

На правах рукописи

КЛИМАЧЕВ

Илья Владимирович

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
АНГИОГЕНЕЗА ПЕРИТУМОРОЗНОЙ ЗОНЫ
СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ**

3.3.2 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск – 2023

Работа выполнена на кафедре судебной медицины имени профессора В.Н.Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Барнаул)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

Бобров Игорь Петрович

Официальные оппоненты:

Жукова Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск).

Овсянко Елена Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии человека имени академика Ю.И. Бородина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск).

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2023 г. в ____ час. на заседании совета 24.1.242.03 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В структуре злокачественных новообразований во всем мире рак почки (РП) составляет 3-4% и занимает 10-е место (Османов Ю.И. и др., 2020; Ашырова Ф.С. и др., 2021). Прирост заболеваемости РП за последние 10 лет достиг 20 – 42% (Шевченко А.Н. и др., 2020; Грицкевич А.А. и др., 2021). По оценке Всемирной организации здравоохранения и Международного агентства по изучению рака в мире ежегодно выявляется около 500 тыс. случаев РП и около 175 тыс. человек погибает от этого заболевания (Филимонова У.С. и др., 2020; Мерабишвили В.М. и др., 2021).

В 2019 г. в Российской Федерации впервые выявленный рак почки был диагностирован у 24880 человек, а абсолютное число умерших от данного заболевания составило 8593 пациента (Каприн А.Д. и др., 2020). 40% больных с впервые выявленным раком почки уже имели III – IV клиническую стадию заболевания. За период с 2007 по 2017 г. прирост заболеваемости раком почки в РФ составил 42,6% при среднегодовом приросте 3,45%. На данный момент 5-летняя послеоперационная выживаемость больных составляет: при I – II стадии 80 – 90%, при III стадии – 50 – 60%, при IV стадии – 5 – 10% (Шевченко А.Н. и др., 2020).

Светлоклеточный вариант рака почки (СРП), среди всех гистологических вариантов, является наиболее распространенным и составляет 80% из опухолей, возникающих из почечного эпителия (Ковалева О.В. и др., 2020). Наиболее важным молекулярно-биологическим событием, способствующим возникновению СРП, является инактивация гена VHL (von Hippel-Lindau syndrome), что ведет к гиперпродукции факторов роста, ангиогенезу и нарушению процессов апоптоза (Ковалева О.В. и др., 2014).

В последние годы большое внимание уделяется структурным изменениям вблизи злокачественных новообразований различных локализаций (Федосенко К.В. и др., 2004, 2005; Авдалян А.М. и др., 2010; Сеньчукова М.А. и др., 2011; Данилова Н.В. и др., 2019, 2021; Кухнина Л.С. и др., 2021). Выявлено, что перитуморозная зона имеет важное биологическое значение для роста и прогрессии опухоли. В то же время патоморфология перитуморозной зоны при СРП практически не изучена.

Из-за недостаточности патологоанатомических исследований перитуморозной зоны при раке почки в настоящее время отсутствуют достаточно обоснованные критерии объема хирургических операций при раке почки. Одни удаляют опухоль до макроскопически «чистого» хирургического края (Kubinski D.J. et al., 2004; Duvdevani M. et al., 2005), другие иссекают прилегающую паренхиму почки на расстоянии 3 – 4 см (Переверзев А.С. и др., 2009), что существенно снижает экскреторную функцию органа.

Детальное патологоанатомическое исследование перитуморозной зоны при СРП может внести значимый вклад в оценку злокачественного и метастатического потенциала. В качестве одного из ключевых факторов опухолевого роста интенсивно исследуются различные параметры ангиогенеза непосредственно в опухолевом узле (Глыбин П.В., 2010; Li T. et al., 2018; Parmar D., Arpe M., 2021), но практически не изучаются особенности ангиогенеза в перитуморозной зоне.

Степень разработанности темы исследования. При анализе литературы по ангиогенезу при СРП выявлена значительная разнородность многочисленных данных по связи патогенеза опухоли с ее васкуляризацией, что свидетельствует о многофакторности развития СРП. Большое внимание в литературе уделяется опухолевому микроокружению, в отличие от перитуморального микроокружения (Gu Y. et al., 2022). Считается, что ангиогенез в каждом отдельном случае СРП может быть связан с разным патогенетическим механизмом и по-разному влиять на развитие самой опухоли (Vuong L. et al., 2019). При этом следует учитывать, что у пациентов с СРП еще до развития опухоли ангиогенез мог быть модифицирован в силу разных причин. Для оценки нормального и опухолевого ангиогенеза необходимо комплексное патоморфологическое исследование с применением иммуногистохимии и морфометрии.

Цель исследования – изучить иммуногистохимические и морфометрические параметры микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки и установить их связь с клинико-морфологическими и молекулярно-биологическими характеристиками опухоли.

Задачи исследования:

1. Провести морфометрический анализ микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки и сопоставить количественные показатели с клинико-морфологическими характеристиками опухоли (полом, возрастом, размерами опухолевого узла, ядерной атипией, метастатическим потенциалом).

2. С помощью иммуногистохимического анализа изучить молекулярно-биологические особенности перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки в сопоставлении с количественными показателями микроциркуляторного русла.

3. Изучить корреляционные связи клинико-морфологических и молекулярно-биологических факторов с количественными показателями микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки.

4. Изучить корреляционные связи количественных показателей микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки с воспалительной инфильтрацией, количеством тучных клеток и макрофагов.

Научная новизна исследования. Впервые при проведении комплексного патоморфологического анализа установлены особенности васкуляризации перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки. Впервые показано, что усредненные показатели площади, диаметра и длины окружности сосудов в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки увеличиваются до 2,7 раз при переходе от ранних клинических стадий к поздним, при метастазировании, а также при увеличении размеров опухолевого узла сверх 7 см, что связано с гипоксией увеличивающейся опухоли, меньшей степенью клеточной дифференцировки метастазирующего рака с соответствующей активацией при этом ангиогенеза.

Впервые выявлено, что при высоких степенях атипии ядер клеточных элементов светлоклеточного рака почки по классификации Fuhrman возрастают такие показатели васкуляризации перитуморозной зоны, как средняя площадь, средний диаметр, средняя суммарная площадь и средняя длина окружности сосудов.

Впервые выявлена сильная или очень сильная корреляционная связь количества макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки, с одной стороны, и стадией по TNM, размером опухоли, градацией по Fuhrman, наличием метастазов, индексом ДНК, экспрессией нуклеофозмина V/23 и матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) в клетках опухоли и воспалительного инфильтрата, с другой.

Впервые продемонстрирован половой диморфизм васкуляризации перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки. У мужчин статистически значимо выше до 25,5% такие показатели, как средняя площадь, средняя длина окружности, суммарная площадь и суммарная длина окружности сосудов, по сравнению с пациентами женского пола.

Впервые установлено, что в возрастной группе от 30 до 39 лет ангиогенез при светлоклеточном раке почки минимален, затем васкуляризация нарастает, а после 69 лет средняя площадь, средний диаметр и средняя длина окружности сосудов продолжают увеличиваться, тогда как количество сосудов микроциркуляторного русла, суммарная площадь профилей и суммарная длина окружности сосудов постепенно снижаются.

Впервые показано, что перитуморозная зона светлоклеточного рака почки наиболее выражено инфильтрирована тучными клетками у больных в возрасте от 70 до 79 лет, в меньшей степени – у больных в возрасте 30 – 39 лет.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые знания об особенностях развития сосудов в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки и установлена связь между васкуляризацией опухоли и ее некоторыми клинико-морфологическими характеристиками. Патоморфологическое исследование операционного материала онкологических больных, наряду с традиционными гистологическими методами, целесообразно

дополнить исследованием васкуляризации и лейкоцитарной инфильтрации с применением морфометрии и статистического анализа. При оценке перспектив у пациентов при светлоклеточном раке почки в прогностические модели необходимо включать количественные параметры ангиогенеза, тучноклеточной и макрофагальной инфильтрации перитуморозной зоны.

Определение степени инфильтрации опухоли макрофагами и/или тучными клетками позволяет с большой долей вероятности судить о ее размерах, анаплазии, предсказывать метастазирование, пролиферативный потенциал и выраженность ангиогенеза (по экспрессии ММП-9), то есть индивидуализировать прогноз для каждого пациента. Если светлоклеточный рак почки в значительной степени инфильтрирован макрофагами или тучными клетками, то такая опухоль имеет высокую стадию по TNM и выраженную степень ядерной анаплазии по Fuhrman, более вероятно наличие метастазов и, скорее всего, будут выше экспрессии нуклеофозмина V/23, матриксной металлопротеиназы-9 и показатели плоидности.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на применении принципов и методов комплексного патоморфологического анализа для оценки ангиогенеза в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки и установления связи этого процесса с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками, общих подходах к клиническим исследованиям. Используются современные методы комплексного патоморфологического анализа (световая микроскопия с применением иммуногистохимии, морфометрия), адекватный статистический анализ полученных данных. Объект исследований – образцы тканей перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки, полученные от пациентов при операции. Предмет исследования – процессы ангиогенеза и их зависимость от различных клинико-морфологических факторов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Средняя площадь, средний диаметр, средняя суммарная площадь сечения и средний периметр сосудов в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки увеличиваются при переходе от ранних клинических стадий к поздним, при возрастании степени ядерной атипии, при увеличении размеров опухолевого узла более 7 см и при метастазировании.

2. У мужчин статистически значимо выше показатели ангиогенеза в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки, по сравнению с пациентами женского пола.

3. Количественные показатели микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки прямо коррелируют с макрофагальной и тучноклеточной инфильтрацией.

4. В возрастной группе от 30 до 39 лет количественные показатели микрососудов в перитуморозной зоне светлоклеточного рака минимальны, затем они постепенно возрастают.

Степень достоверности результатов. Используемые методы комплексного патоморфологического анализа (световая микроскопия с применением иммуногистохимии, морфометрия), способы оценки васкуляризации в клиническом материале, статистическая обработка количественных данных соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Диссертация выполнена на достаточном клиническом материале: использованы данные 140 пациентов обо-его пола различных возрастных групп при светлоклеточном раке почки. Проведена оценка состояния сосудистого русла удаленной опухоли в зависимости от различных клинико-морфологических показателей. Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах собственных исследований, не носят характера умозрительных заключений и вытекают из результатов работы.

Апробация работы. Основные положения работы докладывались и обсуждались на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокие технологии в онкологической практике: 70 лет онкологической службе Алтайского края» (Барнаул, 2016); V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017); International Conferences “Scientific research of the SCO countries: Synergy and Integration” (Beijing, China, 2018, 2019); X съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти

академика Н.Н. Трапезникова (Сочи, 2018); XIII и XV международных конгрессах Российского общества онкоурологов (Москва, 2018, 2020); III Международной научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические пауки – фундаментальная основа медицины», посвященной 100-летию профессора Т.Д.Никитиной (Новосибирск, 2018); International Conferences «Process Management and Scientific Developments» (Birmingham, United Kingdom, 2019, 2020); заседании кафедры судебной медицины имени профессора В.Н.Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» (Барнаул, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 20 работ, из них 3 – в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, в том числе входящих в международные базы Web of Science и Scopus.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 133 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с изложением материала и методов исследования, 3 глав с результатами собственных исследований, главы с обсуждением собственных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы, включающего 318 источников (87 отечественных и 231 иностранных авторов). Работа иллюстрирована 35 таблицами и 10 рисунками.

Личный вклад автора. Автором проведены планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы его цель и задачи, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретированы и опубликованы основные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. В основу работы положены результаты комплексного клиничко-морфологического обследования 140 больных СРП, находившихся под наблюдением и на лечении в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» г. Барнаула. Средний возраст пациентов составил $57,0 \pm 0,8$ лет (min. – 34; max. – 74; moda – 57). Мужчин в исследовании было 67 (47,8%), женщин – 73 (52,2%). Средний наибольший размер опухолевого узла равен $6,6 \pm 0,2$ см. (min. – 1 см; max – 18 см.; mediana – 7 см).

При группировке по клиническим стадиям I стадии (T1N0M0) соответствовали 86 (61,4%) наблюдений; II стадии (T2N0M0) – 19 (13,6%) случаев; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 25 (17,9%); IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, T любая N2M0, T любая N любая M1) – 10 (7,1%). При распределении опухолей по S.A.Fuhrman (1982): степень анаплазии G1 была отмечена в 55 (39,3%) опухолей; степень GII – в 42 (30%); степень GIII – в 30 (21,4%) и степень GIV – в 13 (9,3%). Метастазирующих опухолей было 18 (12,6%), локализованных карцином – 122 (87,4%).

Методы исследования. Для *гистологического исследования* использовали удаленную почку. Сразу после операции не менее 7 фрагментов забирали из опухоли и из визуально неизмененных участков органа, максимально отдаленных от опухоли. Гистологический материал маркировали, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина от 12 до 24 ч, обезвоживали, просветляли и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 – 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимических (ИГХ) исследований срезы обрабатывали в автоматическом стейнере Ventana XT. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM 750 (Германия) и цифровой видеокамеры Leica EC3 (Германия). Морфометрическое и морфоденситофотомерическое исследование проводили с помощью пакета программ ВидеоТест – Морфология 5.2 (Санкт-Петербург, Россия).

Для **ИГХ реакций** использовали стрептавидин-биотиновый метод с применением систем визуализации EnVision+DualLink (Dako, Дания) и Vi-oGenex Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Dako, Дания). В обоих случаях был использован хромоген DAB (3,3'-Diaminobenzidine, диаминобензидин). С помощью ИГХ анализа изучали степень экспрессии молекулярно-биологических маркеров, отражающих характеристики и особенности опухолевого ангиогенеза (васкуляризации, тучных клеток, макрофагов, MMP-9) и факторов, влияющих на него. Используются антитела к CD31, CD68, CD117, Ki-67, p53, Nucleophosmin p/B23, bcl-2, MMP-9.

При **морфометрическом исследовании сосудов** микроциркуляторного русла в автоматическом режиме определяли количество сосудов микроциркуляции в 3 полях зрения при увеличении микроскопа в 400 раз, среднюю площадь сосуда (мкм²), среднюю длину окружности сосуда (мкм), средний диаметр сосуда (мкм), суммарную площадь сосудов (мкм²) и суммарную длину окружности сосудов (мкм) в 5 полях зрения при увеличении микроскопа x400. Площадь одного поля зрения при объективе x40 составляла 1,7x10⁵ мкм². Посчитывали также количество макрофагов и тучных клеток.

Все цифровые данные, полученные в работе, подвергали **статистической обработке**, использовали программный пакет для статистического анализа «STATISTICA 6» (StatSoft, Dell, USA). Вычисляли M – среднюю арифметическую и m – ошибку средней арифметической. При нормальном распределении данных в результате проверки статистических гипотез применяли методы параметрической статистики (t–тест Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения, то использовали тест Колмогорова-Смирнова или U-тест Манна-Уитни. Коррелятивные взаимоотношения оценивали с помощью критерия Пирсона и коэффициента Спирмена. Различия считали статистически значимыми при p≤0,05 (Боровиков В., 2001; Вуколов Э.А., 2004; Халафяц А.А., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-морфологические показатели перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки в зависимости от параметров ангиогенеза. Средние значения показателей для всех пациентов, независимо от пола, возраста, размеров опухолевого узла, стадии TNM, степени атипии по Fuhrman и наличия регионарных и отдаленных метастазов, были следующими: количество сосудов – 17,7±1,5 (разброс значений от 5 до 58), площадь сосуда – 949,52±21,3 мкм² (пределы колебаний от 114,7 до 38830 мкм²), длина окружности сосуда – 112,2±7,0 мкм (от 41,1 до 245,4 мкм), средний диаметр сосуда – 34,9±2,1 мкм (от 12,75 до 73,8 мкм), суммарная площадь сосуда – 10700±757,3 мкм² (от 2213,5 до 25444,1 мкм²), суммарная длина окружности сосуда – 1575,9±66,4 мкм (от 527,4 до 2920,1 мкм). Среднее число макрофагов в 5 полях зрения при увеличении x400 в перитуморозной зоне равнялось 8,7±1,2 (колебания от 1,3 до 35,3), тучных клеток – 3,8±0,5 (от 0,3 до 25,7).

Проанализированы параметры ангиогенеза в перитуморозной зоне в зависимости от пола больных (табл. 1).

Таблица 1. Морфометрический анализ ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП в зависимости от пола больных (M±m)

Параметры ангиогенеза	Пол больных		
	Мужчины	Женщины	p
Количество сосудов	17,4±1,2	15,6±0,8	0,2
Площадь сосуда, мкм ²	691,2±28,3	608,5±3,4	0,04
Длина окружности сосуда, мкм	95,7±1,9	88,2±1,7	0,003
Диаметр сосуда, мкм	29,2±0,5	28,7±0,5	0,5
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	11314,9±603,9	9018,1±543,5	0,005
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1646,2±66,1	1384,7±52,45	0,002

У пациентов мужского пола площадь сосуда, длина окружности сосуда, суммарная площадь сосуда и суммарная длина окружности сосуда были статистически значимо больше на 13,7%, 8,2%, 25,5% и 18,9%, соответственно, чем у женщин. Таким образом, у мужчин, в отличие от женщин, отмечали более высокие показатели ангиогенеза в перитуморозной зоне (см табл. 1). Такие различия могут быть обусловлены разным гормональным статусом.

Исследованы параметры ангиогенеза в перитуморозной зоне опухолей в зависимости от возраста больных (табл. 2). Установлено, что в возрастной группе от 30 до 39 лет были наименьшие значения большинства параметров ангиогенеза в перитуморозной зоне опухоли, затем показатели васкуляризации нарастали, а после 69 лет некоторые показатели продолжали увеличиваться (площадь сосуда, длина окружности сосуда и средний диаметр сосуда), тогда как другие снижались (количество сосудов, суммарная площадь сосуда и суммарная длина окружности сосуда) (см. табл. 2). Наиболее вероятно, что такие изменения являются свидетельством возрастных изменений обменных процессов в организме.

Таблица 2. Морфометрический анализ ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП в зависимости от возраста больных (M±m)

Возраст, лет	Количество сосудов	Площадь сосуда, мкм ²	Длина окружности сосуда, мкм	Диаметр сосуда, мкм	Суммарная площадь сосудов, мкм ²	Суммарная длина окружности сосудов, мкм
30-39 (1)	17,7±1,4	364,0±28,0	74,1±2,7	23,1±0,8	6439,7±957,85	1311,5±136,5
40-49 (2)	16,2±1,4	652,9±45,1	90,4±2,8	27,6±0,8	10051,5±813,7	1417,5±75,0
50-59 (3)	16,8±1,0	552,1±23,5	86,9±1,7	29,1±0,6	9308,55±666,5	1467,4±61,4
60-69 (4)	18,05±2,2	740,05±47,1	95,4±2,7	29,3±0,8	12072,6±921,0	1764,6±110,1
70-79 (5)	11,1±1,1	1062,8±122,6	125,7±6,9	37,7±2,0	9806,8±1039,0	1302,3±88,9

Примечание: для количества сосудов $p1-5 = 0,001$; $p2-5 = 0,03$; $p3-5 = 0,007$; $p4-5 = 0,005$. Для площади сосуда $p1-2 = 0,002$; $p1-3 = 0,003$; $p1-4 = 0,00035$; $p1-5 = 0,0000001$; $p2-3 = 0,003$; $p2-5 = 0,0002$; $p3-4 = 0,0001$; $p3-5 = 0,0000001$; $p4-5 = 0,005$. Для суммарной длины окружности сосуда $p1-2 = 0,007$; $p1-3 = 0,006$; $p1-4 = 0,0006$; $p1-5 = 0,0000001$; $p2-5 = 0,0000001$; $p3-4 = 0,006$; $p3-5 = 0,0000001$; $p4-5 = 0,000005$. Для среднего диаметра сосуда $p1-2 = 0,01$; $p1-3 = 0,00009$; $p1-4 = 0,0007$; $p1-5 = 0,0000001$; $p2-5 = 0,0000001$; $p3-5 = 0,0000001$; $p4-5 = 0,000006$. Для суммарной площади сосуда $p1-2 = 0,05$; $p1-4 = 0,01$; $p1-5 = 0,04$; $p3-4 = 0,01$. Для суммарной длины окружности сосуда $p2-4 = 0,01$; $p3-4 = 0,01$; $p4-5 = 0,02$.

При исследовании ангиогенеза в перитуморозной зоне карцином в зависимости от клинической стадии опухолевого процесса установлено, что на поздних стадиях заболевания (стадии III – IV) количество сосудов уменьшалось на 72,6%, в то время как площадь сосуда, длина окружности сосуда, средний диаметр сосуда и суммарная площадь сосуда возрастали в 2,7 раза, на 76,6%, 63,8% и 50,3%, соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Морфометрический анализ ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП в зависимости от клинической стадии заболевания (M±m)

Стадии	Количество сосудов	Площадь сосуда, мкм ²	Длина окружности сосуда, мкм	Диаметр сосуда, мкм	Суммарная площадь сосудов, мкм ²	Суммарная длина окружности сосудов, мкм
I-II	19,5±1,0	450,8±18,8	76,5±1,2	24,85±0,4	8530,6±433,3	1535,9±56,3
III-IV	11,3±0,6	1225,3±56,8	135,1±3,3	40,7±0,9	12819,4±758,45	1456,2±62,3

Примечание: для количества сосудов $p = 0,000001$; для площади сосуда $p = 0,001$; для длины окружности сосуда $p = 0,001$; для среднего диаметра сосуда $p = 0,001$; для суммарной площади сосуда $p = 0,0000001$; для суммарной длины окружности сосуда $p = 0,4$.

Анализ параметров ангиогенеза в перитуморозной зоне в зависимости от степени ядерной атипии по Fuhrman выявил, что при высоких степенях анаплазии по Fuhrman (GIII – IV) количество сосудов уменьшалось (в 1,9 раза), а площадь сосуда, длина окружности сосуда, средний диаметр сосуда и суммарная площадь сосуда возрастали (соответственно в 3,7 раза, 1,9 раза, на 78%, в 1,8 раза) по сравнению с низкими степенями (GI – II) (табл. 4).

Таблица 4. Морфометрический анализ ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП в зависимости от степени анаплазии по Fuhrman (G) (M±m)

G	Количество сосудов	Площадь сосуда, мкм ²	Длина окружности сосуда, мкм	Диаметр сосуда, мкм	Суммарная площадь сосудов, мкм ²	Суммарная длина окружности сосудов, мкм
GI – GII	20,9±1,1	345,18±14,75	71,6±1,1	23,45±0,4	7462,9±384,0	1500,1±59,35
GIII – GIV	11,1±0,5	1287,45±54,8	139,0±3,1	41,85±0,9	13327,1±672,4	1514,9±60,2

Примечание: для ПМЦР p = 0,000001; для СПС p = 0,001; для СПрС p = 0,001; для СДС p = 0,001; для ССПС p = 0,0000001; для ССПрС p = 0,9.

При анализе параметров ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП в зависимости от размера опухолевого узла установлено, что увеличение размеров опухолевого узла в перитуморозной зоне сопровождалось уменьшением количества сосудов (на 41%) и периметра сосудов, в то время как площадь сосуда, длина окружности сосуда, средний диаметр сосуда и суммарная площадь сосуда увеличивались (соответственно в 3 раза, 1,8 раза, на 8%, в 1,6 раза) (табл. 5).

Таблица 5. Морфометрический анализ сосудов в перитуморозной зоне СРП в зависимости от размера опухолевого узла (M±m)

Параметры ангиогенеза	Размер опухолевого узла		
	< 7 см	> 7 см	p
Количество сосудов	20,2±1,1	11,9±0,6	0,0000001
Площадь сосуда, мкм ²	390,3±15,7	1166,6±51,2	0,001
Длина окружности сосуда, мкм	73,05±1,1	128,35±2,9	0,001
Диаметр сосуда, мкм	22,6±0,3	41,6±0,9	0,001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	7968,0±407,7	12705,5±693,1	0,0000001
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1532,7±62,4	1475,3±55,2	0,001

При морфометрической оценке ангиогенеза в перитуморозной зоне в зависимости от метастатического потенциала новообразования установлено, что по сравнению с перитуморозной зоной локализованных карцином имело место уменьшение количества сосудов, суммарной длины окружности сосуда и возрастание площади сосуда, длины окружности сосуда, среднего диаметра сосуда и суммарной площади сосуда (соответственно в 2,7 раза, 1,7 раза, на 62%, в 1,45 раза) (табл. 6).

Таблица 6. Морфометрический анализ ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП в зависимости от наличия метастазов (M±m)

Параметры ангиогенеза	Наличие метастазов		
	Метастазы отсутствуют	Метастазы имеются	p
Количество сосудов	18,35±0,9	10,9±0,7	0,0000006
Площадь сосуда, мкм ²	505,0±18,5	1344,2±77	0,001
Длина окружности сосуда, мкм	81,1±1,2	141,4±4,35	0,001
Диаметр сосуда, мкм	26,1±0,4	42,4±1,2	0,001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	9045,7±403,75	13120,2±1004,4	0,00001
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1531,5±49,7	1435,7±80,7	0,3

Можно заключить, что параметры ангиогенеза в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки взаимосвязаны с рядом важных прогностических клиничко-анатомических факторов. С возрастанием клинической стадии заболевания и степени анаплазии опухолей происходило уменьшение количества сосудов, но в то же время значительно изменялись морфологические характеристики сосудов – возрастали площадь сосуда, суммарная площадь сосуда, длина окружности сосуда и средний диаметр сосуда. Уменьшение количества сосудов с параллельным возрастанием площади, длины окружности, среднего диаметра сосуда и суммарной площади сосудов можно рассматривать в качестве критериев вероятного возникновения метастазов.

Количественный анализ тучных клеток в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки в зависимости от клиничко-морфологических параметров. Статистически значимых различий в численности тучных клеток в перитуморозной зоне в зависимости от пола не найдено (табл. 7), хотя следует отметить меньшее значение этого показателя (на 19%) у женщин.

Таблица 7. Количество тучных клеток в 5 полях зрения при увеличении в 400 раз в перитуморозной зоне в зависимости от клиничко-морфологических характеристик СРП (M±m)

Показатель	Количество тучных клеток	p
Пол больных		
Мужчины	4,1±0,4	0,2
Женщины	3,3±0,4	
Возраст больных (лет)		
30-39 (1)	1,8±0,4	
40-49 (2)	2,8±0,4	
50-59 (3)	4,0±0,4	
60-69 (4)	3,5±0,4	
70-79 (5)	6,4±2,6	
Клиническая стадия		
I – II стадия	2,1±0,2	0,0000001
III – IV стадия	6,8±0,7	
Степень анаплазии (G)		
GI – GII	1,6±0,1	0,0000001
GIII – GIV	7,6±0,15	
Размер опухолевого узла		
< 7,0 см	2,4±0,2	0,0000001
≥ 7,0 см	6,0±0,7	
Наличие метастазов		
Без метастазов	2,5±0,2	0,0000001
С метастазами	9,3±1,0	

При анализе численности тучных клеток в перитуморозной зоне в зависимости от возраста пациентов выявлено, что наиболее высокие показатели числа тучных клеток наблюдали в возрастной группе больных от 70 до 79 лет, а наиболее низкие – в возрастной группе от 30 до 39 лет. При этом между группами 40 – 49 лет и 70 – 79 лет найдено статистически значимое отличие в 2,3 раза (см. табл. 7).

Анализ численности тучных клеток в перитуморозной зоне в зависимости от клинической стадии опухолевого процесса позволил обнаружить, что у пациентов с I – II клинической стадией заболевания среднее количество этих клеток составило 2,2±0,2, а при III – IV стадиях оно увеличилось в 3,2 раза. То есть при III и IV клинических стадиях заболевания происходит увеличение количества тучных клеток в перитуморозной зоне по сравнению с более ранними стадиями патологического процесса (см. табл. 7).

Изучение взаимосвязи количества тучных клеток в перитуморозной зоне и степени ядерной атипии позволило установить следующее: с увеличением степени ядерной атипии

по Fuhrman обнаружено увеличение числа тучных клеток. При степенях анаплазии GI-GII содержание тучных клеток в перитуморозной зоне составило $1,6 \pm 0,1$, а при степенях GIII-GIV оно возрастало в 4,75 раза (см. табл. 7).

При изучении содержания тучных клеток в перитуморозной зоне в зависимости от размера опухоли было выявлено, что при размере опухолевого узла $\geq 7,0$ см численность этих клеток статистически значимо увеличивалась в 2,5 раза (см. табл. 7) (рис. 1).

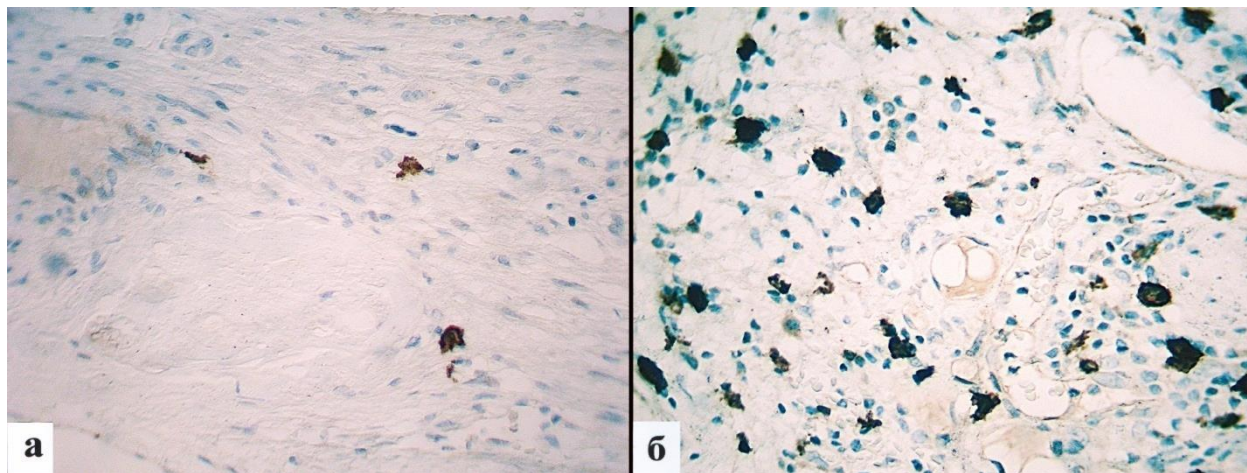


Рис. 1. Плотность распределения тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от размера опухолевого узла: а – единичные тучные клетки в карциноме < 7 см; б – большое количество тучных клеток в опухоли > 7 см. Иммуногистохимическая реакция с антителами против CD117. $\times 400$.

Анализ количества тучных клеток в перитуморозной зоне первичного СРП в зависимости от его метастатического потенциала показал, что при наличии метастазов этот показатель статистически значимо возрастал в 3,7 раза (см. табл. 7). Таким образом, в перитуморозной зоне опухолей с высоким метастатическим потенциалом количество тучных клеток значительно возрастало, что может свидетельствовать о существенной роли этих клеток в усилении метастатического потенциала опухолей.

Можно сделать заключение, что количество тучных клеток в перитуморозной зоне СРП взаимосвязано с рядом важных клинико-морфологических факторов, имеющих значение для прогноза почечно-клеточного рака. В перитуморозной зоне карцином III – IV стадий, большого размера, степени анаплазии GIII – IV и с наличием метастазов найдено наиболее высокое содержание тучных клеток.

Количественный анализ макрофагов в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки в зависимости от клинико-морфологических параметров. Статистически значимых отличий численности этих макрофагов в зависимости от пола не обнаружено, хотя у мужчин количество макрофагов в перитуморозной зоне было увеличено (на 18%) (табл.8).

Анализ количества макрофагов в перитуморозной зоне в зависимости от возраста пациентов выявил наиболее высокие значения этого показателя в возрастных группах 40 – 49 и 70 – 79 лет (увеличение соответственно в 5,3 и 5,4 раза) по сравнению с возрастной группой 30 – 39 лет (см. табл. 8).

Анализ числа макрофагов в перитуморозной зоне в зависимости от клинической стадии опухолевого процесса позволил обнаружить, что при возрастании клинической стадии опухолевого процесса происходит возрастание числа макрофагов в перитуморозной зоне СРП (в 3,9 раза) (см. табл. 8). Также установлено, что при размере опухолевого узла $\geq 7,0$ см количество макрофагов статистически значимо увеличивалось в 3,1 раза, то есть при увеличении опухолевого узла количество макрофагов в нем возрастало (см. табл. 8).

При анализе количества макрофагов в перитуморозной зоне первичной опухоли почки в зависимости от ее метастатического потенциала установлено, что при наличии метастазов этот показатель статистически значимо возрастал в 3,3 раза (см. табл. 8) (рис. 2).

Таблица 8. Количество макрофагов в 5 полях зрения при увеличении в 400 раз в перитуморозной зоне в зависимости от клиничко-морфологических характеристик СРП (M±m)

Показатель	Количество тучных клеток	p
Пол больных		
Мужчины	9,5±1,1	0,3
Женщины	7,8±1,1	
Возраст больных (лет)		
30-39 (1)	2,0±0,1	p1-2 = 0,3
40-49 (2)	10,6±2,0	
50-59 (3)	7,3±0,9	p1-3 = 0,2; p2-3 = 0,08
60-69 (4)	8,0±1,2	p1-4 = 0,2; p2-4 = 0,3; p3-4 = 0,4
70-79 (5)	10,8±4,4	p1-5 = 0,3; p2-5 = 0,04 ; p3-5=0,1
Клиническая стадия		
I – II стадия	4,1±0,6	0,0000001
III – IV стадия	16,0±1,3	
Степень анаплазии (G)		
GI – GII	2,4±0,1	0,0000001
GIII – GIV	17,8±1,0	
Размер опухолевого узла		
< 7,0 см	4,2±0,6	0,0000001
≥ 7,0 см	13,1±1,2	
Наличие метастазов		
Без метастазов	5,4±0,6	0,0000001
С метастазами	17,7±1,6	

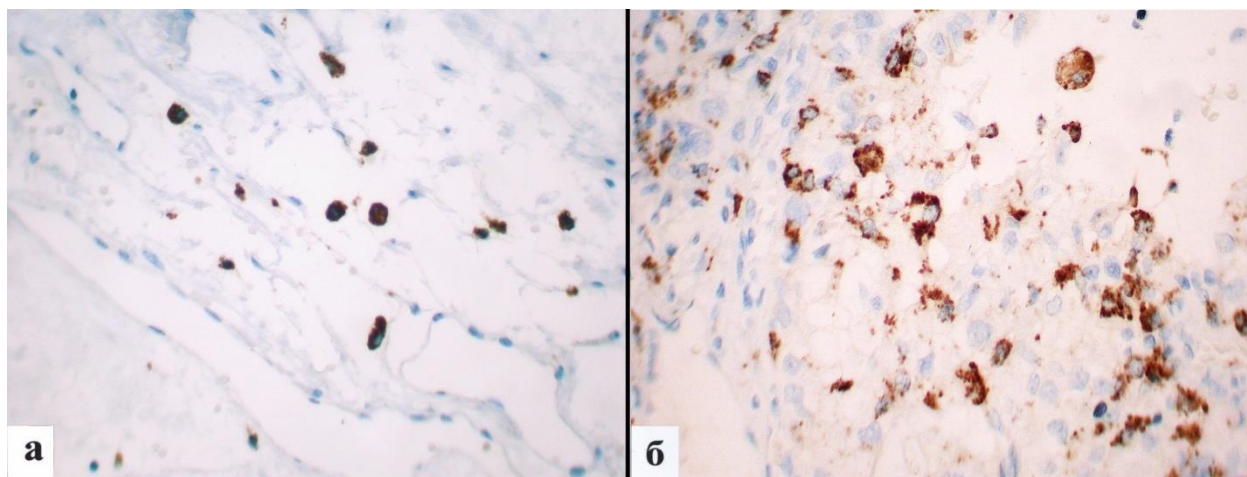


Рис. 2. Количество макрофагов в перитуморозной зоне в зависимости от метастатического потенциала СРП: а – единичные CD68+ клетки в локализованной карциноме; б – высокое содержание макрофагов в опухоли с наличием метастазов. Иммуногистохимическая реакция с антителами против CD68. x400.

Таким образом, содержание макрофагов в перитуморозной зоне было взаимосвязано с рядом важных клиничко-морфологических параметров прогноза СРП. В перитуморозной зоне карцином III – IV стадий, опухолей большого размера, степени анаплазии GIII – IV и с наличием метастазов наблюдали возрастание количества макрофагов.

Молекулярно-биологические особенности светлоклеточного рака почки и параметры васкуляризации перитуморозной зоны.

Экспрессия маркеров пролиферации и параметры ангиогенеза в перитуморозной зоне. При ИМ Ki-67 < 9% в клетках опухоли количество сосудов составляло 18±0,8; площадь сосуда – 562,3±20,7 мкм²; длина окружности сосуда – 84,8±1,3 мкм; средний диаметр

сосуда – $27,2 \pm 0,4$ мкм; суммарная площадь сосуда – $9751,3 \pm 491,1$; суммарная длина окружности сосуда – $1561,8 \pm 29,2$; число макрофагов – $6,1 \pm 0,7$, количество тучных клеток – $2,8 \pm 0,2$. При ИМ Ki-67 > 9% количество сосудов уменьшалось на 50%; а площадь, длина окружности, средний диаметр сосуда, суммарная площадь сосудов, количество макрофагов и тучных клеток увеличивались на 85%, 46,3%, 34,2%, 15,6%, в 2,7 и 2,9 раза, соответственно (табл. 9) (рис. 3).

Таблица 9. Параметры васкуляризации, число макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от экспрессии Ki-67 (M±m)

Параметры	ИМ Ki-67 < 9%	ИМ Ki-67 ≥ 9%	p
Количество сосудов	$18 \pm 0,8$	$12 \pm 1,4$	0,0003
Площадь сосуда, мкм ²	$562,3 \pm 20,7$	$1040,5 \pm 65,9$	0,0000001
Длина окружности сосуда, мкм	$84,8 \pm 1,3$	$121,8 \pm 3,8$	0,0000001
Диаметр сосуда, мкм	$27,2 \pm 0,4$	$36,5 \pm 1,1$	0,0000001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	$9751,3 \pm 491,1$	$11057,7 \pm 721,3$	0,1
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	$1561,8 \pm 29,2$	$1351,1 \pm 80,9$	0,003
Количество макрофагов	$6,1 \pm 0,7$	$16,5 \pm 1,8$	0,0000001
Количество тучных клеток	$2,8 \pm 0,2$	$8,2 \pm 1,1$	0,0000001

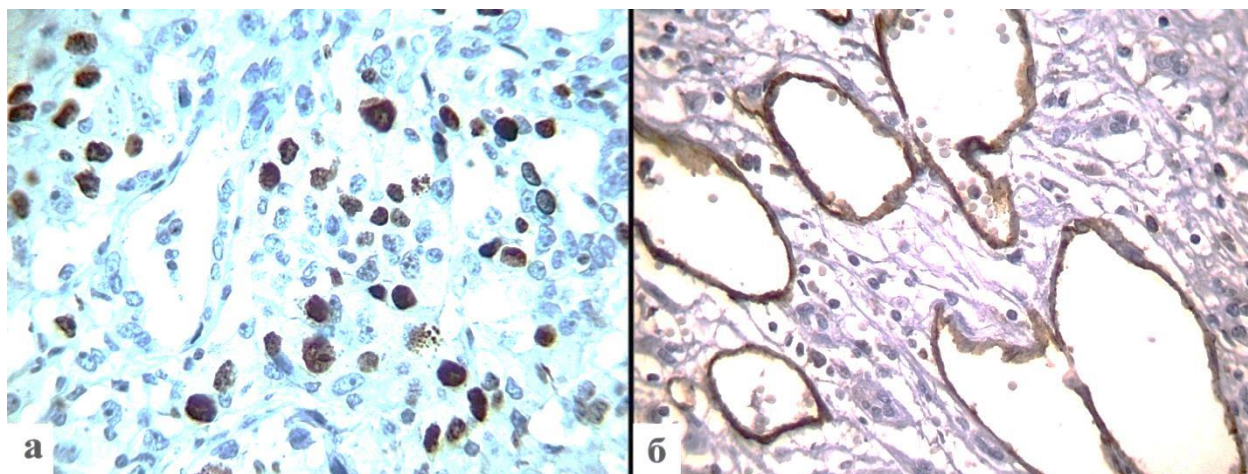


Рис. 3. Количество сосудов в перитуморозной зоне СРП в зависимости от индекса мечения маркера пролиферации Ki-67. Высокий индекс мечения Ki-67 (а) сопровождается присутствием сосудов (CD31+) большой площади (б). Иммуногистохимическая реакция. х 400.

При ИОП нуклеофозмина/В23в клетках опухоли < 1500 отн. ед. в перитуморозной зоне карцином количество сосудов составляло $17,7 \pm 1,1$; площадь сосуда – $516,1 \pm 22,9$ мкм²; длина окружности сосуда – $81,2 \pm 1,5$ мкм; средний диаметр сосуда – $26,8 \pm 0,5$ мкм; суммарная площадь сосудов – $9059,7 \pm 531,4$ мкм²; суммарная длина окружности сосудов – $1485,3 \pm 64,9$ мкм; количество макрофагов – $5,2 \pm 0,8$, количество тучных клеток – $3,5 \pm 0,5$. При ИОП нуклеофозмина/В23 > 1500 отн. ед. количество сосудов уменьшалось на 65,4% вместе с повышением площади сосуда, длины окружности, среднего диаметра сосуда, суммарной площади сосудов, количества макрофагов и тучных клеток в 2,7 раза, на 76,6%, 59,7%, 51,1%, в 3,4 и 2,3 раза, соответственно. То есть ИОП нуклеофозмина/В23 находилась во взаимосвязи с уровнем ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП (табл. 10) (рис. 4).

При увеличении ИНДНК ≥ 4,5с, количество сосудов и суммарная длина окружности сосудов статистически значимо снижались на 88,2% и 17%, соответственно, на фоне возрастания площади, длины окружности, среднего диаметра сосуда, суммарной площади сосудов, количества макрофагов и тучных клеток соответственно в 3 раза, на 75,2%, 81,5%, 37,4%, в 3,2 и 3,5 раза по сравнению с опухолями, в которых ИНДНК < 4,5с. Пloidность опухоли была взаимосвязана с уровнем ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП (табл. 11).

Таблица 10. Параметры васкуляризации, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от ИОП нуклеофозмина/В23 в опухоли (M±m)

Параметр	ИОП нуклеофозмина <1500, отн. ед.	ИОП нуклеофозмина >1500, отн. ед.	p
Количество сосудов	17,7±1,1	10,7±0,8	0,000006
Площадь сосуда, мкм ²	516,1±22,9	1380,6±83,1	0,001
Длина окружности сосуда, мкм	81,2±1,5	143,4±4,6	0,001
Диаметр сосуда, мкм	26,8±0,5	42,8±1,3	0,001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	9059,7±531,4	13688,8±979,9	0,00001
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1485,3±64,9	1533,8±89	0,7
Количество макрофагов	5,2±0,8	17,9±1,7	0,0000001
Количество тучных клеток	3,5±0,5	8,2±1,1	0,0000001

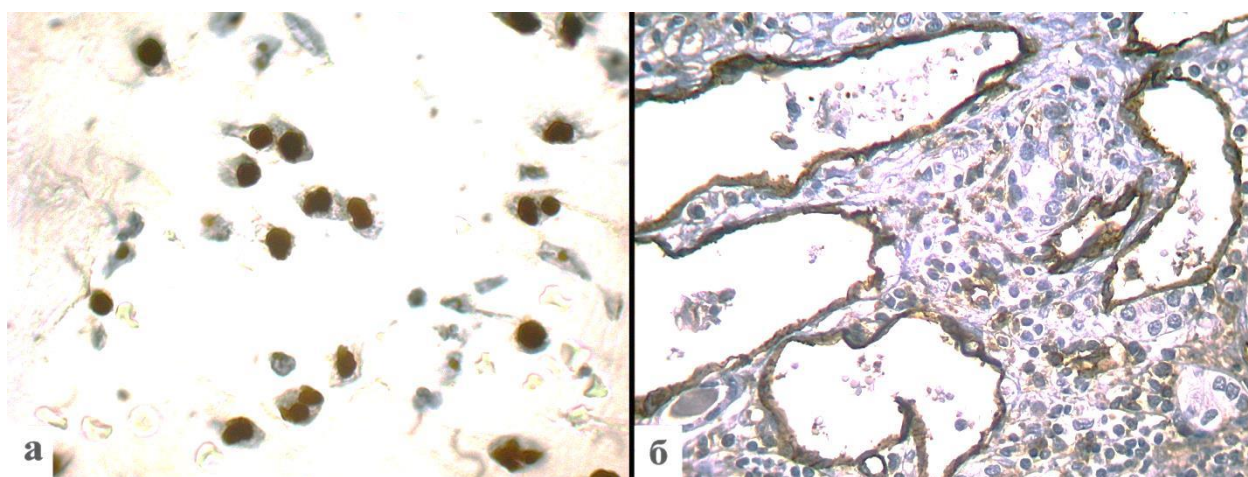


Рис. 4. Количество сосудов в перитуморозной зоне в зависимости от экспрессии нуклеофозмина/В23 в ядрышках клеток СРП. Высокий уровень экспрессии нуклеофозмина/В23 (а) сопровождается присутствием сосудов большой площади (б). а – иммуногистохимическая реакция с антителами против нуклеофозмина/В23; б – иммуногистохимическая реакция с антителами против CD31. х 400.

Таблица 11. Параметры васкуляризации, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от плоидности опухоли (M±m)

Параметры	ИНДНК < 4,5с	ИНДНК ≥ 4,5с	p
Количество сосудов	22,4±1,3	11,9±0,6	0,0000001
Площадь сосуда, мкм ²	356,9±14,8	1063,7±44,1	0,001
Длина окружности сосуда, мкм	69,7±1,2	122,1±2,5	0,001
Диаметр сосуда, мкм	21,6±0,3	39,2±0,75	0,001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	8268±536,7	11358,8±565	0,0002
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1648,05±75,8	1408,9±47,4	0,005
Количество макрофагов	4,0±0,7	12,8±1,2	0,0000001
Количество тучных клеток	2,05	7,3±0,7	0,0000001

Экспрессия маркеров апоптоза в опухоли и параметры ангиогенеза в перитуморозной зоне. При уровне экспрессии p53 > 10% количество сосудов уменьшалось на 70,1%; площадь сосуда, длина окружности сосуда, средний диаметр сосуда, суммарная площадь сосудов, количество макрофагов и тучных клеток увеличивались в 2,3 раза, на 60,4%, 48,7%, 22,5%, в 2,4 раза и на 75,6%, соответственно, по сравнению с опухолями, в которых уровень экспрессии p53 < 10% (табл. 12) (рис. 5).

Таблица 12. Параметры васкуляризации, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от экспрессии p53 (M±m)

Параметры	p53 < 10%	p53 ≥ 10%	p
Количество сосудов	18,2±1,0	10,7±0,8	0,000008
Площадь сосуда, мкм ²	531,1±18,9	1234,9±81,6	0,001
Длина окружности сосуда, мкм	84,0±1,3	134,75±4,6	0,001
Диаметр сосуда, мкм	27,1±0,4	40,3±1,3	0,001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	9812,0±511,5	12020,2±937,1	0,03
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1599,5±59,2	1439,7±85,1	0,1
Количество макрофагов	6,0±0,7	14,2±1,6	0,0000001
Количество тучных клеток	4,1±0,5	7,2±1,2	0,004

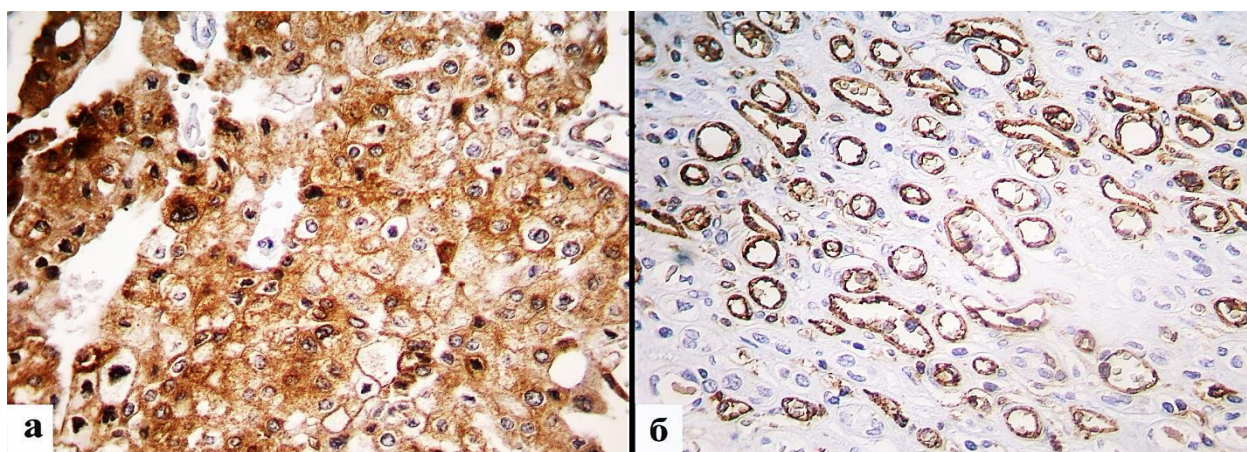


Рис. 5. Количество сосудов в перитуморозной зоне СРП в зависимости от экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2: а – высокая экспрессия bcl-2 в клетках карциномы (а) связано со значительным количеством сосудов небольшой площади. а – иммуногистохимическая реакция с антителами против bcl-2; б – иммуногистохимическая реакция с антителами против CD31. х400.

В перитуморозной зоне СРП при экспрессии маркера bcl-2(+) (1-4 балла) количество сосудов составляло 17,1±1,0; площадь сосуда – 586,7±22,9 мкм²; длина окружности – 89,4±1,6 мкм; средний диаметр – 28,8±0,5 мкм; суммарная площадь сосудов – 9599,0±485,05 мкм²; суммарная длина окружности сосудов – 1556,8±62,4 мкм; количество макрофагов – 8,1±1,0, количество тучных клеток – 4,5±0,6. В bcl-2(-) карциномах (экспрессия маркера 0 баллов) количество сосудов было снижено на 36,8%, в то время как площадь сосуда, длина окружности, средний диаметр сосуда, суммарная площадь сосудов и количество макрофагов увеличены на 88,8%, 33,2%, 25,7%, 32,9% и в 2 раза, соответственно (см. табл. 24). Эти данные позволяют заключить, что Bcl-2 статус опухоли взаимосвязан с уровнем ангиогенеза в перитуморозной зоне СРП (табл. 13) (см. рис. 5).

Таблица 13. Параметры ангиогенеза, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от bcl-2 статуса опухоли (M±m)

Параметры	bcl-2(+), 1-4 балла	bcl-2(-), 0 баллов	p
Количество сосудов	17,1±1,0	12,5±1,0	0,004
Площадь сосуда, мкм ²	586,7±22,9	1107,6±65,6	0,0000001
Длина окружности сосуда, мкм	89,4±1,6	119,1±3,5	0,0000001
Диаметр сосуда, мкм	28,8±0,5	36,2±1,0	0,0000001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	9599,0±485,05	12754,4±913,85	0,001
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1556,8±62,4	1430,25±67,8	0,1
Количество макрофагов	8,1±1,0	16,4±1,8	0,00003
Количество тучных клеток	4,5±0,6	6,2±0,6	0,1

Экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 в клетках светлоклеточного рака почки и параметры ангиогенеза в перитуморозной зоне. При ИОП ММП-9 ≥ 2800 отн. ед. количество сосудов уменьшалось на 82,9%; в то время как площадь сосуда, длина окружности сосуда, средний диаметр сосуда, суммарная площадь сосудов, количество макрофагов и тучных клеток увеличивались в 4,4; 2; 2; 2,3; 4,9 и 5,9 раза, соответственно. То есть, при увеличении параметров ангиогенеза, количества макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне в опухолевых клетках возрастала ИОП ММП-9 (табл. 14).

Таблица 14. Параметры ангиогенеза, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от ИОП ММП-9 в клетках опухоли (M \pm m)

Параметры	ИОП ММП-9 < 2800 отн. ед.	ИОП ММП-9 ≥ 2800 отн. ед.	P
Количество сосудов	21,4 \pm 1,95	11,7 \pm 0,75	0,0000001
Площадь сосуда, мкм ²	298,5 \pm 15,2	1317,3 \pm 80,2	0,0000001
Длина окружности сосуда, мкм	68,3 \pm 1,9	139,1 \pm 4,4	0,001
Диаметр сосуда, мкм	21,2 \pm 0,6	42,1 \pm 1,2	0,001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	6394,1 \pm 742,15	14679,4 \pm 983,2	0,0000002
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1672,5 \pm 205,9	1655,1 \pm 98,8	0,9
Количество макрофагов	2,7 \pm 0,3	13,1 \pm 1,5	0,0001
Количество тучных клеток	1,1 \pm 0,2	6,5 \pm 0,7	0,00008

Плотность воспалительного инфильтрата и экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 в его клетках в зависимости от уровня ангиогенеза в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки. При увеличении плотности воспалительного инфильтрата в опухоли ≥ 25 клеток количество сосудов было снижено на 25,6%; площадь сосуда, длина окружности, средний диаметр сосуда, суммарная площадь сосуда, количество макрофагов и тучных клеток статистически значимо увеличивались на 59,2%, 28,1%, 20,7%, 35,8%, 42,5% и 37,1%, соответственно (табл. 15).

Таблица 15. Параметры ангиогенеза, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от плотности воспалительного инфильтрата в опухоли (M \pm m)

Параметры	Плотность воспалительного инфильтрата < 25 клеток	Плотность воспалительного инфильтрата ≥ 25 клеток	p
Количество сосудов	17,9 \pm 1,1	14,25 \pm 0,8	0,01
Площадь сосуда, мкм ²	540,1 \pm 23,4	859,7 \pm 39,7	0,0000001
Длина окружности сосуда, мкм	83,7 \pm 1,5	107,2 \pm 2,4	0,0000001
Диаметр сосуда, мкм	27,1 \pm 0,5	32,7 \pm 0,7	0,0000001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	8819,7 \pm 488,1	11981,4 \pm 676,9	0,0001
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1478,5 \pm 58,3	1549,1 \pm 60,0	0,1
Количество макрофагов	7,3 \pm 1,0	10,4 \pm 1,2	0,05
Количество тучных клеток	3,5 \pm 0,4	4,8 \pm 0,5	0,05

При ИОП ММП-9 в клетках воспалительного инфильтрата ≥ 2400 отн. ед. количество сосудов и суммарная длина окружности сосуда снизились на 53,6% и 29,1%, соответственно; площадь сосуда, длина окружности сосуда, средний диаметр сосуда, количество макрофагов и тучных клеток возрастало на 91,3%, 37,8%, 35,8%, в 3,4 и 3,2 раз. При увеличении площади сосуда, длины окружности, среднего диаметра сосуда, количества макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне ИОП ММП-9 в клетках воспалительного инфильтрата возрастала (табл. 16).

Таблица 16. Параметры ангиогенеза, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП в зависимости от ИОП ММП-9 в клетках воспалительного инфильтрата в опухоли (M±m)

Параметры	ИОП ММП-9 < 2400 отн. ед.	ИОП ММП-9 ≥ 2400 отн. ед.	p
Количество сосудов	17,2±1,5	11,2±0,9	0,0009
Площадь сосуда, мкм ²	672,1±48,4	1285,8±95,0	0000001
Длина окружности сосуда, мкм	95,45±3,1	131,5±5,1	0000001
Диаметр сосуда, мкм	29,45±0,9	40,0±1,45	0,0000001
Суммарная площадь сосудов, мкм ²	11288,95±1048,2	13766,9±1211,7	0,1
Суммарная длина окружности сосудов, мкм	1837,05±140,2	1423,2±89,3	0,002
Количество макрофагов	4,7±0,8	15,9±2,05	0,000001
Количество тучных клеток	2,1±0,3	6,8±0,8	0,0000001

Корреляционные связи клинико-морфологических и молекулярно-биологических факторов с параметрами ангиогенеза в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки. При рассмотрении результатов изучения *корреляционных связей количественных показателей микроциркуляции в перитуморозной СРП с клинико-морфологическими и молекулярно-биологическими факторами* следует отметить, что сильные и очень сильные корреляционные связи (коэффициент корреляции > 0,6) выявлены преимущественно для макрофагов и тучных клеток.

При корреляционном анализе выявлены высокие умеренные и сильные корреляционные связи количества макрофагов в перитуморозной зоне карцином: со стадией по TNM (r=0,66; p=0,0001); размером опухоли (r=0,52; p=0,0001); градацией по Fuhrman (r=0,80; p=0,0001); наличием метастазов (r=0,62; p=0,001); ИНДНК (r=0,66; p=0,0001); экспрессией Ki-67 (r=0,51; p=0,0001); нуклеофозмина В/23 (r=0,71; p=0,0001); p53 (r=0,53; p=0,0001); bcl-2 (r=0,42; p=0,004); ММП-9 в клетках опухоли (r=0,63; p=0,007) и воспалительного инфильтрата (r=0,79; p=0,0001) (табл. 17).

Таблица 17. Корреляционные связи количества макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне СРП с клинико-морфологическими и молекулярно-биологическими факторами

Клинико-морфологические параметры	Коэффициент корреляции (r) с количеством макрофагов	Коэффициент корреляции (r) с количеством тучных клеток
Стадия опухоли по TNM	0,66	0,55
Размер опухоли	0,52	0,47
Степень анаплазии опухоли по Fuhrman	0,80	0,68
Наличие метастазов	0,62	0,55
Экспрессия нуклеофозмина В/23 в опухоли	0,71	0,67
Экспрессия ММП-9 в опухоли	0,63	0,53
Экспрессия ММП-9 в воспалительном инфильтрате	0,79	0,70

Установлены умеренные и сильные корреляционные связи количества тучных клеток в перитуморозной зоне карцином: со стадией по TNM (r=0,55; p=0,0001); размером опухоли (r=0,47; p=0,0001); с градацией по Fuhrman (r=0,68; p=0,0001); наличием метастазов (r=0,55; p=0,001); ИНДНК (r=0,65; p=0,0001); экспрессией Ki-67 (r=0,40; p=0,02); нуклеофозмина В/23 (r=0,67; p=0,0001); p53 (r=0,48; p=0,001); bcl-2 (r=0,27; p=0,04); ММП-9 в клетках СРП (r=0,53; p=0,003) и воспалительного инфильтрата (r=0,70; p=0,0001) (см. табл. 17).

Таким образом, если перитуморозная зона СРП в значительной степени инфильтрирована макрофагами или тучными клетками, то такая опухоль имеет высокую стадию по TNM и выраженную степень ядерной анаплазии по Fuhrman, более вероятно наличие метастазов у такой опухоли и, скорее всего, будут выше экспрессии нуклеофозмина В/23 и

ММП-9. Это является важным для уточнения диагноза СРП и определения прогноза заболевания. Простое определение степени инфильтрации макрофагами и/или тучными клетками перитуморозной зоны позволяет с большой долей вероятности судить о ее размерах, анаплазии, предсказывать метастазирование, пролиферативный потенциал и выраженность ангиогенеза (по экспрессии ММП-9), то есть давать определенный прогноз индивидуально для каждого пациента.

ВЫВОДЫ

1. В перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки средняя площадь, диаметр, суммарная площадь и средняя длина окружности сосудов увеличиваются в 2,7 раза при переходе от ранних клинических стадий к поздним, а также при возрастании размеров опухолевого узла сверх 7 см, что связано с гипоксией большой опухоли и активацией при этом ангиогенеза.

2. При высоких степенях атипичности ядер клеточных элементов светлоклеточного рака почки по классификации Fuhrman возрастают такие показатели васкуляризации перитуморозной зоны, как средняя площадь (в 3,7 раза), средний диаметр, суммарная площадь и средняя длина окружности сосудов. Количественные показатели ангиогенеза в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки при метастазировании в 2,7 раза выше, чем в перитуморозной зоне локализованной опухоли.

3. По данным корреляционного анализа, количество макрофагов и тучных клеток в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки наиболее сильно коррелирует со стадией по TNM ($r=0,66$ и $r=0,55$; $p=0,0001$); размером опухоли ($r=0,52$ и $r=0,47$; $p=0,0001$); градацией по Fuhrman ($r=0,80$ и $r=0,68$; $p=0,0001$); наличием метастазов ($r=0,62$ и $r=0,55$; $p=0,001$); ИНДНК ($r=0,66$ и $r=0,65$; $p=0,0001$); экспрессией нуклеофозмина В/23 ($r=0,71$ и $r=0,67$; $p=0,0001$); экспрессией ММП-9 в клетках опухоли ($r=0,63$ и $r=0,53$; $p=0,007$) и воспалительного инфильтрата ($r=0,79$ и $r=0,70$; $p=0,0001$).

4. Существует половой диморфизм васкуляризации перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки. У мужчин статистически значимо выше (до 25,5%) такие показатели, как средняя площадь, средняя длина окружности, суммарная площадь и суммарная длина окружности сосудов, по сравнению с пациентами женского пола.

5. Количественные показатели микроциркуляторного русла, кроме численности сосудов, в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки наименьшие в возрастной группе от 30 до 39 лет. После 69 лет возрастают средняя площадь, средний диаметр и средняя длина окружности, тогда как количество сосудов, суммарная площадь и суммарная длина окружности сосудов постепенно снижаются.

6. Наиболее выраженная инфильтрация перитуморозной зоны светлоклеточного рака почки тучными клетками происходит в возрастной группе больных от 70 до 79 лет ($6,4 \pm 2,6$ клеток на $8,5 \times 10^5$ $\mu\text{м}^2$ площади среза), а наиболее низкая – в возрастной группе от 30 до 39 лет ($1,8 \pm 0,4$ клеточных элементов).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Патоморфологическое исследование операционного материала онкологических больных, наряду с традиционными гистологическими методами, целесообразно дополнить исследованием васкуляризации и лейкоцитарной инфильтрации с применением морфометрии и статистического анализа. В прогностические модели светлоклеточного рака почки необходимо включать количественные параметры ангиогенеза, тучноклеточной и макрофагальной инфильтрации перитуморозной зоны.

2. Определение степени инфильтрации перитуморозной зоны СРП макрофагами и/или тучными клетками позволяет с большой долей вероятности судить о ее размерах, анаплазии, предсказывать метастазирование, пролиферативный потенциал и выраженность ангиогенеза (по экспрессии ММП-9), то есть индивидуализировать прогноз для каждого

пациента. Если опухоль почки в значительной степени инфильтрирована макрофагами или тучными клетками, то она имеет высокую стадию по TNM и выраженную степень ядерной анаплазии по Fuhrman, более вероятно наличие метастазов и, скорее всего, будут выше экспрессии нуклеофозмина V/23 и ММП-9.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Крючкова Н.Г., Лепилов А.В., Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Климачев В.В., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Казарцев А.В., Малинина Е.И. Диагностическое и прогностическое значение исследования тучных клеток при раке почки // **Современные проблемы науки и образования.** – 2017. – № 3. – **Science-education.ru**

2. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В., Казарцев А.В., Крючкова Н.Г., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Лепилов А.В. др. Тучные клетки при раке почки: клиничко-морфологические взаимосвязи и прогноз // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2017. – Т. 163, № 6. – С. 768 – 773.

3. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Долгатов А.Ю., Лепилов А.В., Авдалян А.М., Лазарев А.Ф., Таранина Т.С. Иммунофенотипические особенности клеток воспалительного инфильтрата при локализованном и метастатическом светлоклеточном раке почки // **Вестник научных конференций.** – 2018. – № 4-1. – С. 17 – 19.

4. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Авдалян А.М. и др. Прогностическое значение экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/V23 при светлоклеточном раке почки // **Вестник научных конференций.** – 2018. – № 8-2 (36). – С. 21 – 24.

5. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Варламов С.В., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Авдалян А.М., Ганов Д.И., Лазарев А.Ф. Прогностическое значение исследования матричной металлопротеиназы-9 при почечно-клеточном раке // **Онкоурология.** – 2018. – № 3. – С. 17 – 24. (**Scopus**)

6. Bobrov I.P., Cherdanceva T.M., Klimachev I.V. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 in renal cell carcinoma // **International Conference «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration».** – Beijing, China. 2018. – Pt 1. – P. 139 – 147.

7. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Авдалян А.М. и др. Влияние процессов неоангиогенеза и морфофункциональной активности проангиогенных факторов на экспрессию белка нуклеофозмина/V23 при светлоклеточном раке почки // **Вестник научных конференций.** – 2018. – № 8-2 (36). – С. 18 – 21.

8. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Авдалян А.М. и др. Прогностическое значение экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/V23 при светлоклеточном раке почки // **Вестник научных конференций.** – 2018. – № 8-2 (36). – С. 21 – 24.

9. Климачев И.В., Бобров И.П., Черданцева Т.М. Морфофункциональная характеристика тучноклеточной популяции в перитуморозной зоне рака почки // **Материалы III Международной научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические пауки – фундаментальная основа медицины посвящ. 100-летию проф. Т.Д.Никитиной.** – Новосибирск, 2018. – С. 108 – 111.

10. Климачев И.В., Бобров И.П., Черданцева Т.М. Исследование процессов ангиогенеза в перитуморозной зоне почечно-клеточного рака // **Материалы III Международной научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические пауки – фундаментальная основа медицины», посвящ. 100-летию проф. Т.Д.Никитиной.** – Новосибирск, 2018. – С. 111 – 114.

11. Климачев И.В., Бобров И.П., Черданцева Т.М. Исследование плотности перитуморозного инфильтрата при раке почки: клиничко-морфологические сопоставления // **Материалы III Международной научно-практической конкурс-конференции студентов и**

молодых ученых «Морфологические пауки – фундаментальная основа медицины», посвящ. 100-летию проф. Т.Д.Никитиной. – Новосибирск, 2018. – С. 114 – 116.

12. Klimachev I.V., Bobrov I.P., Cherdanceva T.M. Study of the prognostic significance of tumor associated macrophages (CD68) in kidney cancer // Materials of the International Conference «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration». – Beijing, China, 2019. – Pt. 2. – P. 187 – 196.

13. Бобров И.П., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Долгатов А.Ю., Лепилов А.В., Черданцева Т.М., Крючкова Н.Г., Авдалян А.М. и др. Онкопротеин нуклеофозмин/B23 при светлоклеточном раке почки: взаимосвязи с клинико-анатомическими факторами прогноза // Бюллетень медицинской науки. – 2019. – № 1. – С. 26 – 32.

14. Klimachev I.V., Bobrov I.P., Lepilov A.V. The size of tumour and histologic structure peritumorous zones of a cancer a renal carcinoma // Materials of the International Conference «Process Management and Scientific Developments». – Birmingham, United Kingdom, 2019 – P. 92 – 100.

15. Бобров И.П., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Черданцева Т.М. и др. Количественная оценка числа макрофагов (CD68+) в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки: клинико-морфологические сопоставления // Вестник научных конференций. – 2020. – № 4-2. – С. 17 – 20.

16. Бобров И.П., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Черданцева Т.М. и др. Прогностическое значение количественной оценки числа тучных клеток (CD117+) в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки // Вестник научных конференций. – 2020. – № 4-2. – С. 20 – 22.

17. Bobrov I.P., Cherdanceva T.M., Klimachev I.V. The significance of the estimation of peritumoral macrophages (CD68+) in the prediction of clear cell kidney cancer // International Conference «Process Management and Scientific Developments». – Birmingham, United Kingdom, 2020 – P. 112 – 120.

18. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю. и др. Прогностическое значение количественной оценки содержания тучных клеток в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки // Материалы XV международного конгресса Российского общества онкоурологов. – Москва, 2020. – С. 78 – 79.

19. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю. и др. Прогностическое значение оценки плотности распределения макрофагов (CD68+) в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки: клинико-морфологические сопоставления // Материалы XV международного конгресса Российского общества онкоурологов. – Москва, 2020. – С. 79 – 80.

20. Бобров И.П., Лазарев А.Ф., Черданцева Т.М., Климачев И.В., Климачев В.В., Мяделец М.Н., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю. и др. Прогностическое значение количественной оценки содержания макрофагов (CD68+) в перитуморозной зоне светлоклеточного рака почки // Российский онкологический журнал. – 2021. – Т. 26, № 2. – С. 49-56.

Соискатель

И.В.Климачев