

DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-4-18-24

Цитирование: Волкова М.И., Ольшанская А.С., Хоченков Д.А., Ашуба С.А., Хоченова Ю.А., Тимофеев И.В. Экспрессия тирозинкиназных рецепторов на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови больных почечно-клеточным раком и здоровых добровольцев. Злокачественные опухоли. 2019;9(4):18–24

## ЭКСПРЕССИЯ ТИРОЗИНКИНАЗНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

М.И. Волкова<sup>1</sup>, А.С. Ольшанская<sup>1</sup>, Д.А. Хоченков<sup>1,2</sup>, С.А. Ашуба<sup>1</sup>, Ю.А. Хоченкова<sup>1</sup>, И.В. Тимофеев<sup>3</sup>

1. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
2. ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти, Россия
3. АНО «Бюро по изучению рака почки», Москва, Россия

### Резюме

**Введение:** тирозинкиназные рецепторы (ТКР) играют важную роль в патогенезе почечно-клеточного рака (ПКР). ТКР изучались на клетках опухоли и эндотелия, однако наличие данных рецепторов на лимфоцитах не было показано. Целью настоящего исследования было изучение экспрессии рецепторных тирозинкиназ на субпопуляциях лимфоцитов у здоровых добровольцев и больных ПКР до и после удаления первичной опухоли.

**Материалы и методы:** в исследование были включены 19 больных ПКР pT1-T3N0/N+M0/M+, подвергнутых нефрэктомии, и 10 здоровых добровольцев. Образцы крови собирали однократно у здоровых доноров и дважды у больных ПКР непосредственно перед и через 180 дней после хирургического вмешательства. Выделение лимфоцитов и проточная цитометрия выполнялись по стандартным методикам. Проводился сравнительный анализ уровней экспрессии ТКР на периферических лимфоцитах здоровых добровольцев и больных ПКР, а также при ПКР в динамике до и после операции. Выполнялся поиск корреляций между исходной экспрессией ТКР на лимфоцитах больных ПКР и характеристиками опухолевого процесса, а также прогнозом заболевания.

**Результаты:** на CD45+ мононуклеарных клетках периферической крови, а также субпопуляциях лимфоцитов CD3+ и CD8+ у здоровых добровольцев и больных ПКР, не получавших лечение, экспрессируются ТКР VEGFR-1, -2, -3, FGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ . Различий уровней экспрессии всех изученных ТКР между субпопуляциями лимфоцитов у пациентов с ПКР не выявлено ( $p > 0,05$  для всех). Уровень экспрессии ТКР на периферических клетках CD45+ у больных ПКР до лечения достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев ( $p < 0,05$  для всех). Степень снижения экспрессии ТКР коррелировала с категорией pT и наличием опухолевого венозного тромбоза. Через 180 дней после удаления первичной опухоли у больных ПКР отмечено достоверное увеличение уровней экспрессии VEGFR1 (на CD45+) и VEGFR2 (на CD8+, CD3+) ( $p < 0,05$  для всех). Других значимых изменений продукции ТКР не выявлено. Выявить влияние экспрессии ТКР на исход ПКР не удалось.

**Выводы:** лимфоциты экспрессируют ТКР, их экспрессия более выражена у здоровых людей, чем у больных ПКР. После хирургического лечения наблюдается восстановление экспрессии ТКР.

**Ключевые слова:** лимфоциты, экспрессия тирозинкиназных рецепторов, VEGFR, FGFR, PDGFR, почечно-клеточный рак.

### ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространенным и изученным гистологическим вариантом рака почки является светлоклеточный почечно-клеточный рак (ПКР) [1], ассоциированный с высокой частотой мутаций гена VHL [2]. Инактивация VHL приводит к экспрессии факторов, индуцируемых гипоксией, (HIF) [3–5] и их мишеней, прежде всего, ростовых факторов и тирозинкиназных рецепторов (ТКР), включая рецепторы фактора

роста эндотелия сосудов (VEGF), рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR), а также рецепторы фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGFR). Ростовые факторы, активируя ТКР, оказывают митогенное действие на клетки опухоли, проангиогенное влияние на эндотелий и перициты, а также изменяют состав опухолевого микроокружения. Наиболее весомым подкреплением этих теоретических выкладок служит доказанная в проспективных исследованиях эффективность мультикиназных ингибиторов [6–9].

Удивительно, но несмотря на то, что воздействие на HIF-зависимые сигнальные пути уже пришло в клиническую практику, особенности экспрессии и прогностической роли ростовых факторов и тирозинкиназ у больных ПКР изучены мало. Завершенные работы, как правило, посвящены исследованию ТКР на опухолевых клетках и эндотелии. Лимфоциты периферической крови теоретически могут быть вовлечены в процессы взаимодействия иммунной системы и проангиогенных HIF-зависимых сигналов при раке почки. В доступной нам литературе мы не обнаружили данных об экспрессии ТКР на периферических лимфоцитах.

Целью настоящего исследования является изучение экспрессии VEGFR, FGFR и PDGFR на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови у здоровых добровольцев и больных ПКР до и после удаления первичной опухоли.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Характеристика больных ПКР и здоровых добровольцев

В исследование были включены 19 больных ПКР pT1-T3N0/N+M0/M+, подвергнутых нефрэктомии, и 10 здоровых добровольцев. Медиана возраста больных ПКР составила 59,0 (33–75) лет, соотношение мужчин и женщин — 1,1:1. Большинство (17 (89,5%)) пациентов имели опухоль одной почки, у 2 (10,5%) больных были диагностированы двухсторонние опухоли. Медиана размеров опухоли составила 7,8 (2,5–19,0) см. В 13 (44,8%) случаях имелся опухолевый венозный тромбоз. У 9 (47,4%) пациентов до операции выявлены отдаленные метастазы, в том числе солитарные в 4 (21,1%) случаях. У 2 (21,1%) больных метастазы локализовались более чем в одном органе. Метастатическое поражение легких имело место в 6 (31,6%), надпочечников — в 4 (21,1%), костей — в 1 (5,3%) наблюдении.

Всем пациентам была выполнена нефрэктомия с расширенной лимфодиссекцией. В 13 (44,8%) наблюдениях произведена тромбэктомия. Пяти (26,4%) больным удалены метастатические очаги: в 4 (21,1%) случаях выполнена адреналэктомия по поводу метастаза в надпочечнике, в 1 (5,3%) — удаление костного метастаза. Полное удаление всех определяемых опухолевых очагов удалось осуществить в 13 (68,4%) случаях, у 6 (31,6%) пациентов операция имела циторедуктивный характер.

Гистологическое исследование во всех случаях подтвердило наличие ПКР. В 15 (78,9%) образцах верифицирован светлоклеточный, в 4 (21,1%) — несветлоклеточный вариант опухоли. Степень анаплазии G1–2 имела место в 13 (68,4%), G3–4 — в 6 (71,6%) препаратах. У 2 (10,5%) пациентов опухоль проросла в паранефральную клетчатку. Во всех 13 образцах ткань удаленного тромба была представлена разрастаниями ПКР, аналогичного первичной опухоли. Опухолевые очаги в удаленных надпочечниках и резецированной костной ткани имели строение метастазов ПКР.

Все пациенты, повергнутые радикальному хирургическому лечению, находились под динамическим наблюдением. После циторедуктивной нефрэктомии все 6 больных были классифицированы в группу промежуточного прогноза (согласно критериям IMDC) и получали противоопухолевое лечение: цитокины — 1 пациент (5,3%), анти-VEGF таргетную терапию — 5 (26,3%).

В исследование включено 10 здоровых доноров женского пола. Медиана возраста — 40,4 ± 7,4 (23–65) года.

### Выделение лимфоцитов

Образцы крови собирали однократно у здоровых доноров и дважды — у больных ПКР (непосредственно перед и через 180 дней после хирургического вмешательства). Сбор крови производили в пробирки с покрытием EDTA (BD Biosciences). Периферические лимфоциты выделяли из цельной крови с использованием Ficoll-PaquePlus (GE Healthcare) и отделяли центрифугированием в течение 25 минут при 400 g. Клеточный осадок ресуспензировали в свежей среде RPMI 1640 (Gibco). Изолированные периферические лимфоциты были подготовлены для проточной цитометрии, как было описано ранее [10].

### Проточная цитометрия

Изолированные периферические лимфоциты изучались непосредственно после выделения. Клетки инкубировали в течение 15 мин при 4°C с нормальными мышиными иммуноглобулинами (mIgG) (6 мкг мкг/10<sup>6</sup> клеток) (Invitrogen, ThermoFisherScientific), затем инкубировали с мечеными флуорохромом антителами к поверхностным антигенам в течение 30 мин при 4°C (FITC анти-CD45, клон HI30, PE анти-VEGFR2, клон 7D4–6, PE анти-PDGFRα, клон 16. A1, PE анти-PDGFRβ, клон 18. A2 (все Sony Biotech), PE анти-VEGFR1, клон D-2, PE анти-FGFR2, клон C-8 (SantaCruz Biotech). Клетки получали на проточном цитометре NovoCyte 2000R (ACEA Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress v. 1.2.4. Для обеспечения строгого одноклеточного стробирования дублеты были исключены с использованием SSC и FSC высоты и ширины согласно рекомендациям сети проточной цитометрии. На всех этапах были использованы соответствующие контроли изотипа. Медиану интенсивности флуоресценции (MFI) рассчитывали путем вычитания значения флуоресценции соответствующего изотипического контроля из значения флуоресценции исследуемого маркера.

### Методы статистической обработки данных

Все данные пациентов были внесены в базу данных на основе электронных таблиц Microsoft Excel с помощью специально разработанного кодификатора. Анализ данных осуществлялся с применением блока статистических программ

### Дискуссионные вопросы в онкологии

SPSS Statistics 19. Для оценки взаимосвязи признаков рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) и проводили оценку его значимости. Для сравнения качественных параметров применялся точный критерий Фишера и  $\chi^2$  с учетом непараметрических данных и нормального распределения Пуассона. Различия признавали значимыми при  $p < 0,05$ . Общую выживаемость рассчитывали от даты хирургического вмешательства до смерти, безрецидивную выживаемость — от даты радикального хирургического вмешательства до даты регистрации рецидива, выживаемость без прогрессирования — от даты циторедуктивного хирургического вмешательства до даты регистрации прогрессирования ПКР. Выживаемость оценивали по методу Каплана-Майера, различия выживаемости определяли с помощью log-rank теста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Производилась оценка экспрессии ТКР на лимфоцитах периферической крови CD45+, CD3+, CD8+ у больных раком почки до и через 180 дней после нефрэктомии, а также на лимфоцитах периферической крови CD45+ у здоровых добровольцев.

Выявлено, что на мембране лимфоцитов периферической крови CD45+, а также субпопуляций лимфоцитов CD3+ и CD8+ у больных ПКР, не получавших лечения, экспрессируются VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$  и  $\beta$ , FGFR2. Различий уровней экспрессии ТКР между субпопуляциями лимфоцитов у пациентов с ПКР не выявлено ( $p < 0,05$  для всех) (табл. 1).

Лимфоциты периферической крови CD45+ здоровых добровольцев также экспрессировали VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$  и  $\beta$ , FGFR2. Отмечена достоверно более высокая экспрессия рецепторов тирозинкиназ, включая VEGFR1 и VEGFR2, PDGFR $\alpha$  и  $\beta$ , FGFR2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови здоровых добровольцев по сравнению с больными ПКР, которым не удалена первичная опухоль ( $p < 0,05$  для всех; табл. 2).

При изучении динамики уровней экспрессии ТКР у больных ПКР выявлена достоверно более высокая экспрессия VEGFR1 и VEGFR2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови через 180 дней после удаления первичной опухоли по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$  для всех). Наличие неудаленных метастазов не влияло на динамику экспрессии VEGFR1, VEGFR2 (табл. 3).

Через 180 суток после нефрэктомии отмечено достоверное увеличение уровня экспрессии VEGFR2 на CD3+ ( $p = 0,003$ ) и CD8+ ( $p = 0,003$ ) лимфоцитах периферической крови больных ПКР до и через 180 суток после нефрэктомии (табл. 1). Других значимых изменений продукции ТКР не выявлено.

Проведен корреляционный анализ, направленный на выявление статистически значимых взаимосвязей экспрессии VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , FGFR2 на лимфоцитах периферической крови (CD45+, CD3+, CD8+) с характеристиками рака почки (категории T, N, M, степень анаплазии G,

**Таблица 1. Экспрессия рецепторов тирозинкиназ на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до и через 180 суток после нефрэктомии**

Экспрессия, средняя $\pm$ $\sigma$	Больные раком почки, до операции <sup>a</sup>	Больные раком почки, 180 суток после нефрэктомии	2-сторонняя значимость
Периферические лимфоциты CD45+			
VEGFR-1	28,8 $\pm$ 2,7	43,4 $\pm$ 5,9	0,001
VEGFR-2	27,1 $\pm$ 2,2	57,8 $\pm$ 7,4	0,002
PDGFR $\alpha$	44,9 $\pm$ 3,7	49,1 $\pm$ 10,1	0,546
PDGFR $\beta$	62,6 $\pm$ 3,8	47,4 $\pm$ 9,8	0,768
FGFR-2	41,4 $\pm$ 6,3	35,1 $\pm$ 2,8	0,223
Периферические лимфоциты CD3+			
VEGFR-1	39,6 $\pm$ 5,4	52,6 $\pm$ 6,0	0,128
VEGFR-2	36,2 $\pm$ 4,4	64,5 $\pm$ 7,8	0,003
PDGFR $\alpha$	52,9 $\pm$ 5,3	52,9 $\pm$ 10,2	0,997
PDGFR $\beta$	69,2 $\pm$ 6,1	50,3 $\pm$ 9,0	0,090
FGFR-2	48,9 $\pm$ 8,9	38,0 $\pm$ 3,1	0,329
Периферические лимфоциты CD8+			
VEGFR-1	34,0 $\pm$ 5,1	47,1 $\pm$ 6,3	0,122
VEGFR-2	30,9 $\pm$ 3,8	59,4 $\pm$ 8,4	0,003
PDGFR $\alpha$	49,9 $\pm$ 4,9	52,8 $\pm$ 11,1	0,801
PDGFR $\beta$	66,3 $\pm$ 5,4	49,5 $\pm$ 9,6	0,121
FGFR-2	47,8 $\pm$ 8,0	36,3 $\pm$ 2,8	0,252

*a* – не выявлено достоверных различий экспрессии VEGF-1, -2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , FGFR2 между субпопуляциями лимфоцитов периферической крови до и после нефрэктомии.

**Таблица 2. Экспрессия рецепторов тирозинкиназ на CD45+ лимфоцитах периферической крови у здоровых добровольцев и больных раком почки до нефрэктомии**

Экспрессия, средняя $\pm$ $\sigma$	Здоровые добровольцы (n 10)	Больные раком почки, до операции (n 19)	2-сторонняя значимость
VEGFR-1	78,1 $\pm$ 4,7	28,8 $\pm$ 2,7	0,001
VEGFR-2	79,6 $\pm$ 5,1	27,1 $\pm$ 2,2	0,002
PDGFR $\alpha$	80,1 $\pm$ 3,9	44,9 $\pm$ 3,7	0,012
PDGFR $\beta$	75,5 $\pm$ 3,7	62,6 $\pm$ 3,8	0,045
FGFR-2	72,1 $\pm$ 3,1	41,4 $\pm$ 6,3	0,001

*a* – не выявлено достоверных различий экспрессии VEGF-1, -2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , FGFR2 между субпопуляциями лимфоцитов периферической крови до и после нефрэктомии.

инвазия паранефральной клетчатки и наличие опухолевого венозного тромбоза). Отмечена значимая обратная взаимосвязь уровней экспрессии VEGFR1 и VEGFR2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных ПКР до лечения с категорией T, а также наличием опухолевого венозного тромбоза (табл. 4). Других значимых корреляций не выявлено.

**Таблица 3.** Экспрессия рецепторов тирозинкиназ на CD45+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до и через 180 суток после радикальной и циторедуктивной нефрэктомии

Экспрессия на CD45+, средняя $\pm \sigma$	Больные раком почки до операции (n 19)	Больные раком почки после радикальной нефрэктомии (n 13)	Больные раком почки после циторедуктивной нефрэктомии (n 6)
VEGFR-1	28,8 $\pm$ 2,7	43,4 $\pm$ 8,9 <sup>a</sup>	39,3 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
VEGFR-2	27,1 $\pm$ 2,2	58,0 $\pm$ 9,4 <sup>a</sup>	57,3 $\pm$ 14,3 <sup>a</sup>
PDGFR $\alpha$	44,9 $\pm$ 3,7	51,3 $\pm$ 12,1	44,7 $\pm$ 21,7
PDGFR $\beta$	62,6 $\pm$ 3,8	47,0 $\pm$ 11,5	48,3 $\pm$ 21,8
FGFR-2	41,4 $\pm$ 6,3	32,8 $\pm$ 2,7	39,7 $\pm$ 6,9

a – различия достоверны по сравнению с экспрессией РТК на CD45+ лимфоцитах периферической крови у больных раком почки до удаления первичной опухоли.

Медиана наблюдения за 19 больными ПКР составила 24,0 месяца. Рецидивы ПКР зарегистрированы у 4 (25,0%) из 16 радикально оперированных больных. Из 19 пациентов 13 (68,4%) живы (из них 9 (47,4%) — без признаков болезни, 4 (21,1%) — с метастазами), 6 (31,5%) умерли от прогрессирования ПКР. Медиана общей и специфической выживаемости всех пациентов составила 33,8 и 33,8 месяца; медиана безрецидивной выживаемости радикально оперированных больных не достигнута (2-летняя — 66,7%); медиана выживаемости без прогрессирования нерадикально оперированных больных равнялась 11 месяцев. Зависимости уровней и видов экспрессии ТКР на периферических лимфоцитах и исхода заболевания не получено (все  $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Насколько мы можем судить, это первое исследование, направленное на изучение экспрессии HIF-зависимых тирозинкиназ на лимфоцитах периферической крови у больных ПКР. Объектом исследования выбраны клетки, продуцирующие CD45, а также наиболее часто выявляемые в первичной опухоли и периферической крови пациентов, страдающих ПКР, субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих CD3 и CD8 [11,12].

Нами получены весьма неожиданные и многообещающие результаты. Мы доказали, что периферические лимфоциты экспрессируют VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , FGFR2. Функция ТКР на лимфоцитах периферической крови неизвестна.

Мы продемонстрировали, что экспрессия VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , FGFR2 на периферических лимфоцитах CD45+ у больных ПКР с неудаленной первичной опухолью достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев ( $p < 0,05$  для всех). При этом более низкая экспрессия

**Таблица 4.** Корреляция экспрессии рецепторов тирозинкиназ на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови до операции с характеристиками первичной опухоли у больных раком почки

Уровень экспрессии маркеров на лимфоцитах периферической крови	Корреляция Пирсона (r), 2-сторонняя значимость (Sig. 2-s.)	Категория Т	Опухолевый тромб
VEGFR-1 CD45+	r	-0,551*	-0,706**
	Sig. 2-s.	0,014	0,001
VEGFR-2 CD45+	r	-0,503*	-0,619**
	Sig. 2-s.	0,028	0,005
VEGFR-1 CD3+	r	-0,931**	-0,957**
	Sig. 2-s.	0,000	0,000
VEGFR-2 CD3+	r	-0,791**	-0,760**
	Sig. 2-s.	0,004	0,007
VEGFR-1 CD8+	r	-0,901**	-0,947**
	Sig. 2-s.	0,000	0,000
VEGFR-2 CD8+	r	-0,749**	-0,841**
	Sig. 2-s.	0,008	0,001

\*\* – корреляция значима на уровне 0,01 (2-сторон.).

\* – корреляция значима на уровне 0,05 (2-сторон.).

VEGFR1 и VEGFR2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у пациентов до лечения коррелировала с большей местной распространенностью первичной опухоли (высокой категорией Т, а также наличием опухолевого венозного тромбоза). Однако через 180 суток после нефрэктомии (независимо от наличия отдаленных метастазов) было отмечено достоверное нарастание экспрессии VEGFR1, VEGFR2 на CD45+ и VEGFR2 — на CD3+ и CD8+ лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$  для всех). Нам не удалось доказать влияние гипоксической экспрессии ТКР на периферических лимфоцитах на прогноз больных ПКР, что может быть связано с малой выборкой исследования.

Таким образом, можно предположить, что развитие ПКР сопровождается выраженным подавлением экспрессии ТКР на периферических лимфоцитах. При этом степень снижения экспрессии HIF-зависимых тирозинкиназ прямо коррелирует с распространенностью опухолевого процесса. Удаление первичной опухоли приводит к нормализации экспрессии ТКР на периферических лимфоцитах. Интересно, что еще в 1995 г. Fujimoto K. et al. показали, что у больных ПКР повышается уровень растворимого сывороточного FGF2, который полностью нормализуется через 2 суток после нефрэктомии [13]. Нельзя исключить связи между ранними находками и результатами нашей работы. Полученные данные открывают перспективу разработки маркера, который мог бы использоваться для диагностики и наблюдения за больными ПКР, а также для возможных доклинических исследований препаратов [14].

### Дискуссионные вопросы в онкологии

Таким образом, периферические лимфоциты больных раком почки экспрессируют VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , FGFR2. Уровень продукции ТКР на CD45+ и клетках субпопуляций CD3+ и CD8+ не различается. Отмечается достоверно более низкая экспрессия VEGFR1, VEGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$  и FGFR2 на CD45+ лимфоцитах периферической крови больных ПКР, которым не удалена первичная опухоль, по сравнению со здоровыми донорами. Более низкая экспрессия VEGFR1 и VEGFR2 на CD45+, CD3+, CD8+ лимфоцитах периферической крови у больных ПКР до лечения коррелирует с высокой категорией T, а также наличием опухолевого венозного тромбоза. У больных раком почки

через 180 суток после нефрэктомии (независимо от наличия неудаленных отдаленных метастазов) отмечается достоверное нарастание экспрессии VEGFR1, VEGFR2 на CD45+ и VEGFR2 — на CD3+ и CD8+ лимфоцитах периферической крови по сравнению с исходными значениями. Полученные данные требуют дальнейшего изучения и открывают перспективу разработки маркера рака почки.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00442).

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Мария И. Волкова**, д. м. н., ведущий научный сотрудник отделения онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия, e-mail: mivolkova@rambler.ru

**Анна С. Ольшанская**, врач-онколог, отделение организации и проведения клинических исследований ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

**Дмитрий А. Хоченков**, к. б. н., заведующий лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, профессор, центра медицинской химии института химии и энергетики ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти, Россия

**Саида А. Ашуба**, лаборант-исследователь, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

**Юлия А. Хоченкова**, младший научный сотрудник лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

**Илья В. Тимофеев**, директор Бюро по изучению рака почки, Москва, Россия

DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-4-18-24

**For citation:** Volkova M. I., Olshanskaya A. S., Khochenkov D. A., Ashuba S. A., Khochenkova Yu. A., Tsimafeyev I. V. Expression of Receptor Tyrosine Kinases on Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations in Patients with Renal Cell Carcinoma and Healthy Volunteers. *Malignant Tumours*. 2019;9(4):18–24 (In Russ)

## EXPRESSION OF TYROSINE KINASES RECEPTORS ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA AND HEALTHY VOLUNTEERS

M. I. Volkova<sup>1</sup>, A. S. Olshanskaya<sup>1</sup>, D. A. Khochenkov<sup>1,2</sup>, S. A. Ashuba<sup>1</sup>, Yu. A. Khochenkova<sup>1</sup>, I. V. Tsimafeyev<sup>3</sup>

1. N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

2. Togliatti State University, Togliatti, Russia

3. Kidney Cancer Research Bureau, Moscow, Russia

### Abstract

**Introduction:** tyrosine kinases receptors (RTKs) play an important role in the pathogenesis of renal cell carcinoma (RCC). RTKs were studied on tumor and endothelial cells, but the presence of these receptors on lymphocytes was not confirmed. The objective of this study was to investigate the expression of tyrosine kinases receptors on lymphocyte subpopulations in healthy volunteers and RCC patients before and after removal of the primary tumor.

**Materials and methods:** the study included 19 patients with pT1-T3N0/N+M0/M+ RCC, subjected to nephrectomy, and 10 healthy volunteers. Blood samples were collected once from healthy donors and twice from RCC patients, immediately before and 180 days after surgery. Isolation of lymphocytes and flow cytometry were carried out using standard methods. A comparative analysis of RTKs expression levels in peripheral lymphocytes from healthy volunteers and RCC patients, as well as in RCC patients before and after the operation, was carried out. A search was performed for correlations between the initial RTKs expression on lymphocytes from RCC patients and characteristics of the tumor development, as well as the disease prognosis.

**Results:** VEGFR-1, -2, -3, FGFR2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$  RTKs are expressed on CD45+ peripheral blood mononuclear cells, as well as subpopulations of CD3+ and CD8+ lymphocytes in healthy volunteers and untreated patients with RCC. No differences in the expression levels of all studied RTKs between subpopulations of lymphocytes were found in RCC patients ( $p > 0.05$  for all). The level of RTKs expression on CD45+ peripheral cells in RCC patients before treatment is significantly lower than in healthy volunteers ( $p < 0.05$  for all). The degree of a decrease in RTKs expression correlated with the pT status and the presence of tumor-associated venous thrombosis. A significant increase in the expression levels of VEGFR1 (on CD45+) and VEGFR2 (on CD8+, CD3+) ( $p < 0.05$  for all) was noted 180 days after the removal of the primary tumor in patients with RCC. No other significant changes in RTKs production were identified. We were not able to determine the effect of RTKs expression on the RCC outcome.

**Conclusions:** lymphocytes express RTKs, their expression is more pronounced in healthy people than in patients with RCC. After surgical treatment, the RTKs expression becomes restored.

**Key words:** lymphocytes, receptor of tyrosine kinase expression, VEGFR, FGFR, PDGFR, renal cell carcinoma.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Maria I. Volkova**, MD, PhD, DSc, leading research associate, Dept. of Oncurology, N. N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

**Anna S. Olshanskaya**, oncologist, Department of Organization and Conduct of Clinical Trials N. N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

**Dmitry A. Khochenkov**, MD, PhD, Biol. Head of the Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute for Experimental Diagnosis and Treatment of Tumors N. N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Professor, Center for Medical Chemistry, Institute of Chemistry and Energy, Togliatti State University, Togliatti, Russia

**Saida A. Ashuba**, Research Assistant, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute for Experimental Diagnosis and Treatment of Tumors N. N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

**Yulia A. Khochenkova**, Junior Researcher, Laboratory of Biomarkers and Tumor Angiogenesis Mechanisms, Research Institute for Experimental Diagnosis and Treatment of Tumors, N. N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

**Ilya V. Tsimafeyeu**, Kidney Cancer Research Bureau, Moscow, Russia

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Tsimafeyeu I, Zolotareva T, Varlamov S, et al. Five-year Survival of Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma in the Russian Federation: Results From the RENSUR5 Registry. *Clin Genitourin Cancer*. 2017 Dec;15 (6):e1069-e1072.
2. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013;499 (7456):43–9.
3. Schodel J, Grampp S, Maher ER, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer. *Eur Urol*. 2016;69 (4):646–57.
4. Tsimafeyeu I, Bratslavsky G. Fibroblast growth factor pathway in renal cell carcinoma. *Oncology*. 2015;88 (6):321–31.
5. Tsimafeyeu I, Ludes-Meyers J, Stepanova E, et al. Targeting FGFR2 with alofanib (RPT835) shows potent activity in tumour models. *Eur J Cancer*. 2016 Jul;61:20–8.
6. Matveev V. B., Olshanskaya A. S., Volkova M. I. Cabozantinib: from studies to clinical practice. *Cancer Urology*. 2019;15 (3):28–41. (In Russ.).
7. Figlin R. A., Hutson T. E., Tomczac P. et al. Overall survival with sunitinib versus interferon alfa as first-line treatment in metastatic renal-cell carcinoma. *ASCO Annual Meeting Proceedings 2008*. *J Clin Oncol* 2008;26 (Suppl.): 5024.
8. Matveev VB, Volkova MI. Re: Cytoreductive Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma with Venous Tumor Thrombus. *Eur Urol*. 2017 Dec;72 (6):1024. doi: 10.1016/j.eururo. 2017.08.029.

## Дискуссионные вопросы в онкологии

9. Rini B.I., Escudier B.J., Michaelson M.D. et al. Phase III AXIS trial for second-line metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Effect of prior first-line treatment duration and axitinib dose titration on axitinib efficacy. *J Clin Oncol* 2012;30 (Suppl. 5):354.
10. Khochenkov D, Volkova M, Olshanskaia A, et al., 59P Is there receptor tyrosine kinases expression on lymphocytes in patients with renal cell carcinoma? First-in-human study. *Annals of Oncology*, Volume 28, Issue suppl\_5, September 2017, mdx361.054, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx361.054>
11. Kopecký O, Lukesová S, Vroblová V, Phenotype analysis of tumour-infiltrating lymphocytes and lymphocytes in peripheral blood in patients with renal carcinoma. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2007;50 (3):207–12.
12. Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J. Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol*. 1997 Oct;80 (4):543–7.
13. Fujimoto K, Ichimori Y, Yamaguchi H, et al. Basic fibroblast growth factor as a candidate tumor marker for renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 86:182–186.
14. Khochenkov DA, Solomko ES, Peretolchina NM, et al. Antiangiogenic Activity of Alofanib, an Allosteric Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor 2. *Bull Exp Biol Med*. 2015 Nov;160 (1):84–7.