

## Два типа иммунного микроокружения рака почки

А.А. Борунова<sup>1</sup>, А.А. Алимов<sup>2</sup>, И.Б. Шоуа<sup>1</sup>, А.И. Черткова<sup>1</sup>, З.Г. Кадагидзе<sup>1</sup>, А.Ю. Кузеванова<sup>2</sup>, Н.К. Жумабаев<sup>1</sup>, Ф.М. Абдул<sup>1</sup>, О.А. Халмурзаев<sup>1</sup>, К.С. Немцева<sup>1</sup>, А.В. Матвеев<sup>1</sup>, П.В. Кононец<sup>1</sup>, В.Б. Матвеев<sup>1</sup>, Т.Н. Заботина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

**Контакты:** Анна Анатольевна Борунова [a.borunova@ronc.ru](mailto:a.borunova@ronc.ru)

**Введение.** Микроокружение опухоли может как сдерживать опухолевый рост, так и способствовать прогрессированию заболевания, поэтому исследование субпопуляционного состава опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) является актуальной и значимой темой.

**Цель исследования** – охарактеризовать иммунное микроокружение рака почки методом проточной цитометрии. **Материалы и методы.** В исследование включены кровь, опухолевая и нормальная ткань удаленной почки 32 пациентов со светлоклеточным почечным раком, получавших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина. Ткань почки была получена при хирургическом удалении опухоли (резекции/нефрэктомии). Для анализа брали фрагмент опухоли и нормальной ткани под контролем морфолога. Кровь для исследования забирали в день операции. Иммунологическое исследование проводили методом проточной цитометрии. Ткань почки предварительно гомогенизировали и обрабатывали клеточную суспензию, как и периферическую кровь, моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD19, CD28, CD279, CD11b, меченными различными флуорохромами.

**Результаты.** Т-лимфоциты и NK-клетки (естественные киллеры) имеют выраженную обратную корреляционную связь, что позволило выделить 2 ( $n = 32$ ; 18/14) варианта иммунного микроокружения опухоли: Т-клеточный вариант с преобладанием CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток над CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами и NK-клеточный – увеличение количества NK-клеток при выраженном уменьшении доли Т-лимфоцитов за счет CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. В основе двух вариантов лежит различие эффекторного звена – преобладание клеток врожденного (NK) или адаптивного (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) иммунитета. Различались TILs иммунных профилей и по количеству CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-клеток – при Т-клеточном варианте их количество было в 2 раза больше, чем при NK-клеточном. Аналогичное распределение касалось и CD4<sup>+</sup>-Трег-клеток.

**Заключение.** Выявлено 2 иммунологически конкурентных варианта микроокружения опухоли почки – Т-клеточный, характеризующийся большей степенью выраженности инфильтрации и концентрацией Т-регуляторных клеток; NK-клеточный, с незначительной степенью инфильтрации и выраженным усилением эффекторного звена в ткани и провоспалительной активностью периферической крови.

**Ключевые слова:** TILs, NK-клетки, CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-клетки, рак почки, SII индекс

**Для цитирования:** Борунова А.А., Алимов А.А., Шоуа И.Б. и др. Два типа иммунного микроокружения рака почки. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):60–8.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-60-68>

### The two types of immune microenvironment of renal cancer

Anna A. Borunova<sup>1</sup>, Andrei A. Alimov<sup>2</sup>, Iona B. Showa<sup>1</sup>, Antonina I. Chertkova<sup>1</sup>, Zaira G. Kadagidze<sup>1</sup>, Anna Yu. Kuzevanova<sup>2</sup>, Nurlan K. Zhumabaev<sup>1</sup>, Farkhad M. Abdul<sup>1</sup>, Oybek A. Khalmurzaev<sup>1</sup>, Karolina S. Nemtseva<sup>1</sup>, Aleksey V. Matveev<sup>1</sup>, Pavel V. Kononets<sup>1</sup>, Vsevolod B. Matveev<sup>1</sup>, Tatiana N. Zabolina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

**Contacts:** Anna Anatolievna Borunova [a.borunova@ronc.ru](mailto:a.borunova@ronc.ru)

**Background.** The tumor microenvironment can both restrain tumor growth and promote disease progression. Therefore, the study of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) subpopulation composition is an urgent and significant topic.

**Aim.** To characterize the immune microenvironment of renal cancer by flow cytometry.

**Materials and methods.** The study included blood, kidney tumor and normal tissue of the removed kidney of 32 patients with clear cell renal cancer treated at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Kidney tissue was obtained during surgical removal of the tumor (resection/nephrectomy). A fragment of tumor and normal tissue was taken for analysis under the control of a morphologist. Blood for the study was taken on the day of surgery. Immunologic study was performed by flow cytometry. Kidney tissue was preliminarily homogenized and cell suspension was stained, as well as peripheral blood, with monoclonal antibodies to CD45, CD3, CD4, CD8, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD19, CD28, CD279, CD11b labeled with different fluorochromes.

**Results.** T-lymphocytes and natural killer (NK) cells have a pronounced inverse correlation, which allowed us to distinguish two ( $n = 32$ ; 18/14) variants of tumor immune microenvironment. T-cell variant, with predominance of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells over CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes, and NK cell variant – increase in the number of NK cells with a pronounced decrease in the proportion of T-lymphocytes at the expense of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes. The two variants are based on the difference of effector link – predominance of cells of innate (NK) or adoptive (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) immunity. TILs immune profiles also differed in the number of CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> cells – in the T-cell variant their number was 2 times higher than in the NK cell variant. The similar distribution concerned CD4<sup>+</sup> Treg cells.

**Conclusion.** Two immunologically competitive variants of renal tumor microenvironment were revealed – T-cell variant, characterized by a greater degree of infiltration and concentration of T-regulatory cells; NK cell variant, with an insignificant degree of infiltration and a pronounced strengthening of the effector link in the tissue and proinflammatory activity of peripheral blood.

**Keywords:** TILs, NK cells, CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> cells, cancer renal, SII index

**For citation:** Borunova A.A., Alimov A.A., Showa I.B. et al. The two types of immune microenvironment of renal cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2024;23(2):60–8. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-60-68>

## Введение

Рак почки считается иммуногенным новообразованием с большим количеством опухолеинфильтрирующих лимфоцитов [1]. Изучение микроокружения опухоли представляет особый интерес, потому что оно может создавать условия как для прогрессирования болезни, так и для ее сдерживания [2]. В литературе преимущественно описывают популяцию Т-клеток, когда говорят о лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль. При этом, в отличие от периферической крови, в ткани среди Т-лимфоцитов доминирует субпопуляция CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В отношении рака почки существуют противоречивые данные, так, по мнению одних авторов, увеличение этой субпопуляции клеток было связано с меньшим сроком выживаемости [3], а по результатам других исследователей, наоборот – с улучшением выживаемости [4]. Наличие клеток – естественных киллеров (NK) в опухолевом микроокружении связывают с благоприятным прогнозом при раке почки, желудка, пищевода, легких, яичников и колоректальном раке [5–7]. Увеличение Т-регуляторных лимфоцитов в опухолевом инфильтрате коррелирует с плохим прогнозом [8]. Микроокружение опухоли активно исследуют с помощью иммуногистохимического анализа, масс-спектрометрии и проточной цитометрии. Попытки выделить типы иммунного инфильтрата рака почки ведутся во всем мире, но описанные варианты пока остаются единичными исследованиями, малоприменимыми в практике [7, 9].

**Цель исследования** – охарактеризовать иммунное микроокружение рака почки методом проточной цитометрии.

## Материалы и методы

В исследование включены образцы биоматериалов (кровь, опухоль почки и нормальная ткань удаленной почки) 32 пациентов (20 мужчин и 12 женщин) со светлоклеточным почечным раком (4 пациента с I стадией, 5 – со II стадией, 15 – с III стадией и 8 – с IV стадией), получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Средний возраст 61 год (41–77 лет).

Ткань почки (ТП) получена при хирургическом удалении опухоли (резекции/нефрэктомии). Для анализа брали фрагмент опухоли и нормальной ткани под контролем морфолога. Кровь для исследования забирали в день операции.

Иммунологическое исследование клеток крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль и нормальную ТП, проводили методом проточной цитометрии. ТП предварительно гомогенизировали и обрабатывали клеточную суспензию, как и периферическую кровь, моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD19, CD28, CD279, CD11b, меченными различными флуорохромами. Работа с ТП оказалась технически сложной, так как в образцах всегда присутствовал разной степени выраженности некроз опухолевой ткани и контаминация периферической кровью.

На основании данных клинического анализа крови дополнительно высчитывали индексы воспаления:

- 1) нейтрофильно-лимфоцитарный индекс – NLR = нейтрофилы/лимфоциты;
- 2) тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс – PLR = тромбоциты/лимфоциты;
- 3) индекс системного воспаления – SII = тромбоциты × нейтрофилы/лимфоциты;
- 4) лейкоцитарный индекс интоксикации по Островскому – ЛИИ = нейтрофилы/базофилы + эозинофилы + лимфоциты + моноциты.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0 (IBM SPSS Statistics). Использовали параметрические и непараметрические статистические критерии: среднее значение и 95 % доверительный интервал –  $\bar{X}$  (95 % ДИ); медиану и 1-й и 3-й квартили – Me ( $Q_1$ – $Q_3$ ), оценку распределения исследуемых показателей проводили по критерию нормальности Шапиро–Уилка. Различия между показателями в независимых группах оценивали с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни, а различия в зависимых группах – W-критерия Уилкоксона. Корреляционная зависимость определялась с использованием ранговой корреляции Спирмена.

## Результаты

При анализе количества Т-(CD3<sup>+</sup>) и НК-клеток (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) в опухолевой ткани (опухоле-

инфильтрирующих лимфоцитов – tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) обращает на себя внимание диапазон разброса показателей – 50,8–94,5 % и 4,1–45,1 % соответственно. В структуре лимфоцитов, инфильтрирующих нормальную ткань, этот диапазон составил 68,9–91,0 % и 3,3–38,1 % соответственно. Так как Т-лимфоциты и НК-клетки имеют выраженную обратную корреляционную связь ( $r = -0,916$ ;  $p = 0,000$  для TILs), на основании показателей лимфоцитов нормальной ткани были выделены 2 группы иммунного профиля TILs – Т- и НК-клеточный варианты микроокружения опухоли (табл. 1, рис. 1, 2).

Степень инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами колебалась от 0,2 до 5,0 %, при этом у больных с Т-клеточным иммунным профилем TIL отмечалась большая концентрация клеток в опухоли по сравнению с НК-клеточным иммунным профилем – 1,9 (0,8–3,9) и 0,7 (0,5–1,7);  $p = 0,05$  соответственно.

Интересным оказался тот факт, что уменьшение количества Т-лимфоцитов, наблюдаемое в группе с преобладанием НК-клеток, происходило за счет субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток (CTL), при неизменном количестве CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (табл. 2). Парный корреляционный анализ подтвердил достоверную выраженную обратную зависимость между популяциями клеток НК и CTL в структуре лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань ( $r = -0,599$ ;  $p = 0,000$ ).

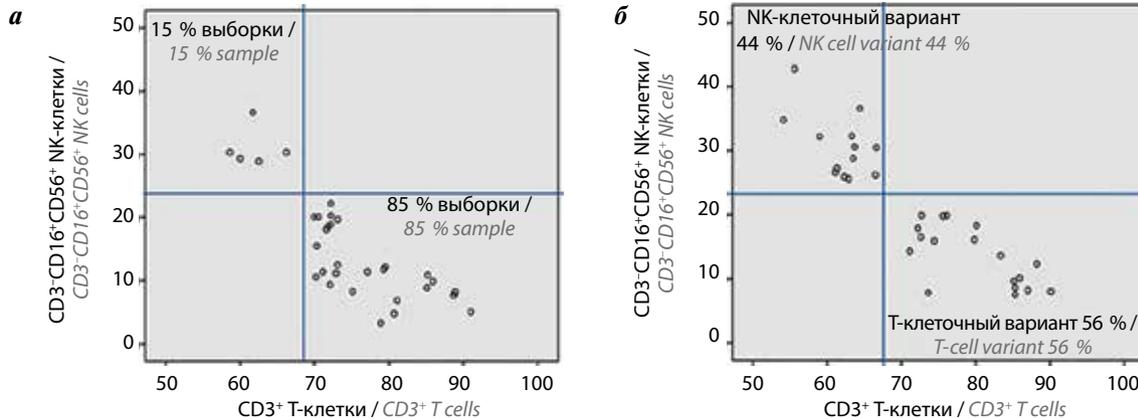
**Таблица 1.** Характеристика разделения лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань почки, на 2 варианта иммунного микроокружения

**Table 1.** Characteristics of the division of tumor-infiltrating lymphocytes renal tissue into two variants of the immune microenvironment

Показатель Indicator	Т-клеточный вариант T-cell variant (n = 18)	НК-клеточный вариант NK cell variant (n = 14)
CD3 <sup>+</sup> , %	>68,9	<68,9
$\bar{X}$ (S)	79,9 (6,4)	61,5 (5,3)
Me ( $Q_1$ – $Q_3$ )	79,9 (74,2–85,3)	62,6 (58,1–63,8)
Min–Max	71,1–94,5	50,8–69,2
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %	<22,1	>22,1
$\bar{X}$ (S)	13,3 (5,0)	31,8 (6,1)
Me ( $Q_1$ – $Q_3$ )	13,9 (8,5–17,7)	30,5 (26,5–35,3)
Min–Max	4,1–20,0	25,6–45,1

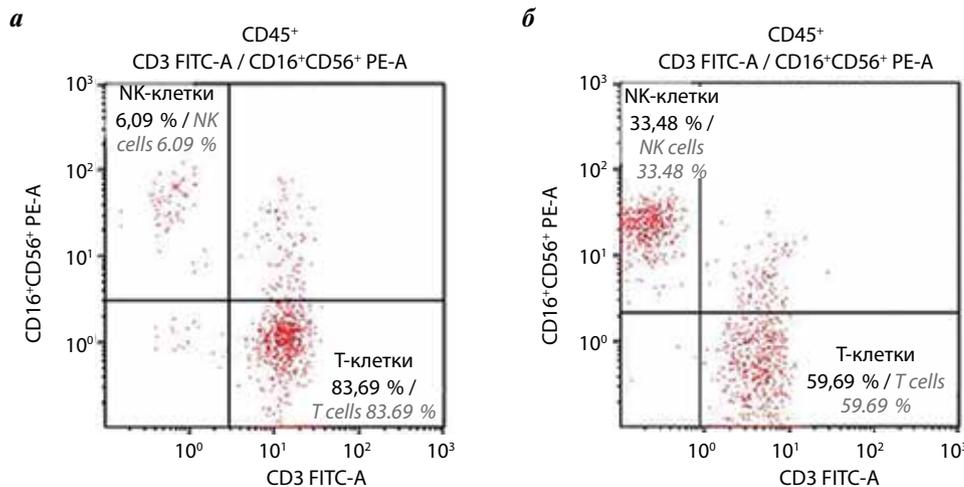
**Примечание.**  $\bar{X}$  – среднее арифметическое; Me ( $Q_1$ – $Q_3$ ) – медиана и 1-й и 3-й квартили; Min–Max – минимальное и максимальное значения.

**Note.**  $\bar{X}$  – arithmetic mean; Me ( $Q_1$ – $Q_3$ ) – median and 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartiles; Min–Max – minimum and maximum values.



**Рис. 1.** Характеристика распределения пациентов по количеству T- и NK-клеток в нормальной и опухолевой ткани почки: а – диаграмма распределения пациентов по количеству T- (ось X) и NK-клеток (ось Y) в нормальной ткани; б – диаграмма распределения пациентов по количеству T- (ось X) и NK-клеток (ось Y) в опухолевой ткани

**Fig. 1.** Characteristics of patients' distribution by the number of T- and NK cells in normal and tumor tissue of the kidney: а – diagram of patient distribution by the number of T- (X-axis) and NK cells (Y-axis) in normal tissue; б – diagram of patients' distribution by the number of T- (X-axis) and NK cells (Y-axis) in tumor tissue



**Рис. 2.** Экспрессия CD3- и CD16<sup>+</sup>CD56-антигенов на поверхности CD45<sup>+</sup>-клеток, инфильтрирующих опухоль: а – пример T-клеточного варианта TIL–DotPlot-цитограмма CD3 FITC против CD16<sup>+</sup>CD56 PE демонстрирует преобладание CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-лимфоцитов; б – пример NK-клеточного варианта TIL–DotPlot-цитограмма CD3 FITC против CD16<sup>+</sup>CD56 PE демонстрирует значительное увеличение CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-лимфоцитов

**Fig. 2.** Expression of CD3 and CD16<sup>+</sup>CD56 antigens on the surface of CD45<sup>+</sup> tumor-infiltrating cells: а – example of T cell variant TIL–DotPlot cytogram of CD3 FITC vs CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> PE demonstrates predominance of CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> lymphocytes; б – example of NK cell variant TIL–DotPlot cytogram of CD3 FITC vs CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> PE demonstrates a significant increase of CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> lymphocytes

Отличалась также и структура CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов – доля эффекторных клеток при NK-клеточном варианте микроокружения была в 1,8 раза выше, чем при T-клеточном, а доля наивных клеток, наоборот, была ниже в 3 раза (рис. 3).

Различались TILs иммунных профилей и по количеству CD8PD1<sup>+</sup>-клеток – при преобладании T-клеток их было в 2 раза больше, чем при NK-клеточном. Аналогичное распределение касалось и CD4<sup>+</sup>-Treg-клеток (см. табл. 2).

При попарном сравнении с нормальной тканью в группе с T-клеточным иммунным профилем сте-

пень инфильтрации опухоли лимфоцитами была достоверно выше: 1,9 (0,8–3,9) % и 0,5 (0,1–1,3) %;  $p = 0,008$ , тогда как в группе с NK-клеточным профилем существенно не различалась: 0,7 (0,5–1,7) % и 0,8 (0,1–1,3) %. Характерным отличием нормальной ткани в субпопуляционной структуре инфильтрирующих лимфоцитов, единым для 2 групп, оказалось увеличение в опухолевой ткани количества:

- NK- и T-клеток – 20,9 (6,2–31,9) % против 8,3 (6,0–14,7) %,  $p = 0,044$  для группы с T-клеточным и 18,6 (11,8–31,3) % против 9,8 (5,4–11,9) %,  $p = 0,006$  для группы с NK-клеточным вариантом;

Таблица 2. Сравнительная характеристика субпопуляций Т- и NK-клеточного варианта иммунного микроокружения опухоли почки

Table 2. Comparative characteristics of T cell and NK cell subpopulations of the immune microenvironment of renal tumor

Показатель Indicator	Т-клеточный вариант T-cell variant (n = 18)	NK-клеточный вариант NK cell variant (n = 14)	p
	$\bar{X}$ (95 % доверительный интервал), % $\bar{X}$ (95 % confidence interval), %		
T cells (CD3 <sup>+</sup> )	79,7 (76,7–83,1)	61,5 (58,4–64,7)	0,000
NK cells (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> )	13,2 (10,8–15,8)	31,8 (28,3–35,3)	0,000
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	37,1 (31,9–42,1)	33,1 (26,3–39,9)	0,326
CTL (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	45,2 (37,9–52,6)	28,9 (23,5–34,4)	0,001
CD4 <sup>+</sup> Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> )	5,1 (2,4–7,8)	1,8 (0,1–4,8)	0,037
CD8 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	27,9 (13,6–42,6)	13,0 (8,8–17,2)	0,050

**Примечание.** Здесь и в табл. 3: p – достоверность различий между параметрами, определяемая с применением t-критерия Стьюдента.

**Note.** Here and in Table 3: p – reliability of differences between the parameters, determined using Student's t-criterion.

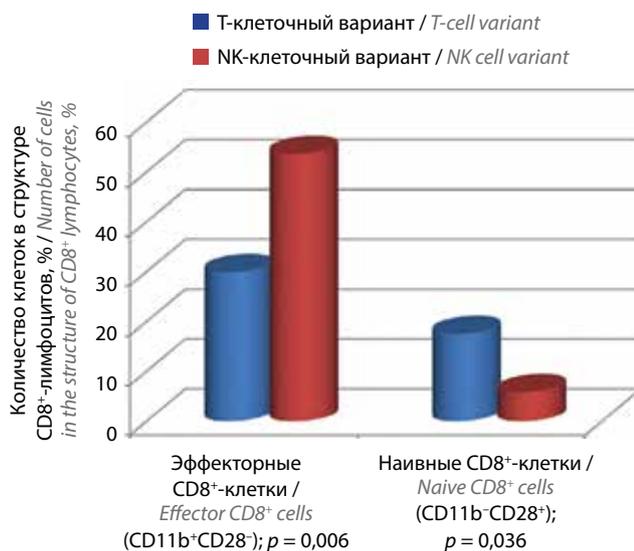


Рис. 3. Сравнение доли эффекторных и наивных клеток в структуре CD8<sup>+</sup> TIL у больных с Т- и NK-клеточным вариантом иммунного микроокружения опухоли почки

Fig. 3. Comparison of the proportion of effector and naive cells in the CD8<sup>+</sup> TIL structure in patients with T- and NK cell variant of tumor immune microenvironment of renal tumor

- CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-клеток – 19,4 (8,2–34,2) % против 12,7 (9,2–21,5) %;  $p = 0,046$  для группы с Т-клеточным и 19,1 (14,6–23,5) % против 12,2 (8,6–14,7) %;  $p = 0,005$  для группы с NK-клеточным вариантом.

Интересные результаты получены при сравнении показателей клинического анализа крови и их интегральных индексов у больных с различным иммунным профилем TILs (табл. 3). Для больных с преобладанием Т-клеток было характерно более высокое

количество лимфоцитов в периферической крови и более низкое – нейтрофилов по сравнению с показателями группы NK-клеточного профиля. Все воспалительные индексы у больных с преобладанием NK-клеток в структуре TILs были выше показателей больных группы Т-клеточного варианта.

### Обсуждение

Степень инфильтрации лимфоцитами рака почки оказалась незначительной – до 5 %. Основным объектом нашего исследования была субпопуляционная структура лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль почки. Поскольку в отношении этих клеток не существует понятия нормы, были исследованы лимфоциты, инфильтрирующие условно нормальную ТП.

Ярким признаком в опухолевой ТП стало наличие большого количества NK-клеток в структуре TILs, максимальное значение – 45 %. В нормальной ТП их количество составляло до 20 %, что соответствует литературным данным [10]. Следует отметить, что хотя мы изучали неизмененную морфологически ткань удаленной почки, но иммунологически это была ткань пораженного органа, через которую осуществлялось перемещение лимфоцитов из кровеносного русла в опухолевый очаг, поэтому в 5 образцах нормальной ткани количество NK-клеток выпадало из общей группы.

В большинстве работ, посвященных опухолевому микроокружению, основное внимание уделяется Т-лимфоцитам [11, 12]. NK-клетки и их функциональная активность в опухолевом инфильтрате рассматриваются как самостоятельное звено [10, 13]. Мы показали, что Т-лимфоциты и NK-клетки имеют выраженную обратную корреляционную связь,

**Таблица 3.** Сравнительная характеристика показателей клинического анализа крови больных с T- и NK-клеточным вариантом микроокружения опухоли почки

Table 3. Comparative characteristics of clinical blood analysis parameters of patients with T- and NK cell variant of the microenvironment of renal tumor

Показатель Indicator	Т-клеточный вариант T-cell variant (n = 18)	NK-клеточный вариант NK cell variant (n = 14)	p
	$\bar{X}$ (95 % доверительный интервал), % $\bar{X}$ (95 % confidence interval), %		
Лейкоциты, абс. Leukocytes, abs.	8,1 (6,5–11,7)	8,2 (5,9–11,7)	0,898
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	68,9 (61,5–75,9)	76,8 (62,7–87,5)	0,036
Нейтрофилы, абс. Neutrophils, abs.	4,1 (3,9–8,2)	5,8 (4,9–10,6)	0,046
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	18,1 (13,9–27,3)	13,4 (7,1–21,8)	0,013
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	1,7 (1,5–1,9)	1,1 (0,9–1,5)	0,002
Тромбоциты, абс. Platelets, abs.	255,5 (211,0–337,7)	249,0 (197,7–326,5)	0,898
NLR	3,8 (2,3–5,2)	5,7 (2,8–12,7)	0,020
PLR	158,9 (132,6–205,7)	251,3 (136,4–308,5)	0,050
SII	887,1 (675,8–1713,1)	1285,9 (679,5–3188,4)	0,010
ЛИИ Островского LII Ostrovsky	2,2 (1,4–6,6)	3,3 (1,7–7,0)	0,029

**Примечание.** NLR – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс; PLR – тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс; SII – индекс системного воспаления; ЛИИ Островского – лейкоцитарный индекс интоксикации по Островскому.

Note. NLR – neutrophil-lymphocyte index; PLR – platelet-lymphocyte index; SII – systemic inflammation index; Ostrovsky's LII – leukocyte intoxication index according to Ostrovsky.

что позволило выделить два равновесных ( $n = 32$ ; 18/14) варианта иммунного микроокружения опухоли: Т-клеточный вариант, наиболее часто встречающийся в описаниях, с преобладанием CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток над CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами, и NK-клеточный – характеризующийся увеличением количества NK-клеток при выраженном уменьшении доли Т-лимфоцитов. Как выявлено в нашем исследовании, это уменьшение Т-клеток обусловлено преимущественно за счет CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и в меньшей, статистически не значимой, степени за счет CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-субпопуляции. Таким образом, в основе двух видов иммунного инфильтрата лежит различие эффекторного звена – преобладание клеток врожденного (NK) или адаптивного (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) иммунитета.

В сравнении с лимфоцитами, инфильтрирующим ТП вне опухоли, для Т-клеточного иммунного варианта микроокружения опухоли была характерна более высокая степень инфильтрации при схожей структу-

ре линейных популяций, а для NK-клеточного более значимым оказалось различие в соотношении Т-В-NK лимфоцитов при равной степени инфильтрации. Количество CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-клеток в опухолевой ткани было существенно выше, чем в нормальной вне зависимости от варианта иммунного профиля микроокружения. Так как популяция CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> была в 1,6 раза больше при Т-клеточном варианте, количество CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-клеток было в 2 раза больше, чем при NK-клеточном. В структуре CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> при NK-клеточном профиле преобладала доля эффекторных клеток при выраженном дефиците наивных лимфоцитов. Увеличение лимфоцитов, экспрессирующих PD1-антиген в опухолевой ткани связано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с почечно-клеточным раком при таргетной терапии [14].

Еще одной особенностью при NK-клеточном варианте оказался провоспалительный фон в периферической крови, выражающийся в увеличении индексов воспаления. Прогностическая значимость

воспалительных индексов (NLR, PLR, SII), рассчитываемых на показателях общеклинического анализа крови – лимфоцитах, нейтрофилах и тромбоцитах, – активно изучается в онкологии. При раке почки увеличение SII индекса связано с ухудшением общей выживаемости и указывает на большую агрессивность злокачественного новообразования [15, 16]. Аналогичные данные показаны и в отношении NLR- и PLR-индекса [17, 18].

Похожее исследование провели финские ученые, которые анализировали, как и мы, периферическую кровь, опухоль и прилежащую опухоль нормальной ТП 52 больных раком почки, в том числе 39 пациентов со светлоклеточным почечным раком [19]. Исследование выявило гетерогенность TILs, что позволило разделить пациентов на 2 группы с высоким содержанием Т-лимфоцитов и NK-клеток, методом иерархической кластеризации D2. Мы в своей работе пошли другим путем – подтвердив обратную зависимость между Т- и NK-клетками, определили границу нормальных значений для NK-клеток в ТП, на основании чего и выделили два взаимоисключающих варианта иммунного микроокружения. Субпопуляционная характеристика 2 вариантов TILs, полученная нами, совпадает с данными финских исследователей. Фокусом их работы был анализ соматических мутаций как мишеней терапии. Наше исследование выявило связь типа опухолевого инфильтрата с показателями системного воспаления.

Таким образом, мы наблюдаем 2 вида локального иммунного ответа:

- Т-клеточный, характеризующийся большей степенью выраженности инфильтрации и концентрацией Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани;
- NK-клеточный с незначительной степенью инфильтрации и выраженным усилением эффекторного звена в ткани и провоспалительной активностью периферической крови.

Субпопуляционная структура Т-клеточного типа иммунного профиля – преобладание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, наличие CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток свидетельствует о специфическом

клеточном взаимодействии иммунной системы и опухоли. Хотя данный вариант и обладает самыми высокими значениями инфильтрации TILs, его уровень не превышает 5 % порога, что, по сути своей, является слабой инфильтрацией.

При всей кажущейся привлекательности активации эффекторного звена при NK-клеточном варианте микроокружения, это – преобладание врожденного иммунитета, который не имеет способности запоминать. Низкая степень инфильтрации не предполагает каких-то выраженных ответов. Опухоль почки очень часто сопровождается очагами некроза, и данный тип инфильтрации может быть следствием неспецифического ответа без распознавания опухолевой ткани как чужеродной. Об этом же свидетельствует и низкий уровень Т-регуляторных клеток.

Определение варианта иммунного микроокружения опухоли даст клиницистам понимание типа иммунного ответа. При преобладании врожденного эффекторного звена инфильтрация опухоли Т-регуляторными клетками ничтожна, и применение специфической checkpoint-терапии не будет иметь мишени, а иммунные реакции не будут сопровождаться формированием иммунной памяти. Добавление терапии, основанной на цитокинах провоспалительного ряда (интерлейкина-2, интерферонов, факторе некроза опухоли), вызовет усиление данного типа инфильтрации [20].

### Заключение

Выявлено 2 иммунологически конкурентных варианта микроокружения опухоли почки: Т-клеточный, характеризующийся большей степенью выраженности инфильтрации и концентрацией Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани; NK-клеточный с незначительной степенью инфильтрации и выраженным усилением эффекторного звена в ткани и провоспалительной активностью периферической крови. С учетом равной частоты встречаемости этих 2 вариантов своевременная диагностика типа иммунного профиля микроокружения опухоли может оказаться значимой в выборе лечебной тактики.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Rooney M.S., Shukla S.A., Wu C.J. et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 2015;160(1-2):48–61. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.033
- Giraldo N.A., Becht E., Pages F. et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(13):3031–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2926
- Rozsypalova A., Rosova B., Filipova A. et al. Negative prognostic significance of primary cilia, CD8<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes and PD1<sup>+</sup> cells expression in clear cell renal cancer. *J BUON* 2019;24(4):1644–51.
- George D.J., Martini J.F., Staehler M. et al. Immune biomarkers predictive for disease-free survival with adjuvant Sunitinib in high-risk Locoregional renal cell carcinoma: From randomized phase III S-TRAC study. *Clin Cancer Res* 2018;24(7):1554–61. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2822
- Riemann D., Cwikowski M., Turzer S. et al. Blood immune cell biomarkers in lung cancer. *Clin Exp Immunol* 2019;195(2): 179–89. DOI: 10.1111/cei.13219
- Henriksen J.R., Donskov F., Waldström M. et al. Favorable prognostic impact of natural killer cells and T cells in high-grade serous ovarian carcinoma. *Acta Oncol* 2020;59(6):652–9. DOI: 10.1080/0284186X.2019.1711173
- Geissler K., Fornara P., Lautenschläger C. et al. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *Oncoimmunology* 2015;4(1):e985082. DOI: 10.4161/2162402X.2014.985082
- Liotta F., Gacci M., Frosali F. et al. Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2011;107(9):1500–6. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09555.x
- Giraldo N.A., Becht E., Vano Y. et al. Tumor-infiltrating and peripheral blood T-cell immunophenotypes predict early relapse in localized clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2017;23(15):4416–28. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2848
- Ma K., Zheng Z.R., Meng Y. Natural killer cells, as the rising point in tissues, are forgotten in the kidney. *Biomolecules* 2023;13(5):748. DOI: 10.3390/biom13050748
- Kawashima A., Uemura M., Nonomura N. Importance of multiparametric evaluation of immune-related T-cell markers in renal-cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(6):e1147–52. DOI: 10.1016/j.clgc.2019.07.021
- Fan Z., Xu H., Ge Q. et al. Identification of an immune subtype-related prognostic signature of clear cell renal cell carcinoma based on single-cell sequencing analysis. *Front Oncol* 2023;13:1067987. DOI: 10.3389/fonc.2023.1067987
- Schleypen J.S., Baur N., Kammerer R. et al. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(3 Pt 1):718–25. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0857
- Ueda K., Suekane S., Kurose H. et al. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2018;36(11):499.e9–16. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.07.003
- Yücel K.B., Yekedüz E., Karakaya S. et al. The relationship between systemic immune inflammation index and survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *Sci Rep* 2022;12(1):16559. DOI: 10.1038/s41598-022-20056-3
- Jin M., Yuan S., Yuan Y., Yi L. Prognostic and clinicopathological significance of the systemic immune-inflammation index in patients with renal cell carcinoma: A meta-analysis. *Front Oncol* 2021;11:735803. DOI: 10.3389/fonc.2021.735803
- Cordeiro M.D., Ilario E.N., Abe D.K. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts cancer outcome in locally advanced clear renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2022;20(2):102–6. DOI: 10.1016/j.clgc.2021.10.009
- Zhou X., Luo G. A meta-analysis of the platelet-lymphocyte ratio: A notable prognostic factor in renal cell carcinoma. *Int J Biol Markers* 2022;37(2):123–33. DOI: 10.1177/03936155221081536
- Lee M.H., Järvinen P., Nisen H. et al. T and NK cell abundance defines two distinct subgroups of renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2022;11(1):1993042. DOI: 10.1080/2162402X.2021.1993042
- Yanagiya H., Kudoh S., Takahashi S., Suzuki T. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes from patients with renal cell carcinoma – influence of combination therapy with interferon alpha and gamma. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1996;87(6):928–36. DOI: 10.5980/jpnuro11989.87.928

**Вклад авторов**

А.А. Борунова: разработка плана исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание статьи;

А.А. Алимов: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование статьи;

И.Б. Шоуа: получение данных для анализа, редактирование статьи;

А.И. Черткова, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Кузеванова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;

Н.К. Жумабаев, Ф.М. Абдул, О.А. Халмурзаев, К.С. Немцева, А.В. Матвеев, П.В. Кононец, В.Б. Матвеев: предоставление материала для исследования, редактирование статьи;

Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, анализ и интерпретация данных, обсуждение и научное редактирование статьи.

**Author's contribution**

A.A. Borunova: development of the study design, obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, analysis and interpretation of data, writing the article;

A.A. Alimov: review of publications on the topic of the article, discussion and scientific editing of the article;

I.B. Showa: acquisition of data for analysis, editing of the manuscript;

A.I. Chertkova, Z.G. Kadagidze, A.Yu. Kuzevanova: review of publications on the topic of the article, editing of the manuscript;

N.K. Zhumabaev, F.M. Abdul, O.A. Khamurzaev, C.S. Nemtseva, A.V. Matveev, P.V. Kononets, V.B. Matveev: providing material for the study, editing of the article;

T.N. Zabolina: development of the study design, data analysis and interpretation, discussion and scientific editing of the article.

**ORCID авторов/ ORCID of authors**

А.А. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

А.А. Алимов / A.A. Alimov: <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>

И.Б. Шоуа / I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>

А.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

А.Ю. Кузеванова / A.Yu. Kuzevanova: <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>

Н.К. Жумабаев / N.K. Zhumabaev: <https://orcid.org/0000-0003-0649-3734>

Ф.М. Абдул / F.M. Abdul: <https://orcid.org/0009-0009-7642-8170>

О.А. Халмурзаев / O.A. Khalmurzaev: <https://orcid.org/0000-0001-7500-1815>

К.С. Немцева / K.S. Nemtseva: <https://orcid.org/0000-0002-1002-161X>

А.В. Матвеев / A.V. Matveev: <https://orcid.org/0009-0009-3280-1674>

П.В. Кононец / P.V. Kononets: <https://orcid.org/0000-0003-4744-6142>

В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>

Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» и темы НИР № И123021000086-7.

**Funding.** The work was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia for Research Centre for Medical Genetics and the theme of research work № И123021000086-7.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 31.08.2023. Принята в печать: 26.02.2024.

Article received: 31.08.2023. Accepted for publication: 26.02.2024.