значимости многих маркеров.

Цель исследования – комплексный анализ прогностической значимости растворимых форм PD-1 и PD-L1 (sPD-1 и sPD-L1) в зависимости от фенотипа опухолевых клеток и их микроокружения.

Материалы и методы. В исследование включены образцы опухолей и сывороток крови от 54 пациентов с почечно-клеточным раком и от 67 здоровых доноров. Концентрацию sPD-1 и sPD-L1 определяли в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа. Оценку тканевой экспрессии PD-L1, PU.1, CD3 и CD20 проводили иммуногистохимическим методом. Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Анализ общей выживаемости проводили путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Показано увеличение содержания sPD-L1 у пациентов с почечно-клеточным раком по сравнению со здоровыми донорами. Наибольшее содержание растворимой формы PD-1 характерно для пациентов с несветлоклеточным вариантом опухоли. Высокое содержание sPD-L1 в сыворотке и PD-L1 в опухолевых клетках ассоциировано с прогрессированием заболевания (высокой стадией и низкой дифференцировкой, а также наличием регионарных метастазов). Показано, что высокое содержание PU.1⁺ и CD20⁺-клеток в строме опухоли является значимым фактором неблагоприятного прогноза. Не выявлено прогностической значимости как для растворимой формы PD-L1, так и для тканевой. Однако их комплексный анализ показал, что высокое содержание растворимой формы PD-L1 при высокой тканевой экспрессии данного маркера – крайне неблагоприятный фактор.

Заключение. Комплексный анализ прогностической значимости содержания растворимой и тканевой форм PD-L1 является новым подходом к оценке прогноза почечно-клеточного рака.

Ключевые слова: PD-L1, сыворотка крови, почечно-клеточный рак, строма, иммуносупрессия, прогноз

Для цитирования: Ковалева О.В., Грачев А.Н., Макарова Э.И. и др. Прогностическая значимость sPD-1/sPD-L1 при раке почки в зависимости от фенотипа опухолевых и стромальных клеток. Онкоурология 2022;18(2):17–28. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28

Prognostic significance of sPD-1/sPD-L1 in renal cancer depending on the phenotype of tumor and stromal cells

O.V. Kovaleva, A.N. Gratchev, E.I. Makarova, S.D. Bezhanova, I.S. Stilidi, V.B. Matveev, N.E. Kushlinskii

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Olga Vladimirovna Kovaleva ovkovaleva@gmail.com

Background. The search for new prognostic markers of renal cell carcinoma is an urgent problem of oncology. Modern studies demonstrate the need for a comprehensive assessment of the clinical and prognostic significance of many markers.

Aim is a comprehensive analysis of the prognostic significance of soluble forms of PD-1 and PD-L1 (sPD-1 and sPD-L1) depending on the phenotype of tumor cells and the microenvironment.

Materials and methods. The study included tumor tissue and serum samples from 54 patients with renal cell cancer and from 67 healthy donors. The concentrations of sPD-1 and sPD-L1 were determined in blood serum using ELISA. Tissue expression of PD-L1, PU.1, CD3, and CD20 was assessed by immunohistochemistry. To determine statistically significant differences in independent groups, the Mann–Whitney test and Fisher’s exact test were used. Overall survival was analyzed by constructing survival curves using the Kaplan–Meier method. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. Increase of sPD-L1 concentration in serum from patients with renal cell carcinoma compared with healthy donors was demonstrated. The highest concentration of the soluble form of the PD-1 receptor was observed in serum from patients with the non-clear cell renal cell carcinoma. High levels of sPD-L1 in serum and PD-L1 in tumor cells are associated with disease progression (advanced stage, higher malignancy, as well as the presence of regional metastases). It has been shown that the high content of PU.1⁺ and CD20⁺ cells in the tumor stroma are significant factors of unfavorable prognosis. No prognostic significance was found for both sPD-L1 and PD-L1 expressed in tumor tissue. However, analysis of a combination of these markers showed that the high concentration of sPD-L1 together with the high tissue expression of PD-L1 is an extremely unfavorable factor.

Conclusion. Analysis of sPD-L1 concentration and tissue expression of PD-L1 in combination is a new approach for assessing the prognosis of renal cell carcinoma.

Keywords: PD-L1, blood serum, renal cell carcinoma, stroma, immunosuppression, prognosis

For citation: Kovaleva O.V., Gratchev A.N., Makarova E.I. et al. Prognostic significance of sPD-1/sPD-L1 in renal cancer depending on the phenotype of tumor and stromal cells. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2022;18(2):17–28. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28

Введение

Почечно-клеточный рак (ПКР) — значимая проблема современной онкологии ввиду частой встречаемости и устойчивости к различным видам лекарственного лечения. Ранняя диагностика в сочетании с радикальной операцией является одной из основных стратегий, оказывающей однозначно положительное влияние на выживаемость пациентов. Однако большое число случаев выявления рака почки отмечено на поздних стадиях, и прогноз их исхода менее благоприятный. В подавляющем большинстве случаев ПКР выявляются мутации гена *VHL*, что приводит к активации ангиогенеза и опухолевой прогрессии. В связи с этим использование ингибиторов тирозинкиназ получило крайне широкое распространение в терапии данной патологии, однако их применение ограничено во времени из-за быстрого появления устойчивых к этой терапии клеток.

Одна из особенностей ПКР — его высокая иммуногенность. Достигнутые успехи в лечении рака легкого и меланомы с помощью иммунотерапии позволили предположить ее положительный эффект и при раке почки. Действительно, в случае метастатического светлоклеточного рака почки иммунотерапия улучшила показатели выживаемости больных. Однако для многих больных ПКР успех иммунотерапии не столь очевиден. Отдельно следует выделить редкие гистологические типы рака почки, такие как хромофобный и папиллярный рак, для которых терапевтические возможности в целом значительно ниже, чем при светлоклеточном варианте заболевания.

Успех иммунотерапии ПКР различных гистологических типов в значительной степени зависит

от экспрессии PD-L1 (лиганда PD-1 (рецептора программируемой клеточной гибели)) на опухолевых клетках и является показанием к ее назначению. Также показано, что успех иммунотерапии связан с составом опухолевого микроокружения. Так, опухоли, которые сильно инфильтрированы цитотоксическими Т-клетками, с большей вероятностью отвечают на иммунотерапию, чем опухоли, которые содержат большое количество супрессорных иммунных клеток, таких как регуляторные Т-клетки (Tregs) и миелоидные супрессорные клетки (MDSC). Также следует отметить, что в последнее время появляется все больше данных о новых прогностических стромальных маркерах различных солидных опухолей. К сожалению, в настоящее время ни один из стромальных опухолевых маркеров не используют в клинической практике, однако накапливаемая информация позволяет предположить изменение данной ситуации. Также большое количество современных исследований посвящено поиску комбинаций маркеров, комплексный анализ которых поможет повысить эффективность их использования.

Цель исследования — комплексный анализ содержания растворимых и тканевой форм белков PD-1 и PD-L1 у пациентов с опухолями почки различных гистологических типов, а также некоторых маркеров опухолевой стромы, таких как PU.1, CD3 и CD20.

Материалы и методы

В исследование были включены 54 пациента с ПКР, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, и 67 здоровых доноров. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют стандартам этического

комитета организации, Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех участников исследования получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей почки (Всемирной организации здравоохранения, 2016). Характеристики исследованной выборки представлены в табл. 1.

Концентрации белков sPD-1 и sPD-L1 определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA, Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

Иммуногистохимическое исследование выполняли по стандартной методике на срезах опухолевой ткани. Для демаскировки антигена применяли Трис-ЭДТА буфер pH 9.0 (ПраймБиоМед, Россия). Использовали первичные антитела к PU.1 (4G6; ПраймБиоМед, Россия, разведение 1:200), CD20 (клон PBM-12F1; ПраймБиоМед, Россия) и CD3 (Genemed 61-0011, США). Использовали систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Полученные препараты оценивали с помощью микроскопа Olympus BX53, камеры Lumenera INFINITY2-2C и программного обеспечения Infinity ANALYZE. Экспрессию CD3, PU.1, и CD20 оценивали в строме опухоли. В каждом случае оценку количества CD3-, PU.1- и CD20-положительных клеток осуществляли при увеличении 200 в 5 независимых полях зрения путем прямого подсчета. Содержание PU.1, CD3 и CD20 в строме опухоли выражали как среднее значение количества клеток в поле зрения.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Для анализа общей выживаемости больных разделили на 2 группы сравнения в зависимости от медианы содержания всех исследуемых белков. Анализ общей выживаемости проводили путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Сравнение статистической значимости различий выполняли при использовании логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов с почечно-клеточным раком

Table 1. Clinical and morphological characteristics of renal cell carcinoma patients

Характеристика Characteristic	n (%)
Возраст, лет: Age, years:	
≤58	27 (50)
>58	27 (50)
Пол: Gender:	
мужской male	34 (63)
женский female	20 (37)
Гистологический тип: Histology:	
светлоклеточный почечно-клеточный рак clear cell renal cell carcinoma	45 (83)
несветлоклеточный почечно-клеточный рак non-clear cell renal cell carcinoma	9 (17)
Стадия: Stage:	
I–II	36 (67)
III–IV	18 (33)
Размер опухоли (T): Tumor size (T):	
T1–T2	37 (69)
T3–T4	17 (31)
Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N):	
N0	48 (89)
N+	6 (11)
Степень дифференцировки: Grade:	
G ₁ –G ₂	36 (67)
G ₃ –G ₄	15 (28)
неопределена not determined	3 (5)

Результаты

Данное исследование посвящено изучению содержания растворимых (sPD-1 и sPD-L1) и тканевых (PD-L1) форм белков контрольной точки иммунитета (PD-1/PD-L1) в сыворотке крови и образцах ткани опухоли больных ПКР соответственно, а также содержания PU.1, CD3 и CD20 в строме опухолей, их ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов и прогностической значимости. На первом этапе работы проведена оценка диагностического потенциала исследованных белков. Медиана содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров составила 48,77 (36,46–62,28) и 7,61 (1,78–19,64) пг/мл, в группе больных ПКР – 56,17 (39,06–74,26) и 27,81 (12,53–38,37) пг/мл соответственно. Проведенный статистический

Таблица 2. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с почечно-клеточным раком и здоровых доноров

Table 2. sPD-1 and sPD-L1 levels in serum samples from renal cell carcinoma patients and healthy donors

Группа Group	sPD-1, пг/мл sPD-1, pg/ml		p	sPD-L1, пг/мл sPD-L1, pg/ml		p
	Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %	
Здоровые доноры Healthy donors	48,77	36,46–62,28	0,061	7,611	1,78–19,64	<0,0001*
Пациенты с почечно-клеточным раком Renal cell carcinoma patients	56,17	39,06–74,26		27,81	12,53–38,37	

*Статистически значимое различие.

*Statistically significant.

анализ показал, что содержание sPD-1 значимо не отличается в группе здоровых доноров и пациентов с ПКР, в то время как для sPD-L1 наблюдается значимое различие, а именно, у пациентов с ПКР выявлено увеличение содержания данного белка в сыворотке крови. Результаты представлены в табл. 2.

Далее был проведен анализ ассоциации содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных ПКР с клинико-морфологическими характеристиками заболевания, а также с фенотипом клеток иммунного инфильтрата опухолевой стромы. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Ассоциация содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови с клинико-морфологическими характеристиками пациентов с почечно-клеточным раком, а также с фенотипом опухолевой стромы

Table 3. Serum sPD-1 and sPD-L1 levels in terms of clinical and morphological characteristics of renal cell carcinoma patients and tumor stroma phenotype

Характеристика Characteristic	sPD-1, пг/мл sPD-1, pg/ml		p	sPD-L1, пг/мл sPD-L1, pg/ml		p
	Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %	
Возраст, лет: Age, years: ≤58 >58	56,33 50,23	43,77–92,11 37,86–72,74	0,333	32,09 21,59	12,65–49,66 11,87–33,65	0,216
Пол: Gender: мужской male женский female	59,70 45,21	45,34–76,02 36,74–73,85	0,271	32,09 17,12	18,72–48,48 2,678–35,71	0,026*
Гистологический тип: Histology: светлоклеточный почечно-клеточный рак clear cell renal cell carcinoma несветлоклеточный почечно-клеточный рак non-clear cell renal cell carcinoma	47,39 107,3	37,11–68,29 71,06–118,5	<0,0001*	27,03 33,65	13,53–37,96 6,349–63,61	0,789
Стадия: Stage: I–II III–IV	55,37 56,17	38,36–74,49 39,06–67,60	0,874	21,25 37,96	12,18–33,45 19,01–59,16	0,014*
Размер опухоли (T): Tumor size (T): T1–T2 T3–T4	60,63 56,01	38,86–74,46 38,99–68,29	0,779	21,59 38,37	12,18–33,26 18,58–61,62	0,016*
Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N): N0 N+	50,60 76,92	38,93–73,83 49,18–112,0	0,177	23,14 52,40	12,18–35,46 36,80–79,84	0,002*

Окончание табл. 3
 End of table 3

Характеристика Characteristic	sPD-1, пг/мл sPD-1, pg/ml		p	sPD-L1, пг/мл sPD-L1, pg/ml		p
	Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %	
Наличие отдаленных метастазов (M): Metastasis (M): M0 M+	50,60 63,32	38,62–74,43 57,71–68,20	0,532	24,89 40,09	12,18–37,75 29,46–48,46	0,203
Степень дифференцировки: Grade: G ₁ –G ₂ G ₃ –G ₄	48,75 56,01	39,31–74,49 36,36–66,91	0,616	23,14 32,55	11,95–35,46 20,91–66,53	0,016*
PD-L1 в опухоли: PD-L1 in tumor: PD-L1+ PD-L1–	59,67 53,06	41,57–71,97 38,62–74,43	0,826	27,62 27,81	13,91–45,46 12,10–38,37	0,683
Уровень PU.1: PU.1 level: низкий low высокий high	60,63 56,01	39,87–80,50 36,36–69,66	0,452	18,09 32,55	11,87–33,65 18,07–49,66	0,039*
Уровень CD3: CD3 level: низкий low высокий high	50,11 60,63	37,86–74,22 43,77–74,39	0,329	24,70 32,09	12,65–38,37 9,15–46,92	0,774
Уровень CD20: CD20 level: низкий low высокий high	47,39 60,63	36,37–72,74 45,67–74,52	0,186	25,09 28,59	13,63–38,37 9,15–46,92	0,956

*Статистически значимое различие.
 *Statistically significant.

Проведенный анализ показал, что содержание растворимой формы PD-1 значимо ассоциировано с гистологическим типом опухоли. При несветлоклеточном варианте опухоли в сыворотке пациентов содержание sPD-1 выше в 2,3 раза по сравнению с таковым у пациентов со светлоклеточным ПКР. Также следует отметить, что содержание sPD-L1 значимо не различается между группами пациентов с опухолями различных гистологических типов. Высокое содержание sPD-L1 ассоциировано с поздней стадией заболевания, большим размером опухоли, наличием регионарных метастазов и более низкой степенью дифференцировки. Отдельно стоит отметить, что высокое содержание sPD-L1 ассоциировано с более высоким содержанием PU.1⁺ в опухолевой строме, это свидетельствует о том,

что данный тип клеток может быть источником растворимой формы этого белка.

Далее был проведен иммуногистохимический анализ содержания PD-L1 в опухолевой ткани. Иммуногистохимическое окрашивание на PD-L1 в опухолевых клетках наблюдали у 16 (30 %) пациентов с ПКР. Частота положительного окрашивания для светлоклеточного и несветлоклеточного вариантов составила 31 % (14 случаев) и 22 % (2 случая) соответственно. Согласие между тканевой экспрессией и сывороточным содержанием sPD-L1 оценивали с помощью коэффициента каппа Коэна (κ). Все значения коэффициента были близки к нулю, что свидетельствует об отсутствии согласия между экспрессией PD-L1 в опухолевых клетках и содержанием его растворимой формы (табл. 4).

Таблица 4. Сравнение тканевой экспрессии PD-L1 с уровнями sPD-L1 в сыворотке крови

Table 4. Comparison between immunostaining for PD-L1 and sPD-L1 serum levels

Гистологический тип Histology	Уровень sPD-L1 level	PD-L1 в опухоли, n PD-L1 in tumor, n		к	PD-L1 в строме, n PD-L1 in stroma, n		к
		Положительное окрашивание Positive staining	Отрицательное окрашивание Negative staining		Положительное окрашивание Positive staining	Отрицательное окрашивание Negative staining	
Почечно-клеточный рак Renal cell carcinoma	Высокий High	8	19	0,000	17	10	0,111
	Низкий Low	8	19		14	13	
Светлоклеточный почечно-клеточный рак Clear cell renal cell carcinoma	Высокий High	7	15	0,014	14	8	0,146
	Низкий Low	7	16		11	12	
Несветлоклеточный почечно-клеточный рак Non-clear cell renal cell carcinoma	Высокий High	1	4	-0,047	3	2	-0,154
	Низкий Low	1	3		3	1	

На следующем этапе работы провели анализ ассоциации содержания PU.1⁺, CD20⁺ и CD3⁺-клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками пациентов (табл. 5). Медиана содержания PU.1⁺-клеток составила 38,10 (19,10–56,05), CD3⁺-клеток – 40,40 (15,25–62,00) и CD20⁺-клеток – 8,10 (2,35–25,15) в поле зрения.

Проведенный анализ показал наличие ассоциации между содержанием всех 3 исследованных маркеров со стадией заболевания и размером опухоли. Повышенное содержание стромальных клеток исследуемого фенотипа характерно для более продвинутой стадии

заболевания и большего размера опухоли. Для PU.1 и CD3 также наблюдали значимую ассоциацию с наличием регионарных метастазов. В целом большее количество стромальных клеток оказалось характерно для более агрессивных опухолей.

Дополнительным этапом исследования был анализ ассоциации тканевого содержания PD-L1 в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Результаты представлены в табл. 6.

Результаты проведенного исследования показали, что содержание PD-L1 в стромальных клетках не ассоциировано с клиническими характеристиками.

Таблица 5. Ассоциация содержания PU.1⁺, CD20⁺ и CD3⁺-клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками пациентов

Table 5. Association of the content of PU.1⁺, CD20⁺ and CD3⁺ cells in the tumor stroma with clinical and morphological characteristics of patients

Характеристика Characteristic	PU.1, количество клеток PU.1, cell number		p	CD3, количество клеток CD3, cell number		p	CD20, количество клеток CD20, cell number		p
	Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %	
Возраст, лет: Age, years:									
≤58	34,4	18,6–66,6	0,989	51,8	16,8–80,2	0,189	8,4	3,4–29,6	0,397
>58	38,8	21,2–55,4		34,0	12,2–60,0		7,8	1,8–19,8	
Пол: Gender:									
мужской male	40,8	18,3–59,3	0,849	37,7	16,5–77,7	0,787	9,9	3,4–28,9	0,171
женский female	35,3	22,4–53,6		44,7	13,3–59,9		4,8	1,1–22,8	

Характеристика Characteristic	PU.1, количество клеток PU.1, cell number		p	CD3, количество клеток CD3, cell number		p	CD20, количество клеток CD20, cell number		p
	Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %		Медиана Median	25–75 %	
Гистологический тип: Histology:									
светлоклеточный почечно- клеточный рак clear cell renal cell carcinoma	40,0	21,7–60,6	0,132	41,0	17,5–63,1	0,358	9,2	2,3–29,1	0,789
несветлоклеточный почечно- клеточный рак non-clear cell renal cell carcinoma	23,0	11,8–41,9		32,4	9,1–54,4		7,6	2,3–16,3	
Стадия: Stage:									
I–II	34	18,7–46,2	0,022*	33,2	12,3–53,2	0,005*	5,2	1,9–14,5	0,019*
III–IV	54,8	30,1–86,8		63,1	25,1–101,6		18,7	6,8–31,1	
Размер опухоли (T): Tumor size (T):									
T1–T2	34,4	18,7–46,1	0,023*	34,0	12,4–53,9	0,007*	5,2	1,9–16,6	0,027*
T3–T4	55,4	27,1–90,8		63,6	23,4–108,2		19,0	5,9–32,4	
Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N):									
N0	39,2	13,3–59,9	0,026*	36,6	18,9–50,8	0,041*	8,1	2,05–22,8	0,422
N+	108,4	24,7–134,7		104,5	28,9–132,9		13,7	4,0–33,1	
Наличие отдаленных метастазов (M): Metastasis (M):									
M0	36,6	19,1–56,1	0,711	39,2	15,3–60,6	0,512	7,7	2,4–25,2	0,508
M+	45,6	13,5–102,1		65,6	14,2–90,5		19,1	4,6–64,2	
Степень дифференцировки: Grade:									
G ₁ –G ₂	34,6	19,7–46,2	0,092	37,1	13,3–53,9	0,079	6,6	2,1–17,5	0,121
G ₃ –G ₄	60,6	14,8–101,7		60,9	24,3–94,7		17,0	3,0–43,7	

*Статистически значимое различие.

*Statistically significant.

Для PD-L1 в опухолевых клетках выявлено, что его экспрессия положительно связана с опухолевой прогрессией, а именно так же, как и для растворимой формы данного лиганда, его повышенное содержание в опухолевых клетках чаще наблюдается на поздних стадиях, при наличии регионарных метастазов и высокой степени злокачественности.

На последнем этапе исследования был проведен анализ прогностической значимости экспрессии всех исследованных маркеров, а также их комбинаций. Результаты представлены на рис. 1, 2.

Проведенный анализ показал, что PU.1 и CD20 являются значимыми факторами неблагоприятного

прогноза ПКР. Для CD3 отметили аналогичную тенденцию, однако данные не достигли статистической значимости. Далее провели прогностический анализ содержания растворимой и тканевой форм PD-L1 в сыворотке крови и ткани опухоли пациентов.

Проведенный анализ не выявил прогностической значимости содержания PD-L1 в сыворотке крови пациентов, а также в неопластических и стромальных клетках опухоли. Далее проведен комплексный анализ содержания как растворимой, так и тканевой формы sPD-L1. Оказалось, что сочетание высокого содержания sPD-L1 совместно с высокой тканевой экспрессией PD-L1 в опухолевых клетках является фактором

Таблица 6. Ассоциация содержания PD-L1 в опухолевых клетках и строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками пациентов
Table 6. Association of PD-L1 content in tumor cells and in the tumor stroma with clinical and morphological characteristics of patients

Характеристика Characteristic	PD-L1 в опухоли, n PD-L1 in tumor, n		p	PD-L1 в строме, n PD-L1 in stroma, n		p
	Положительное окрашивание Positive staining	Отрицательное окрашивание Negative staining		Положительное окрашивание Positive staining	Отрицательное окрашивание Negative staining	
Возраст, лет: Age, years:						
≤58	9	18	0,766	17	10	0,583
>58	7	20		14	13	
Пол: Gender:						
мужской male	11	23	0,759	18	16	0,412
женский female	5	15		13	7	
Гистологический тип: Histology:						
светлоклеточный почечно-клеточный рак clear cell renal cell carcinoma	14	31	0,709	25	20	0,717
несветлоклеточный почечно-клеточный рак non-clear cell renal cell carcinoma	2	7		6	3	
Стадия: Stage:						
I–II	6	30	0,005*	19	17	0,392
III–IV	10	8		12	6	
Размер опухоли (T): Tumor size (T):						
T1–T2	7	30	0,022*	20	17	0,559
T3–T4	9	8		11	6	
Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N):						
N0	11	37	0,007*	26	22	0,224
N+	5	1		5	1	
Наличие отдаленных метастазов (M): Metastasis (M):						
M0	14	36	0,573	29	21	>0,999
M+	2	2		2	2	
Степень дифференцировки: Grade:						
G ₁ –G ₂	7	29	0,022*	18	18	0,064
G ₃ –G ₄	8	7		12	3	

*Статистически значимое различие.

*Statistically significant.

неблагоприятного прогноза, в то время как сочетание низкого содержания сывороточного PD-L1 с высокой тканевой экспрессией в опухолевых клетках – фактор благоприятного исхода для пациентов с ПКР. В случае комплексного анализа sPD-L1 совместно с тканевой

экспрессией в стромальных клетках значимых различий не выявлено. Статистический анализ общей выживаемости пациентов с ПКР представлен в табл. 7.

В результате проведенного исследования показана клиническая и прогностическая значимость ряда

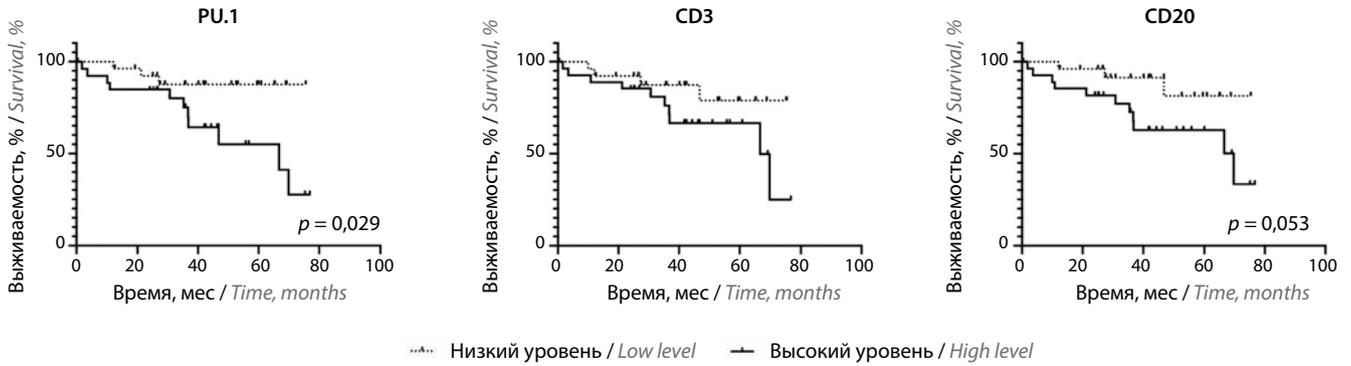


Рис. 1. Прогностическая значимость количества PU.1⁺, CD3⁺ и CD20⁺-клеток в строме опухоли у пациентов с почечно-клеточным раком
Fig. 1. Prognostic significance of the amount of PU.1⁺, CD3⁺ and CD20⁺ cells in the tumor stroma in patients with renal cell carcinoma

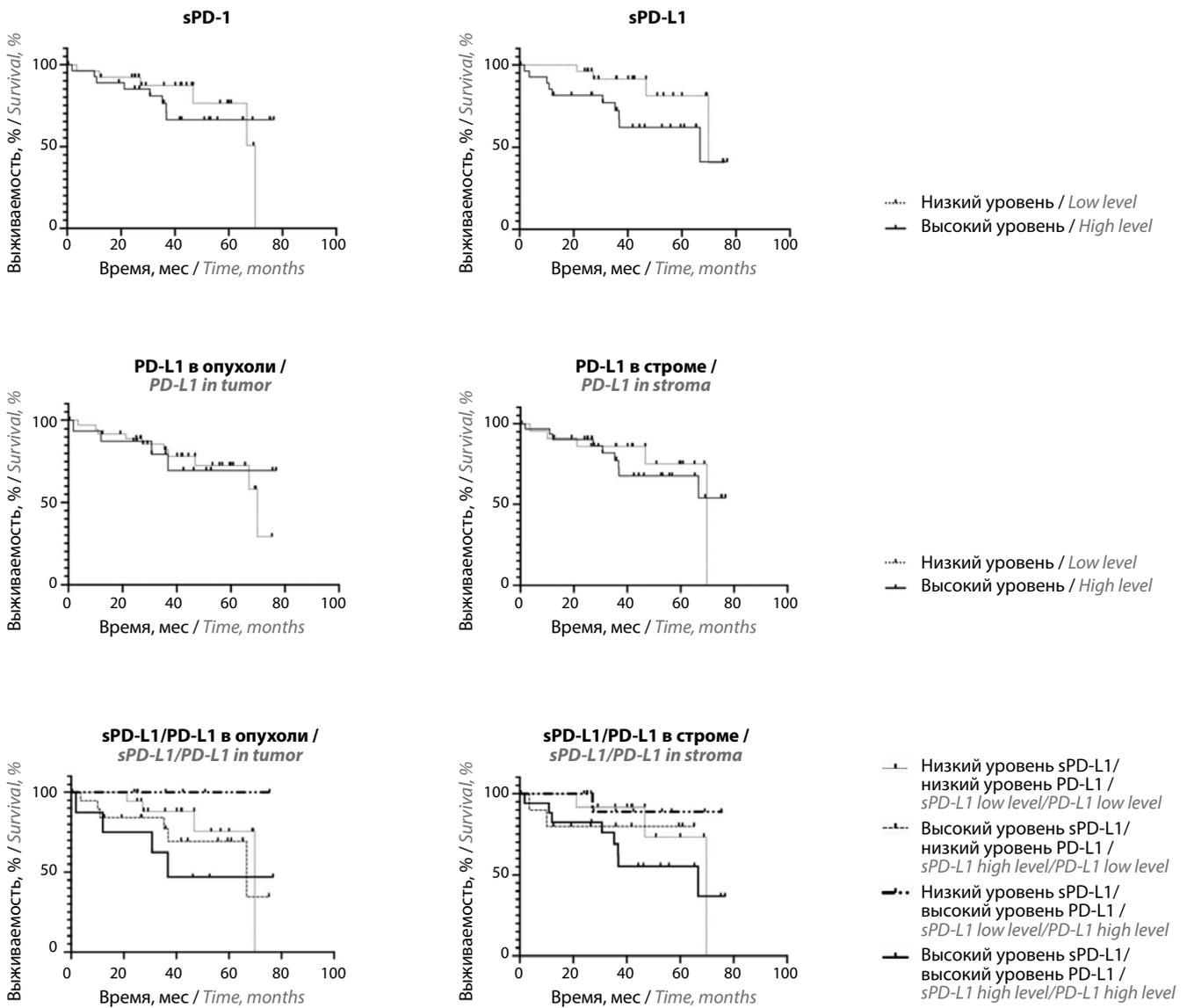


Рис. 2. Прогностическая значимость содержания PD-1 и PD-L1 в опухоли и его растворимых форм в сыворотке крови у пациентов с почечно-клеточным раком
Fig. 2. Prognostic significance of PD-1 and PD-L1 content in the tumor and its soluble forms in blood serum in patients with renal cell carcinoma

Таблица 7. Статистический анализ прогностической значимости исследованных маркеров

Table 7. Statistical analysis of prognostic significance of markers studied

Маркер (уровень) Marker (level)	Однофакторный анализ Univariate analysis		P
	Отношение рисков Hazard ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	
sPD-1 ПКР (высокий/низкий) sPD-1 RCC (high/low)	1,140	0,399–3,261	0,806
sPD-L1 ПКР (высокий/низкий) sPD-L1 RCC (high/low)	2,699	0,946–7,7	0,080
PD-L1 в опухоли (высокий/низкий) PD-L1 in tumor (high/low)	0,932	0,297–2,921	0,904
PD-L1 в строме (высокий/низкий) PD-L1 in stroma (high/low)	1,217	0,418–3,539	0,723
sPD-L1 (высокий)/PD-L1 в опухоли (высокий)// sPD-L1 (низкий)/PD-L1 в опухоли (высокий) sPD-L1 (high)/PD-L1 in tumor (high)// sPD-L1 (low)/PD-L1 in tumor (high)	7,346	1,032–52,32	0,047*
sPD-L1 (высокий)/PD-L1 в строме (высокий)// sPD-L1 (низкий)/PD-L1 в строме (высокий) sPD-L1 (high)/PD-L1 in stroma (high)// sPD-L1 (low)/PD-L1 in stroma (high)	5,647	1,499–21,28	0,064
PU.1 в строме (высокий/низкий) PU.1 in stroma (high/low)	3,710	1,301–10,58	0,029*
CD3 в строме (высокий/низкий) CD3 in stroma (high/low)	2,380	0,834–6,787	0,129
CD20 (высокий/низкий) CD20 (high/low)	3,239	1,134–9,253	0,053

*Статистически значимое различие.

Примечание. ПКР – почечно-клеточный рак.

*Statistically significant.

Note. RCC – renal cell carcinoma.

стромальных и опухолевых маркеров ПКР, а также продемонстрирована высокая значимость комплексного анализа растворимой и тканевой форм PD-L1 для повышения эффективности мониторинга прогноза заболевания.

Обсуждение

Почечно-клеточный рак – гетерогенное заболевание, включающее различные гистологические варианты. В целом данные опухоли можно разделить на 2 основные группы: светлоклеточный ПКР, который составляет более 80 % случаев, и несветлоклеточный ПКР, включающий папиллярный, хромофобный и некоторые другие редкие подтипы рака почки. Известно, что микроокружение опухоли играет большую роль в патогенезе ПКР и участвует в его возникновении, прогрессировании и ответе на лечение. Однако качественный и количественный состав опухолевого

микроокружения сильно зависит от гистологического типа опухоли, и его роль в контексте прогрессии заболевания еще не определена [1]. Целью данной работы было исследование прогностической значимости растворимой и тканевой форм PD-L1 в зависимости от особенностей воспалительного инфильтрата ПКР.

На первом этапе работы проведена оценка содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с ПКР. Показано, что содержание sPD-L1 значимо отличается у здоровых доноров и пациентов с опухолевой патологией, в то время как для sPD-1 такой закономерности не выявлено. Это согласуется с ранее опубликованными данными [2]. Однако стоит отметить, что содержание sPD-1 в сыворотке крови больных несветлоклеточным ПКР было значительно выше, чем у пациентов со светлоклеточным вариантом рака почки. Данные о содержании sPD-1 при несветлоклеточном раке почки в настоящее время практически

отсутствуют, и можно предположить потенциальную диагностическую значимость этого маркера именно для опухолей подобного типа.

Проведенный анализ ассоциации содержания растворимых форм белков (sPD-1/sPD-L1) в сыворотке крови с клиническими характеристиками пациентов выявил ассоциации только для sPD-L1, а именно: повышенное сывороточное содержание данного белка характерно для пациентов с поздней стадией заболевания, при наличии регионарных метастазов и для опухолей низкой степени дифференцировки. При анализе ассоциации содержания sPD-L1 с фенотипом клеток опухолевой стромы показано, что высокое содержание sPD-L1 в сыворотке крови ассоциировано с высоким содержанием PU.1⁺-клеток в строме. Это может свидетельствовать о том, что именно они являются источником растворимой формы данного белка. Несмотря на то что высокое содержание sPD-L1 ассоциировано с опухолевой прогрессией, при этом прогностической значимости не выявлено. Для sPD-1 также показано отсутствие прогностической значимости при ПКР.

Далее проведен иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в опухолях, а также количественная оценка PU.1⁺-, CD3⁺- и CD20⁺-клеток в опухолевой строме. Анализ показал, что экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках, как и его растворимой формы, ассоциирована с неблагоприятными клиническими признаками: большим размером опухоли, наличием регионарных метастазов и более низкой степенью дифференцировки. Полученные результаты согласуются с данными литературы об ассоциации экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках при опухолевой прогрессии [3, 4]. Для экспрессии PD-L1 в клетках опухолевой стромы ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками не обнаружено. Также необходимо отметить, что мы не выявили прогностической значимости экспрессии PD-L1 как в опухолевых, так и в стромальных клетках. Данные литературы свидетельствуют о том, что PD-L1 чаще является маркером неблагоприятного прогноза ПКР [4], однако некоторые авторы сообщают об отсутствии его прогностической значимости, что согласуется с полученными нами результатами [5].

Ранее нами показано, что для рака почки PU.1 можно использовать в качестве маркера макрофагов в строме опухоли [6]. В данной работе дополнительно

проведена оценка прогностической значимости PU.1-положительных макрофагов, а также Т- и В-клеток в строме опухоли. Показано, что высокое содержание макрофагов и В-клеток является неблагоприятным прогностическим фактором при ПКР. Здесь стоит отметить, что большое количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, в большинстве своем связано с неблагоприятным прогнозом заболевания [7, 8]. Для В-клеток чаще наблюдается обратная ситуация: для некоторых типов солидных опухолей они являются маркером благоприятного прогноза [9, 10]. Однако для ПКР высокое содержание В-клеток в строме опухоли – маркер плохого прогноза, как по представленным нами результатам, так и по данным литературы [11], что свидетельствует в пользу дальнейшего изучения этого наблюдения.

На завершающем этапе исследования проведен комплексный анализ прогностической значимости тканевого и сывороточного содержания PD-L1 при ПКР. Показано, что сочетание высокого содержания данного белка в сыворотке крови при наличии высокой тканевой экспрессии является фактором крайне неблагоприятного прогноза. При такой комбинации маркеров медиана выживаемости составляет 36,7 мес. В группе пациентов с низким содержанием sPD-L1, но при наличии высокой тканевой экспрессии наблюдается обратная ситуация: такое сочетание – благоприятный прогностический фактор (медиана выживаемости более 75 мес). Этот факт свидетельствует в пользу того, что sPD-L1 – значимый прогностический фактор для рака почки с высокой тканевой экспрессией данного белка. Полученные результаты позволяют предположить, что sPD-L1 более эффективно блокирует противоопухолевый иммунный ответ.

Заключение

Результаты проведенного исследования говорят о необходимости дальнейшего комплексного изучения растворимых и тканевых маркеров для достижения реальной практической значимости. Клиническое значение растворимых форм контрольных точек иммунитета до сих пор остается противоречивым, хотя результаты настоящей работы свидетельствуют в пользу того, что именно растворимые формы данных белков приводят к эффективной локальной иммуносупрессии по сравнению с их тканевыми аналогами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ковалева О.В., Рашидова М.А., Самойлова Д.В. и др. Иммуносупрессорные особенности фенотипа стромы опухолей почки различных гистологических типов. Онкоурология 2020;16(2):29–35. [Kovaleva O.V., Rashidova M.A.,

Samoilova D.V. et al. Immunosuppressive peculiarities of stromal cells of various kidney tumor types. Onkourologiya = Cancer Urology 2020;16(2):29–35. (In Russ.]. DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-2-29-35

2. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О. и др. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфоло

- гические корреляции. Онкоурология 2019;15(1):15–22. [Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryatcheva I.O. et al. Soluble forms of the immune check-point receptor PD-1 and its ligand PD-L1 in blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and pathologic correlations. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2019;15(1):15–22. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-1-15-22
3. Kumar B., Ghosh A., Datta C., Pal D.K. Role of PDL1 as a prognostic marker in renal cell carcinoma: a prospective observational study in eastern India. *Ther Adv Urol* 2019;11:1756287219868859. DOI: 10.1177/1756287219868859
4. Leite K.R., Reis S.T., Junior J.P. et al. PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagn Pathol* 2015;10:189. DOI: 10.1186/s13000-015-0414-x
5. Li J., Wang P., Xu Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12(6):e0179536. DOI: 10.1371/journal.pone.0179536
6. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoilova D.V. et al. Immunosuppressive phenotype of esophagus tumors stroma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2020;2020:5424780. DOI: 10.1155/2020/5424780
7. Minami K., Hiwatashi K., Ueno S. et al. Prognostic significance of CD68, CD163 and folate receptor-beta positive macrophages in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 2018;15(5):4465–76. DOI: 10.3892/etm.2018.5959
8. Zhang Y., Cheng S., Zhang M. et al. High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One* 2013;8(9):e76147. DOI: 10.1371/journal.pone.0076147
9. Meshcheryakova A., Tamandl D., Bajna E. et al. B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PLoS One* 2014;9(6):e99008. DOI: 10.1371/journal.pone.0099008
10. Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А. и др. PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2021;10(2):32–9. [Kovaleva O.V., Gratchev A.N., Podlesnaya P.A. et al. PU.1 is a nuclear marker of immunocompetent cells of the tumor stroma in colorectal cancer. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology* 2021;10(2):32–9. (In Russ.)]. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39
11. Sjoberg E., Frodin M., Lovrot J. et al. A minority-group of renal cell cancer patients with high infiltration of CD20+B-cells is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 2018;119(7):840–6. DOI: 10.1038/s41416-018-0266-8

Вклад авторов

О.В. Ковалева: статистическая обработка данных, написание статьи;
А.Н. Грачев: анализ данных литературы, написание статьи;
Э.И. Макарова: получение экспериментальных данных;
С.Д. Безанова: гистологический анализ удаленных опухолей;
И.С. Стилиди: научное редактирование текста;
В.Б. Матвеев: клиническая работа с пациентами, научное редактирование текста;
Н.Е. Кушлинский: разработка дизайна исследования, общее руководство работой, окончательное редактирование и одобрение текста рукописи.

Authors' contributions

O.V. Kovaleva: statistical data processing, article writing;
A.N. Gratchev: literature data analysis, article writing;
E.I. Makarova: obtaining experimental data;
S.D. Bezhanova: histological analysis of removed tumors;
I.S. Stilidi: scientific article editing;
V.B. Matveev: clinical work with patients, scientific article editing;
N.E. Kushlinskii: developing the research design, general leadership, final editing and approval of the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.В. Ковалева / O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
А.Н. Грачев / A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>
Э.И. Макарова / E.I. Makarova: <https://orcid.org/0000-0002-3261-6729>
С.Д. Безанова / S.D. Bezhanova: <https://orcid.org/0000-0001-7336-9210>
И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>
В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinskii: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00082, <https://rscf.ru/project/22-25-00082/>).
Funding. The study was performed with the support of Russian Science Foundation (grant No. 22-25-00082, <https://rscf.ru/project/22-25-00082/>).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Протокол от 25.11.2021.
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. Protocol dated 25.11.2021.
All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 10.03.2022. **Принята к публикации:** 22.05.2022.
Article submitted: 10.03.2022. **Accepted for publication:** 22.05.2022.