

Т.В. Павлова<sup>1</sup>, К.И. Процаев<sup>1</sup>, И.А. Павлов<sup>1</sup>, Д.В. Бессмертный<sup>1</sup>,  
Н.Б. Пилькевич<sup>1</sup>, Л.А. Павлова<sup>1</sup>, Н.А. Османова<sup>2</sup>

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ CD68<sup>+</sup> И CD163<sup>+</sup> В МОЧЕВОМ ПУЗЫРЕ КАК МАРКЕРА РАКА

<sup>1</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: pilkevich@bsu.edu.ru; <sup>2</sup> Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», 125371, Москва, Волоколамское шоссе, 116, стр. 1

В исследовании представлено изучение экспрессии CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> в мочевом пузыре как маркера рака в возрастных аспектах. В рамках выполненной работы были обследованы 35 пациентов 36–70 лет с раком мочевого пузыря с гистологической верификацией заболевания. Изменение уровня экспрессии CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> в клетках моноцитарного происхождения может трактоваться как показатель диагностических параметров активности тканевых макрофагов и эндотелиальных клеток при раке. Их прогрессия при онкогенезе особенно ярко выражена в группе пациентов среднего возраста. В пожилом возрасте наблюдали снижение данных параметров, что свидетельствует в пользу уменьшения активности развития онкологических процессов с возрастом. Сочетание морфологического и иммунологического атипизма приводит к нарушению функциональной специализации органа.

**Ключевые слова:** рак, мочевой пузырь, иммуногистохимия, пожилой возраст

Одним из важнейших трендов современного мира является увеличение численности населения. По оценкам ООН, население мира в возрасте 60 лет и старше насчитывало в начале данного тысячелетия 600 млн человек, превышая практически вдвое данную возрастную группу 50 лет назад. Доля трудоспособного населения достигла своего максимума в 2014 г. (около 66 %), после чего начал происходить спад [9]. Развитие геронтологических направлений в науке и медицине сделают возможным не только продлить возможность активной работы лиц пожилого и старческого возраста, но и высвободить рабочие ресурсы, задействованные в их обслуживании [10, 11, 15].

Среди проблем, связанных с вопросами раннего старения, особое место занимает рак [4]. Значительная часть этого фрагмента приходится на опухоли мочеполовой системы, в том числе на рак мочевого пузыря (РМП). В России он за-

нимает 3-е место среди других онкоурологических заболеваний после рака предстательной железы у мужчин и рака почек у женщин (26,2 % случаев от всех злокачественных новообразований мочеполовой системы) [2]. В США, где за год выявляют 57–60 тыс. новых случаев РМП и ежегодно умирают 12,5 тыс. больных, эта патология занимает 5-е место среди всех злокачественных новообразований, 4-ю позицию — по частоте опухолей у мужчин и 9-ю — у женского населения. Американское онкологическое общество (ACS) в 2018 г. в США прогнозирует регистрацию новых случаев РМП более чем у 81 тыс. человек, из них 62 тыс. мужчин и 18 тыс. женщин [14]. Это заболевание также является серьезной проблемой для стран Европейского союза. Так, в 2012 г. там было выявлено 124 тыс. новых случаев, более 50 тыс. человек умерли. Стандартизованный показатель заболеваемости составил 19,1 у мужчин и 4,0 у женщин.

По прогнозам, к 2030 г. число заболевших РМП может увеличиться до 219 тыс. Это тяжелое, в ряде случаев инвалидизирующее заболевание, для которого не разработаны системы активного выявления, требующее тщательной дифференциальной диагностики, имеющее большую склонность к рецидивированию и прогрессированию [3, 5, 7, 8]. В ряду вопросов, важных для диагностики заболевания в практическом здравоохранении, включенных в исследования и связанных с изучением морфогенеза данного процесса, стоят патоморфологические, среди них иммуногистохимические занимают лидирующие позиции. Особое значение имеет разработка новых подходов в данном направлении [1, 6, 12, 13].

Цель исследования — изучение экспрессии CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> в мочевом пузыре как маркера рака в возрастных аспектах.

## Материалы и методы

Основой работы послужил материал, полученный с 2017 по 2019 г. на базах Белгородского онкологического диспансера и Белгородского бюро судебно-медицинской экспертизы. Изучение материала, анализ и обработку полученных результатов производили на кафедре патологии НИУ БелГУ.

В рамках выполненной работы были обследованы 40 мужчин. Основная группа состояла из 35 пациентов 36–70 лет с РМП и гистологической верификацией заболевания (табл. 1). Контрольная группа включала 5 мужчин 36–50 лет, погибших в результате дорожно-транспортных происшествий.

Для выявления соматической патологии у пациентов обследуемой группы были проведены диагностические мероприятия: сбор жалоб и анамнеза с целенаправленным опросом по системам и органам, физикальное обследование, а также стандартные общепринятые лабораторно-инструментальные методы исследования.

Для гистологического исследования при световой микроскопии из различных частей мочевого пузыря вырезали образцы, которые фиксировали, заливали в парафин и готовили срезы на микротоме с последующей их окраской гематоксилином и эозином, затем изучали и производили фотосъемку в световом микроскопе «Topic-T» Ceti (Нидерланды) [12–15].

Для иммуногистохимического исследования и иммунофлюоресценции использовали реактивы: Tryptase, mouse monoclonal Ab, #ab2378, Tryptase, rabbit monoclonal Ab, #ab151757, Chymase, mouse monoclonal Ab, #ab2377, Goat anti-mouse IgG Ab, #ab97035, Goat anti-rabbit IgG Ab (#ab150077) («AbCam», Великобритания), AmpliStain™ anti-Mouse 1-Step HRP (#AS-M1-HRP), AmpliStain™ anti-Rabbit 1-Step HRP (#AS-R1-HRP) («SDT GmbH», Baesweiler, Германия), 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, #D9542-5MG) («Sigma», Hamburg, Германия) и DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4100) («Vector Laboratories», Burlingame, CA, США).

Среди полученных результатов определяли показатели описательной статистики, числовые признаки описывали как медиана, 25 и 75 перценти-

ли —  $Me(25; 75)$ . Статистическую значимость выражали за счет использования непараметрического  $U$ -критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney  $U$  Test) ввиду небольших размеров выборки в экспериментальных группах исследования. Допустимый для экспериментальных медико-биологических исследований уровень  $p \leq 0,05$ . Обработку полученных результатов осуществляли за счет использования триал-версии программы Statistica 11.2 («Dell Software Company», США).

## Результаты и обсуждение

В основной группе средний размер опухоли у пациентов при II стадии составил  $3,5 \pm 0,3$  см, при III —  $3,9 \pm 0,3$  см.

Нами выбраны случаи с уротелиальным раком (переходно-клеточным) как чаще всего встречающимся. Микроскопически было показано, что в опухоли наблюдалось упорядоченное гистологическое и клеточное строение. Выявлены незначительные признаки ядерной атипии. Карциномы состояли из клеток с нарушением полярности, утративших межклеточные контакты с крупными гиперхромными ядрами. Часто встречались фигуры митоза, нередко атипичные. Разницы в гистологических особенностях опухолей у пациентов различных возрастных групп выявлено не было.

При изучении иммуногистохимической характеристики мочевого пузыря особое внимание было уделено исследованию CD68<sup>+</sup>-клеток в норме и при опухолевом росте. Было показано их прогрессирование при онкогенезе, особенно ярко выраженное в группе пациентов среднего возраста.

В контрольной группе из всех изучаемых органов наименьшее число CD68<sup>+</sup>-клеток было в мочевом пузыре (табл. 2). При этом CD68<sup>+</sup>-клетки были локализованы в различных структурных образованиях стенки мочевого пузыря. Однако их количество было незначительным. При развитии онкологического процесса вместе с возрастанием числа CD68<sup>+</sup>-клеток можно было наблюдать формирование крупных иммунопозитивных полей из большого количества клеток (рис. 1).

Затем были исследованы CD163<sup>+</sup>-клетки в норме и при РМП (табл. 3). В контрольной

Таблица 1

Распределение пациентов с раком мочевого пузыря по возрасту и нозологическому критерию

Контрольная группа	Основная группа (рак мочевого пузыря), n=35			
	II стадия (T2N0M0)		III стадия (T1–3N1–2M0)	
36–50 лет, n=5	36–50 лет, n=11	60–70 лет, n=9	36–50 лет, n=8	60–70 лет, n=7

Содержание CD68<sup>+</sup>-клеток на 1 мм<sup>2</sup> при раке мочевого пузыря, Me (25; 75)

Контрольная группа	Основная группа (рак мочевого пузыря), n=35			
	II стадия (T2N0M0)		III стадия (T1-3N1-2M0)	
36–50 лет, n=5	36–50 лет, n=11	60–70 лет, n=9	36–50 лет, n=8	60–70 лет, n=7
90,52 (84,23; 100,91)	225,67 (209,25; 237,29)*	208,74 (194,18; 219,14)**	473,01 (464,51; 486,32)*	431,68 (424,32; 442,72)*. **

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: \*  $p < 0,05$  по сравнению с нормой; \*\*  $p < 0,05$  в сравнении с возрастными группами. Статистически значимыми считали различия между показателями в группах при  $U$ -критерий Манна—Уитни  $p < 0,05$ .

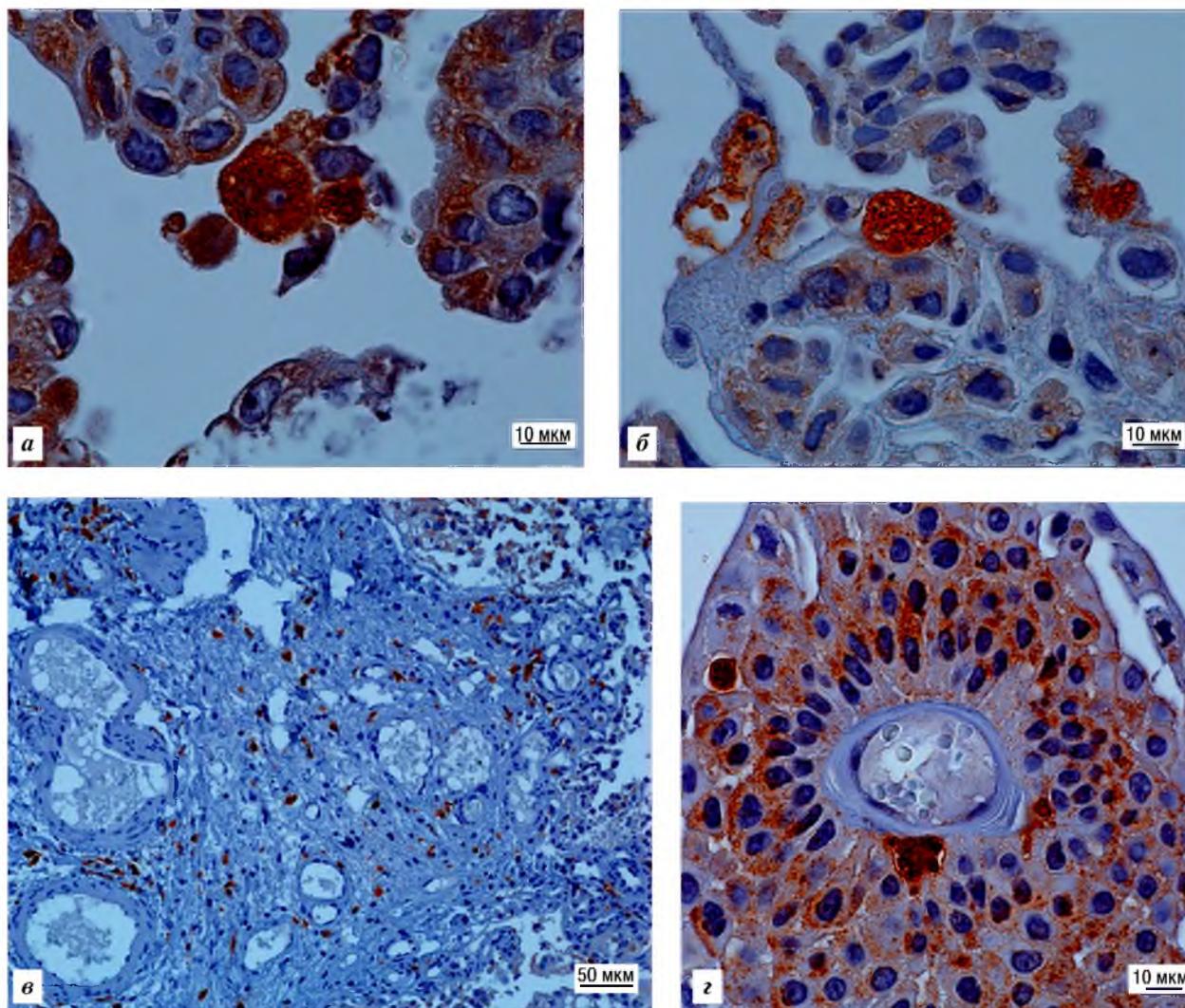


Рис. 1. Фрагменты мочевого пузыря: а, б — контрольная группа, мужчина 36 лет; в, г — рак мочевого пузыря II стадии, мужчина 50 лет. Окраска на CD68<sup>+</sup>-положительные клетки

группе CD163<sup>+</sup>-клетки мочевого пузыря были наименее многочисленными и морфологически обладали аналогичными характеристиками (рис. 2). В условиях развития онкологического процесса становится очевидным возрастание численности экспрессии CD163<sup>+</sup> в клетках стромы мочевого пузыря. Следует отметить перитуморальную локализацию CD163<sup>+</sup>-клеток, которые в некоторых случаях вступали в непосредственный кон-

такт с атипичными составляющими эпителия (см. рис. 2). CD163<sup>+</sup>-клетки могли формировать обширные поля. При этом сохранялась и высокая частота прилегания CD163<sup>+</sup>-клеток к сосудистому руслу.

При множественном иммуномаркировании CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> при РМП, судя по данным табл. 4 и рис. 3, можно признать закономерное возрастание уровня экспрессии CD-163<sup>+</sup> в клет-

Содержание CD163<sup>+</sup>-позитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup> при раке мочевого пузыря, Me (25; 75)

Контрольная группа	Основная группа (рак мочевого пузыря), n=35			
	II стадия (T2N0M0)		III стадия (T1-T3N1-2M0)	
36–50 лет, n=5	36–50 лет, n=11	60–70 лет, n=9	36–50 лет, n=8	60–70 лет, n=7
124,53 (115,63; 128,84)	489,41 (474,91; 500,42)*	418,54 (408,36; 427,17)*. **	629,19 (599,22; 648,83)*	565,86 (540,47; 582,15)*. **

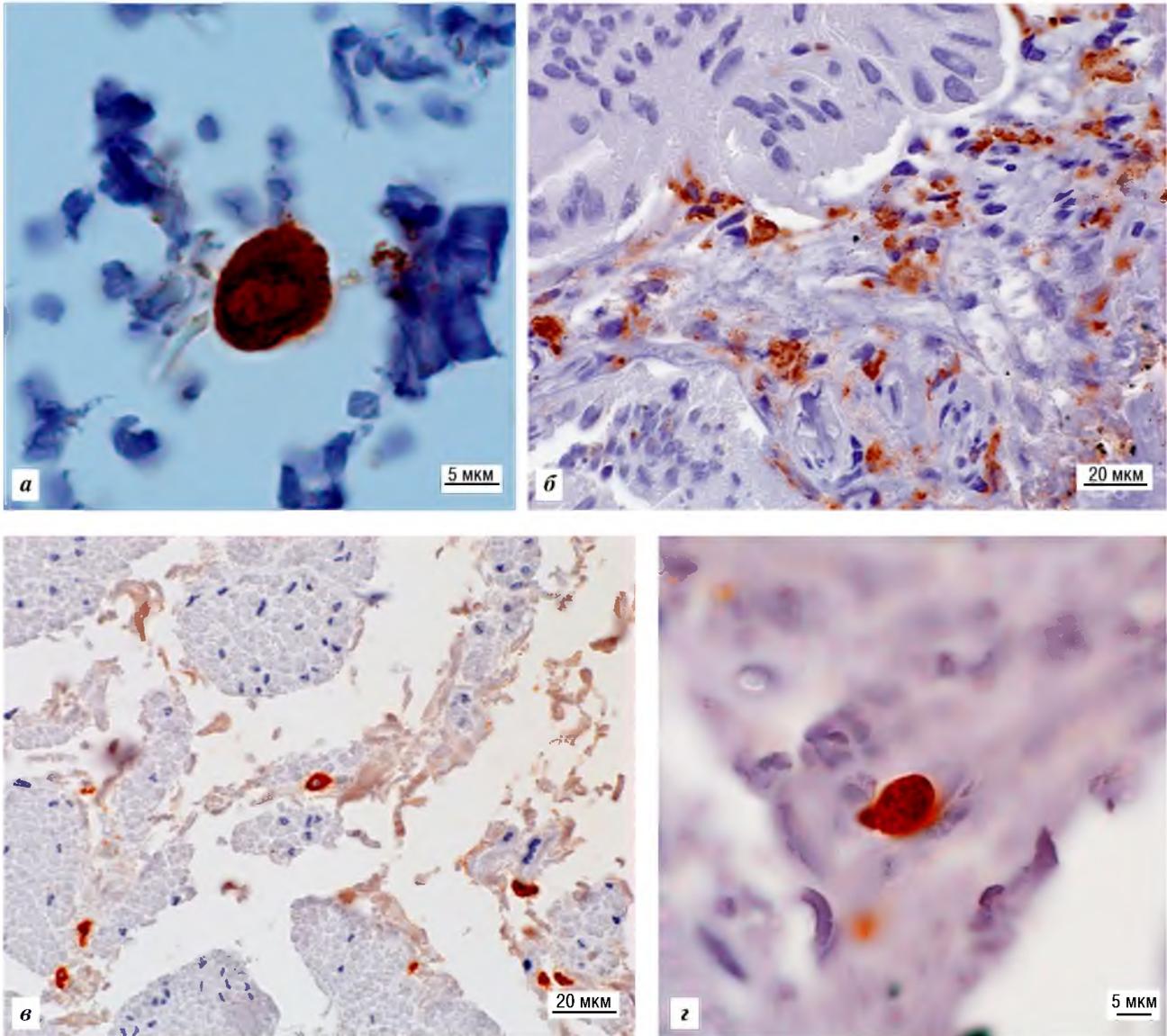


Рис. 2. Фрагменты мочевого пузыря: а — контрольная группа, мужчина 36 лет; б–г — CD163<sup>+</sup>-позитивные клетки в мочевом пузыре при раке. Возрастание численности экспрессии. Перитуморальная их локализация и непосредственный контакт с атипичными клетками эпителия. Окраска на CD163<sup>+</sup>-положительные клетки

ках моноцитарного происхождения при развитии онкологического процесса. В то же время, пул CD163<sup>+</sup>-содержащих клеток в мочевом пузыре увеличивается с одновременной экспрессией CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup>.

Очевидно достоверное снижение относительно объема клеток, экспрессирующих исключитель-

но макросиалин. В то же время, в мочевом пузыре увеличивается представленность клеток с одновременной экспрессией CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup>.

Исследование материала показало особенности морфологических характеристик CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup>-содержащих клеток в мочевом пузыре в норме и онкологической патологии в возрастных

Экспрессия CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> в мочевом пузыре (% , по результатам множественного иммуномаркирования), Me (25;75)

Группа	Возраст	Имунофенотип			
		CD68 <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup>	CD163 <sup>+</sup>	
Контрольная	36–50 лет, n=5	21,90 (21,52; 22,39)	16,10 (15,93; 16,18)	61,50 (59,20; 63,50)	
Основная (рак мочевого пузыря)	II стадия (T2N0M0)	36–50 лет, n=11	9,85 (9,62; 9,73)*	22,15 (22,05; 22,25)*	70,10 (68,20; 72,80)*
		60–70 лет, n=9	9,20 (9,07; 9,43)*	19,23 (18,70; 20,04)*	65,20 (64,10; 66,30)*
	III стадия (T1–3N1–2M0)	36–50 лет, n=8	8,50 (8,15; 8,67)*	27,10 (26,30; 28,10)*	72,30 (71,40; 73,50)*
		60–70 лет, n=7	8,10 (7,93; 8,59)*	23,00 (21,50; 24,00)*	69,10 (68,10; 70,05)*

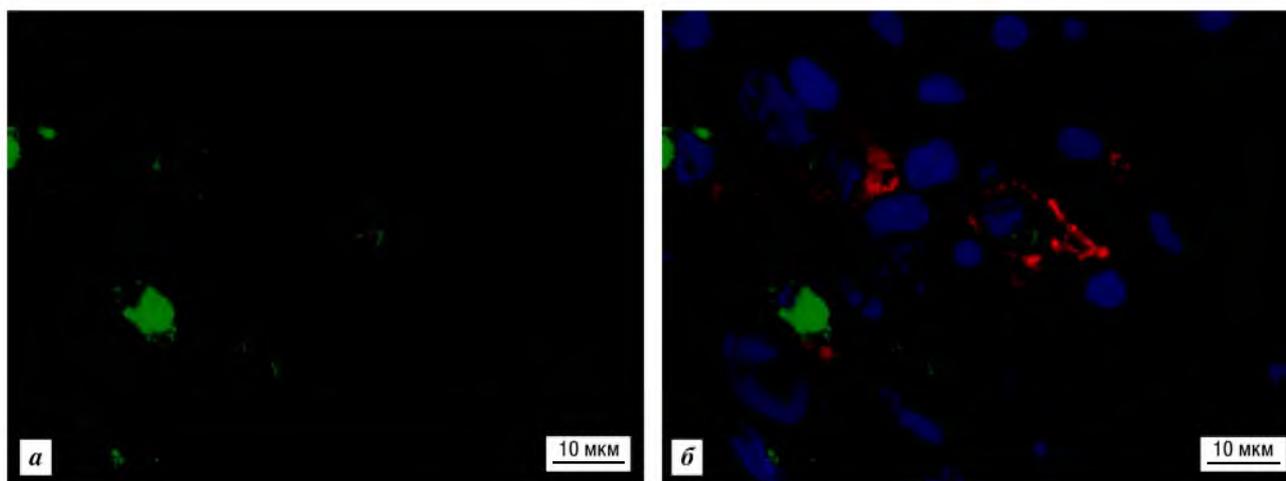


Рис. 3. Фрагменты мочевого пузыря при раке III степени, мужчина 60 лет.

Пул CD163<sup>+</sup>-содержащих клеток в мочевом пузыре увеличивается. Представленность клеток с одновременной экспрессией CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup>. Множественное иммуномаркирование CD68<sup>+</sup> (преимущественно в гранулах в цитоплазме клеток вокруг ядра), CD163<sup>+</sup> (в гранулах по периферии клеток, в основном возле плазмолеммы).

Множественное иммуномаркирование CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> в мочевом пузыре

аспектах. Они были локализованы в различных морфологических образованиях стенки. Часто небольшие CD68<sup>+</sup>-клетки выявляли в сосудистом русле. Степень иммунопозитивности на CD68<sup>+</sup> была неоднозначной. Преимущественно они имели округлую структуру, а иногда обладали отросчатой формой. Характерным признаком для CD68<sup>+</sup>-клеток были внутрицитоплазматические вакуоли различных размеров и формы. При развитии РМП происходило возрастание численности CD68<sup>+</sup>-клеток. При развитии онкологического процесса вместе с возрастанием их количества можно было наблюдать формирование крупных иммунопозитивных полей из большого количества структур. При этом они увеличивались в объеме, а также, по мере онкогенеза, возрастала интенсивность их иммунореактивности на макросиалин. Цитоплазма их выглядела более обширной и вакуолизированной.

Исследование CD163<sup>+</sup>-клеток показало высокую полиморфность их размеров. Ядра характеризовались преимущественно эксцентричной

локализацией. Вакуоли достигали в некоторых случаях весьма крупных размеров. Содержание CD163<sup>+</sup>-позитивного материала в клетках было различным, от единичных окрашенных структур до полного заполнения цитоплазмы. Иногда CD163<sup>+</sup>-позитивный материал выявляли в эндотелии. Некоторые лейкоциты крови, циркулируя по сосудистому руслу, обладали CD163<sup>+</sup>-позитивной цитоплазмой. Следует отметить высокую варибельность структур — от 5–6 до 15 мкм и более. В случае крупных размеров клеток и овальной формы отмечали большее накопление CD163<sup>+</sup>-позитивного материала в периферической области цитоплазмы. Органоспецифичной особенностью мочевого пузыря можно назвать часто встречающиеся малые размеры CD163<sup>+</sup>-клеток. При развитии онкологии становится очевидным возрастание численности экспрессии CD163<sup>+</sup> в клетках стромы в мочевом пузыре. CD163<sup>+</sup>-клетки могли формировать обширные поля. Наблюдалась высокая частота прилегания CD163<sup>+</sup>-клеток к сосудистому руслу. Они также

располагались в непосредственной близости к атипичным клеткам мочевого пузыря. Иногда имели неправильную форму, с цитоплазматическими выростами. При этом наибольшая экспрессия наблюдалась на периферии цитоплазмы, часто в крупных вакуолях. Все это свидетельствует о значительной активизации экспрессии CD163<sup>+</sup> в опухолевом микроокружении при ее развитии.

В части клеток выявлена одновременная экспрессия на CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup>. При развитии опухоли происходило увеличение реакции клеток, тогда как с возрастом она, наоборот, снижалась.

Регуляторные механизмы в иммунной системе существуют для соблюдения баланса как при эндогенных, так и экзогенных изменениях. В их основе лежат различные составляющие, строго дифференцированные по их назначению. Сюда можно отнести CD68<sup>+</sup>- и CD163<sup>+</sup>-содержащие клетки. CD68<sup>+</sup> представляет собой гликозилированный мембранный белок, принадлежащий к семейству молекул мембранных белков, который экспрессируется в эндосомах и лизосомах макрофагов и моноцитов. Относится к семейству супергенных рецепторов-поглотителей. В биологической и медицинской практике применяется в качестве пан-макрофагального маркера. Нами показано повышение его экспрессии при РМП, сочетающейся с высокой васкуляризацией и метастазированием.

CD163<sup>+</sup> — это прототип рецептора-поглотителя для объединения гаптоглобин-гемоглобин. Он экспрессируется на моноцитах и макрофагах или злокачественных новообразованиях с моноцитарной и гистиоцитарной дифференцировкой. Его действие значительно индуцируется противовоспалительным цитокином IL-10, а также глюкокортикоидами и IL-6. Макрофаги CD163<sup>+</sup> обладают иммуномодулирующим эффектом. Он применяется как вариант противовоспалительного и проопухолевого маркера. Выявленные нами показатели возрастания экспрессии CD163<sup>+</sup>-клеток при РМП можно назвать патоморфологическими критериями агрессивности, которая коррелируется с поздними стадиями заболевания. Наличие CD163<sup>+</sup>-макрофагов имеет более сильную связь с менее благоприятными клинико-патологическими признаками, чем CD68<sup>+</sup>-клетки.

Следовательно, достоверная роль экспрессии CD68<sup>+</sup>- и CD163<sup>+</sup>-клеток в тканях мочевого пузыря может трактоваться как диагностический параметр активности тканевых макрофагов и эндотелиальных клеток при раке. Их прогрессирование при онкогенезе особенно ярко выражено

у пациентов среднего возраста. В пожилом возрасте наблюдается снижение данных параметров, что свидетельствует об уменьшении активности онкологических процессов с возрастом. Сочетание морфологического и иммунологического атипизма приводит к нарушению функциональной специализации органа.

## Заключение

Таким образом, при развитии онкологического процесса вместе с увеличением количества CD68<sup>+</sup>-клеток можно наблюдать формирование крупных иммунопозитивных полей из большого числа клеток, а также возрастание численности экспрессии CD163<sup>+</sup> в клетках стромы мочевого пузыря.

Для определения прогностической роли числа тучных клеток в мочевом пузыре необходимо учитывать их гистотопографическую локализацию в органе.

*Конфликт интересов отсутствует.*

## Литература

1. Бухвалов И.Б., Атякшин Д.А., Павлова Т.В. и др. Гистохимия. Воронеж: Научная книга, 2018.
2. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020.
3. Клинические рекомендации. Рак мочевого пузыря. Кодирование по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем: С67. Возрастная группа: взрослые. М., 2020.
4. Онкогеронтология: Рук. для врачей / Под ред. В.Н. Анисимова, А.М. Беляева. СПб.: Издательство АННМО «Вопросы онкологии», 2017.
5. Павлова Т.В., Куликовский В.Ф., Павлов И.А. и др. Клинико-патогенетические подходы в изучении крови больных раком мочевого пузыря // Врач. 2020. № 2. С. 45–47.
6. Павлова Т.В., Куликовский В.Ф., Павлова Л.А. Клиническая и экспериментальная морфология. М.: Мед. информ. агенство, 2016.
7. Павлова Т.В., Малютин Е.С., Бессмертный Д.В. и др. Влияние на качество жизни особенностей кальций-фосфорных взаимоотношений при опухолевом росте в пожилом возрасте // Врач. 2021. № 32 (6). С. 78–82.
8. Павлова Т.В., Пилькевич Н.Б., Бессмертный Д.В. и др. Особенности метаболического атипизма при развитии онкологической патологии мочеполовой системы // Молекулярная мед. 2021. № 19 (31). С. 30–34.
9. Пристром М.С., Пристром С.Л., Семенов И.И. Старение физиологическое и преждевременное: современный взгляд на проблему // Мед. новости. 2015. № 2. С. 36–45.
10. Процаев К.И., Ильницкий А.Н., Павлова Т.В. Синдром старческой астении (Frailty) в клинической практике. Белгород: БелГУ, 2014.
11. Чукаева И.И., Ларина В.Н. Возраст-ассоциированные состояния (гериатрические синдромы) в практике врача-терапевта поликлиники // Леч. дело. 2017. № 1. С. 6–15.
12. Atiakshin D.A., Shishkina V.V., Gerasimova O.A. et al. Combined histochemical approach in assessing tryptase expression in the mast cell population // Acta Histochem. 2021. Vol. 123. P. 151–171.

13. *Buchwalow I.B., Boecker W.* Immunohistochemistry: Basics and Methods (1st ed.). Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; Dordrecht, The Netherlands; London, UK; New York, NY, USA. 2010.

14. *Tan D.S., Mok T.S., Rebbeck T.R.* Cancer Genomics: Diversity and Disparity Across Ethnicity and Geography // *J. clin. Oncol.* 2016. Vol. 34. P. 91.

15. *Walston J., Hadley E.C., Ferrucci L., Guralnik J.M.* Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults // *J. Amer. Geriat. Soc.* 2016. Vol. 54. P. 991–1001.

Поступила в редакцию 02.06.2022

После доработки 13.12.2022

Принята к публикации 09.01.2023

*Adv. geront.* 2023. Vol. 36. № 1. P. 76–82

*T.V. Pavlova<sup>1</sup>, K.I. Proshchaev<sup>1</sup>, I.A. Pavlov<sup>1</sup>, D.V. Bessmertny<sup>1</sup>,  
N.B. Pilkevich<sup>1</sup>, L.A. Pavlova<sup>1</sup>, N.A. Osmanova<sup>2</sup>*

#### **FEATURES OF CD68<sup>+</sup> AND CD163<sup>+</sup> EXPRESSION IN THE URINARY BLADDER AS A MARKER OF CANCER IN AGE ASPECTS**

<sup>1</sup> Belgorod State University, 85 str. Pobedy, Belgorod 308015, e-mail: pilkevich@bsu.edu.ru;

<sup>2</sup> Research Medical Center «Gerontology», 116 build. 1, Volokolamskoye shosse 125371

The study presents a study of the expression of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> in the bladder as a marker of cancer in age-related aspects. As part of the work performed, 35 patients with bladder cancer with histological verification of the disease aged 36 to 70 years were studied. The role of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> cells in bladder reactions can be interpreted as an indicator of diagnostic parameters of the activity of tissue macrophages and endothelial cells in cancer. Their progression during oncogenesis is especially pronounced in the group of middle-aged patients. In old age, there is a decrease in these parameters, which indicates in favor of a decrease in the activity of the development of oncological processes with age. The combination of morphological and immunological atypism leads to a violation of the functional specialization of the organ.

**Key words:** *cancer, bladder, immunohistochemistry, old age*