

Проточные цитометры BD Biosciences

идеальное решение для любых
научных и клинических задач

BD FACSCanto™

**БОЛЬШЕ ЦВЕТОВ —
БОЛЬШЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ**

- **Определение 10-ти параметров флуоресценции, 2-х параметров светорассеяния**
- **Источники света – твердотельные лазеры (405 нм, 488 нм, 640 нм)**
- Скорость сбора данных 33 000 событий в секунду
- Полностью автоматизированные процедуры включения/выключения, настройки прибора перед анализом
- Специализированное программное обеспечение для автоматизации сбора и анализа данных при проведении клинических исследований
- Анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови с подсчетом относительных и абсолютных значений
- Определение стволовых клеток в соответствии с международным протоколом ISHAGE
- Типирование лейкозов и определение минимальной остаточной болезни
- Контроль качества заготавливаемых препаратов крови
- Изучение функциональной активности клеток
- Научные исследования

Авторизованный дистрибьютор компании BD Biosciences в России, на Украине и Беларуси – компания «БиоЛайн»

ООО «БиоЛайн»
197101, Россия, Санкт-Петербург
Пинский пер., д.3, лит.А
тел.: (812) 320 49 49
факс: (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Москва, тел.: (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: (343) 287 32 49
Нижний Новгород, тел.: (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: (863) 268 99 32
Казань, тел.: (843) 570 66 88
Самара, тел.: (927) 768 06 43
Сочи, тел.: (922) 115 09 20

ДП «БиоЛайн Украина»
Украина, Киев
тел.: +38 (044) 200 89 37

ООО «БиоЛайн-БС»
Республика Беларусь, Минск
тел.: +37 (517) 399 43 79

Единый
бесплатный номер
сервисной службы
для всех регионов
России:
8 800 333 00 49

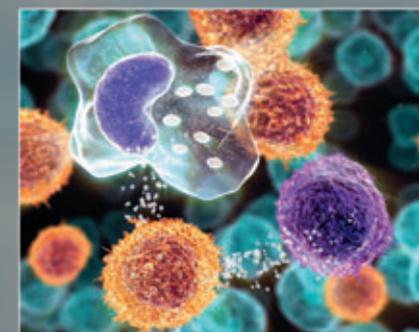


Группа компаний **БиоЛайн**

**ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА**

**HEMATOPOIESIS
IMMUNOLOGY**

И 2/2018-
1/2019



9 771818 482005

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.-006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
2/2018–1/2019 том 16–17

Учредитель: «ФГБУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина»
Минздрава России (лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРА Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошь (Франция)
Дж. Виженес (Франция)
Л.Ю. Гривцова (Москва)
Дж. Джаносси (Великобритания)
И.С. Долгополов (Москва)
Т.Н. Заботина (Москва)
А.М. Ковригина (Москва)
А.М. Копылов (Москва)
Л.В. Мазурок (Курган)
Д.Ш. Османов (Москва)
А.И. Павловская (Москва)
С.В. Петров (Казань)
Б.В. Пинегин (Москва)
А.В. Попа (Москва)
Н.А. Пробатова (Москва)
Р.М. Рамазанова (Казахстан)
И.Н. Серебрякова (Москва)
Г.С. Тумян (Москва)
С.А. Тюляндин (Москва)
А.В. Филатов (Москва)
М.А. Френкель (Москва)
С.А. Шинкарев (Липецк)
Е.Н. Шолохова (Москва)

Ответственный секретарь Е.Э. Толстых

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс: +7(499)324-90-69
e-mail: imhaemo hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за
соблюдением законодательства в сфере массовых коммуника-
ций и охране культурного наследия.
Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписано в печать 25.10.2018. Формат 60×90/8.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Печать офсетная. Уч.-изд. листов 7.
Подписной индекс № 36915.
Отпечатано в типографии «Копиринг»
Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию
гемопоэза» обязательна
Издательская группа РОНЦ
Макет: Б.Б. Крюков

HEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.-006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
2/2018–1/2019 vol. 16–17

Founder: NN Blokhin Russian Cancer Research Center
(Hematopoiesis Immunology Laboratory)

EDITORS-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN, G. JANOSSY

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtzova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A.M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
D.Ch. Osmanov (Moscow)
A.I. Pavlovskaja (Moscow)
S.V. Petrov (Kazan)
B.V. Pinegin (Moscow)
A.V. Popa (Moscow)
N.A. Probatova (Moscow)
R.M. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetz)
E.N. Sholokhova (Moscow)

Executive secretary E.E. Tolstykh

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian
Federation, 115478. Tel/fax: +7(499)324-90-69
e-mail: imhaemo hi@ronc.ru www.ronc.ru/imhaemo hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press
and Mass- media of Russian Federation.
License № ФС 77-23551 от 06.03.2006
License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915
Published «Copyring»
Printrun 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal
Hematopoiesis immunolog
Design: B.B. Krukov

CONTENTS**FROM THE EDITOR6***R. Gale***IMMUNE THERAPY OF SARCOMAS IN RUSSIA:
ANOTHER SPUTNIK?.....55***E.E. Tolstykh***IMMUNOMORPHOLOGICAL DIAGNOSIS OF MINIMAL
RESIDUAL DISEASE IN MULTIPLE MYELOMA.....168***A. Sergeeva, S. Kuznetsova, Y. Mangasarova, T. Obukhova, V. Surin***GENOMIC ALTERATIONS IN CHITA ARE FREQUENT
IN PRIMARY MEDIASTINAL LARGE B-CELL LYMPHOMA
AND UNCOMMON FOR MULTIPLE MYELOMA.....176***S.V. Chulkova, L.Y. Grivtsova, E.N. Sholokhova, N.N. Tupitsyn***FEATURES OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION
OF PERIPHERAL BLOOD B LYMPHOCYTES IN PATIENTS
WITH GASTRIC CANCER.....178**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА.....8

Н.Н. Тупицын
**«КОСТНЫЙ МОЗГ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО БОЛЬНОГО:
 СТАДИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, ГЕМОПОЭЗ,
 ИММУННАЯ СИСТЕМА»10**
*(доклад на Объединенном Ученом Совете ФГБУ «НМИЦ онкологии имени
 Н.Н. Блохина» Минздрава России 18 февраля 2019 г.)*

Р. Гейл
**ИММУНОТЕРАПИЯ САРКОМ В РОССИИ:
 ЕЩЕ ОДИН СПУТНИК?61**

*А.Д. Палладина, Чэн-Цзяо, П.А. Зейналова, Е.В. Тимонина, С.О. Подвизников,
 Н.А. Фалалеева, А.М. Мудунов, М.А. Френкель, Н.Н. Тупицын.*
**ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОПОЭЗА
 У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ66**

*И.Г. Маркина, Л.В. Демидов, О.А. Чернышева,
 И.Н. Михайлова, Н.Н. Тупицын.*
СТВОЛОВЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ МЕЛАНОМЫ.....78

Т.В. Горбунова
**ГЕМАТОГЕННОЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ
 СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ.....102**

Н.Н. Тупицын
«ГУМОРАЛЬНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ»107
*(доклад на Ученом Совете НИИ Клинической онкологии ФГБУ
 «НМИЦ Онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России 11 марта 2019 г.)*

**ФОТОРЕПОРТАЖ С 15-Й ЮБИЛЕЙНОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ
 КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА».....150**
5-7 июня 2018 г. Будапешт

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 16-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ
 КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА».....162**

- В.А. Мисюрин, А.В. Пономарёв, А.А Турба, А.Е. Мисюрина, В.В. Тихонова,
Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, О.В. Солопова, А.В. Мисюрин*
**ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ИНДЕКС У БОЛЬНЫХ С
ДИСФУНКЦИЕЙ В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА.....162**
- О.А. Чернышева, И.Г. Маркина, Л.В. Демидов,
А.С. Антипова, И.Н. Михайлова, Н.Н. Тупицын*
**СУБПОПУЛЯЦИИ ДИСSEМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ.....164**
- О.А. Чернышева, И.Г. Маркина, Л.В. Демидов, А.С. Антипова,
И.Н. Михайлова, Н.Н. Тупицын*
**ДИSSEМИНИРОВАННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ
ПРИ МЕЛАНОМЕ. ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ
ДЕТЕКЦИИ.....166**
- Е.Э. Толстых*
**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ
МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ.....170**
- А.Д. Палладина*
**РОЛЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ CD117 В ДИАГНОСТИКЕ
ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ.....172**
- В.Е. Пономарев, О.А. Чернышева, С.Б. Поликарп
Е.А. Бозуш, Д.А. Горяинов, А.А. Офосуах, Н.Н. Тупицын*
**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ II–III СТАДИЙ.....174**
- Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Н.Н. Тупицын, И.Н. Серебрякова,
В.В. Тимошенко, Т.В. Шведова*
**ВЛИЯНИЕ ГЕМАТОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
НА ПРОГНОЗ ПРИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ У ДЕТЕЙ180**
- О.П. Колбацкая, Т.В. Горбунова, И.Н. Серебрякова,
С.В. Чулкова, Н.Н. Тупицын*
**АНАЛИЗ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ КОСТНОГО МОЗГА
ПРИ РАЗВИТИИ РАБДОМИОСАРКОМЫ У ДЕТЕЙ.....181**

Н.Н. Калитин, Н.С. Кострица, Г.А. Дудина, А.Ф. Карамышева
**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ
СОСУДОВ VEGF И ИХ РЕЦЕПТОРОВ VEGFR У ПАЦИЕНТОВ
С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ:
КОРРЕЛЯЦИЯ С ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ183**

В.С. Косоруков
**«ПОТЕНЦИАЛ ОПУХОЛЕВЫХ НЕОАНТИГЕНОВ
В ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ».....185**

**ПРОГРАММА 16-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»187**

FORM THE EDITOR

The last year was very difficult for us. It was full of hope for revival of and further advance in cancer immunology. We made a series of reports at conferences and two presentations at the Cancer Center Scientific Council. The reports addressed hematogenic metastasis and the role of bone marrow in this process, as well as humoral antitumor immunity. You will find both reports in this issue. And it is our readers who will decide whether the problems of tumor involvement of bone marrow, features of hemopoiesis in cancer, the role of bone marrow immunity in antitumor response and scientific basis for cancer immunoprevention are currently relevant and pressing.

Last autumn I asked Robert Gale to assess N.N. Trapesnikov's protocol from the standpoint of today's immunology and transplantology. Professor Gale sent us a paper in which he highly appreciated the findings of N.N. Trapesnikov and G.I. Deitchman and believed reasonable to study further the problem in randomized trials. His paper is published in this issue and we shall discuss a new potential protocol at the 16th *Hemopoiesis Immunology* conference on the 5–7th of June, 2019, in Tbilisi.

Hemopoiesis features in cancer patients may be an interesting field of cancer research. These problems were addressed in several theses for academic degree and scientific publications, as well as in reports at conferences with international participation. A.D. Palladina, a research scientist of our Hemopoiesis Immunology Laboratory, summarized these papers, added some new facts and wrote an article to be published in this issue. I think that repeated changes in erythroblastograms from patients with squamous-cell head and neck carcinoma, diffuse B-cell large-cell lymphoma, follicular lymphoma may reflect systemic tumor effect on hemopoiesis occurring rather early in neoplastic process. Study of this effect deserves very close attention and may be done using both morphological and immunological methods, as shown in the article in question.

We are currently preparing the next 16th *Hemopoiesis Immunology* international conference, and of course, research scientists from our laboratory will present abstracts or summaries of their research. The conference, as always, will focus on bone marrow of cancer patients, and will put emphasis on hemopoietic and tumor stem cells.

Uri Gallili (USA) will attend the conference for the first time, which means that use of natural antibodies to tumor-associated glycanes will be a matter of the conference discussion. This field of research in cancer immunodiagnosis and immunotherapy is gaining momentum owing to findings of Professor N.V. Bovin, an outstanding Russian scientist. We have cooperated with his team in many of our studies. In fact, this field of research with natural antibodies is an alternative for

the recognized and popular subject of immunity check-point inhibitors (Professor Z.G. Kadagidze will make a report on predictors of response to these agents at the conference). So well, we all know that monopoly is bad and fair competition is good. This is absolutely true for science in general.

*Professor N.N. Tupitsyn
Honored Scientist of the Russian Federation
Editor-in-Chief
Head of Hemopoiesis Immunology Laboratory,
N.N. Blokhin Cancer Research Center, RF Health Ministry*

ОТ РЕДАКТОРА

Прошедший год был сложен для нас. Полон надежд на возрождение и дальнейшее продвижение иммунологии рака. Серия докладов на разных конференциях и два — на Ученых Советах Онкоцентра. Они были посвящены проблеме гематогенного метастазирования и роли костного мозга в этом процессе, а также гуморальному противоопухолевому иммунитету. Оба доклада публикуем в данном номере журнала. И читателю судить, насколько проблемы диссеминации опухоли по костному мозгу, особенностей гемопоэза при раке, иммунной системы костного мозга в противоопухолевом иммунитете, а также научных основ иммунопрофилактики рака своевременны и злободневны.

Осенью прошлого года я попросил Роберта Гейла оценить протокол Н.Н. Трапезникова с позиций иммунологии и трансплантологии сегодняшнего дня. В присланной статье профессор Гейл дает высокую оценку данным Н.Н. Трапезникова и Г.И. Дейчман, считает возможным проведение на этой основе рандомизированных исследований. Статью публикуем в данном номере, а возможный новый протокол обсудим в Тбилиси на предстоящей 16-й конференции «Иммунология гемопоэза» 5–7 июня 2019г.

Одним из интересных направлений исследований при раке может явиться изучение особенностей гемопоэза онкологических больных. Эти вопросы были освещены нами в ряде диссертационных работ и статей, а также научных докладов на конференциях с международным участием. Сотрудница нашей лаборатории иммунологии гемопоэза А.Д. Палладина обобщила эти работы, дополнила некоторыми не публиковавшимися ранее фактами и представила в этом номере журнала. С моей точки зрения повторяющиеся изменения эритроблостограммы при плоскоклеточном раке головы и шеи, диффузной В-крупноклеточной лимфоме, фолликулярной лимфоме могут отражать системное влияние опухоли на гемопоэз, наступающее на достаточно ранних стадиях опухолевого процесса. Исследование этого влияния заслуживает самого пристального внимания и может проводиться, как показано в статье, как морфологическими, так и иммунологическими методами.

Мы готовимся к очередной 16-й Международной конференции «Иммунология гемопоэза» и, разумеется, ряд сотрудников представили тезисы докладов или краткое содержание работ. В центре внимания конференции, как всегда, будет костный мозг онкологического больного, большое внимание мы планируем уделить стволовым клеткам — гемопоэтическим и опухолевым.

Впервые на конференцию приглашен Uri Gallili (США), а значит речь пойдет о возможности использования естественных антител к опухолеассоциированным гликанам. Это направление работ по иммунодиагности-

ке и иммунотерапии рака набирает обороты благодаря работам выдающегося российского ученого, профессора Н.В. Бовина. Многие наши работы проведены совместно с его командой. По сути, данное направление работы с естественными антителами представляет собой альтернативу устоявшемуся и популярному направлению с ингибиторами контрольных точек иммунитета (доклад о предикторах эффекта этих препаратов прочтет на конференции профессор З.Г. Кадагидзе). Ну, что ж, мы знаем, что монополизация — это плохо, а здоровая конкуренция — хорошо. К науке это относится в полной мере.

*Главный редактор журнала
Заслуженный деятель науки России,
профессор, заведующий лабораторией
иммунологии гемопоза ФГБУ
«НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина»
Минздрава России
Н.Н. Тупицын*

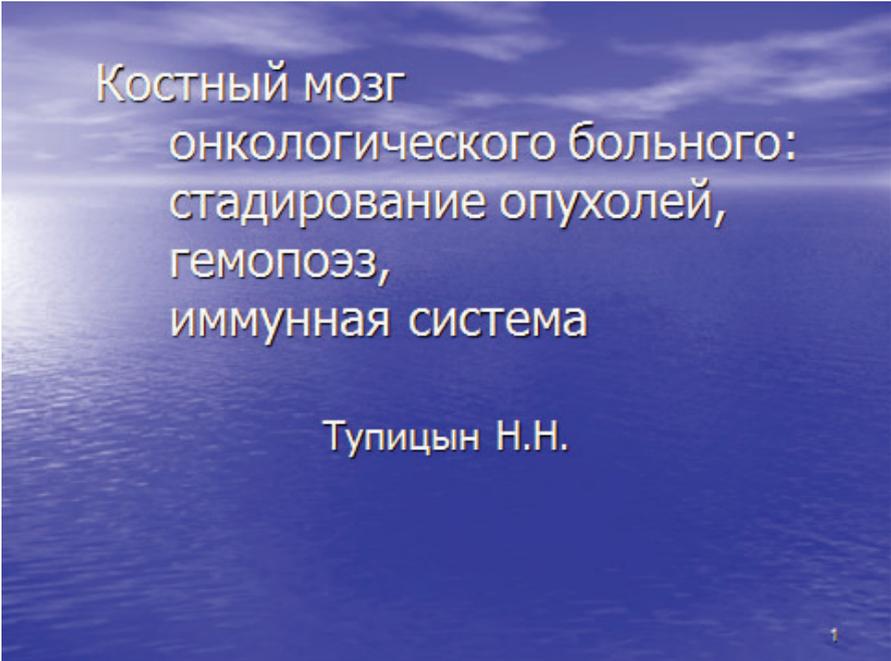
КОСТНЫЙ МОЗГ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО БОЛЬНОГО: СТАДИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, ГЕМОПОЭЗ, ИММУННАЯ СИСТЕМА

Н.Н. Тупицын Н.Н.

Зав. лабораторией иммунологии гемопоэза Централизованного клинико-лабораторного отдела НИИ Клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Доклад на Объединенном Ученом Совете ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Председатель — директор ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России чл.-корр. РАН, профессор И.С. Стилиди

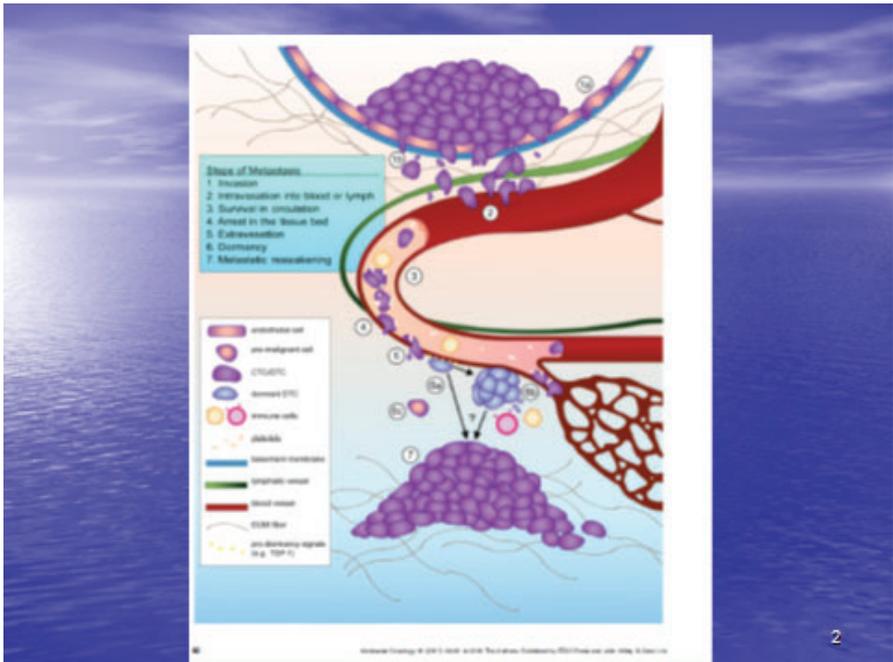
Глубокоуважаемый Иван Сократович, глубокоуважаемые коллеги! Сегодня речь пойдет о трех основных аспектах исследования костного мозга: стадировании опухолей, особенностях гемопоэтической и иммунной систем.



Костный мозг онкологического больного: стадирование опухолей, гемопоэз, иммунная система

Тупицын Н.Н.

Процесс гематогенного метастазирования в упрощенном виде включает инвазию, то есть выход опухолевых клеток за пределы капсулы, интравазацию в кровяные сосуды, выживание в циркуляции, остановку в определенных тканях, экстравазацию за пределы сосуда, состояние покоя и своего рода метастатическое пробуждение.



В крови опухолевые клетки носят название циркулирующих (ЦОК) и находятся там недолго (до 2,5 часов); в костном мозге — диссеминированные опухолевые клетки (ДОК). Количество этих клеток чрезвычайно мало — 1 клетки среди одного — 10 миллионов, и их анализ — это анализ очень редких событий является очень сложным и высоко технологичным.

Терминология/Terminology

Кровь:

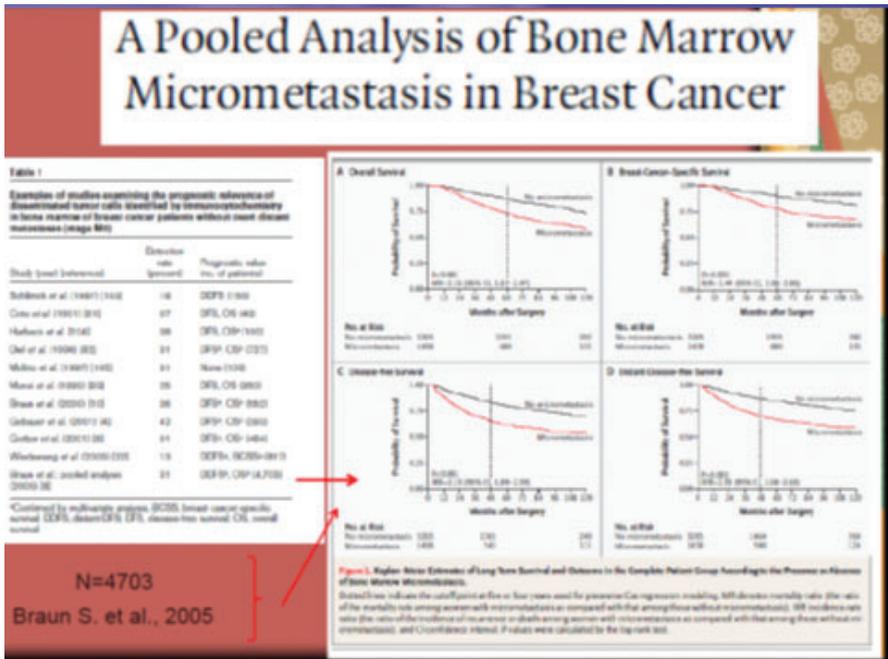
- CTC (ЦОК) – circulating tumor cells, циркулирующие опухолевые клетки

Костный мозг:

- DTC (ДОК) – disseminated tumor cells/ диссеминированные опухолевые клетки
- Присутствуют с частотой 10^{-6} - 10^{-8} среди лейкоцитов крови или миелокариоцитов костного мозга

33

Інформативність дослідження костного мозга доказана неоднократно. Найбільше популярен метааналіз, проведений Braun ще в 2005 году на почти 5 тисячах больных раком молочної залози. Обращаю Ваше внимание, что общая прослеживаемость составила до 10 лет, и это очень важно, так как именно в поздние сроки реализується неблагоприятный потенциал диссеминированных ракових кліток.



В ходе наших научных конференций мы неоднократно обсуждали с иностранными коллегами данную работу, я не раз обращал внимание Клауса Пантела на некоторые ее недостатки. В их числе — забор большого объема костного мозга, отсутствие количества обнаруженных раковых клеток, отсутствие морфологической характеристики изучаемого костного мозга.

Недостатки работы Braun S., 2005

- Во всех 12 работах, использованных для метаанализа, производился забор большого объема костного мозга:
6,1 – 50,0 мл
- Иммуноцитологическое исследование мононуклеаров, чувствительность – 1 клетка (что в знаменателе?)
- Отсутствие морфологической характеристики материала

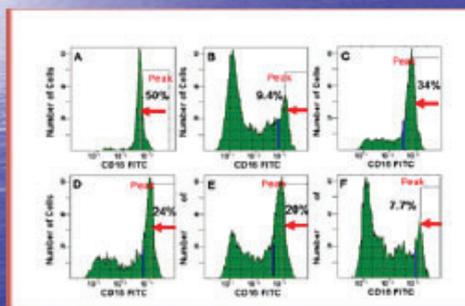
А ведь хорошо известно, что костный мозг требует особенно тщательно-го изучения. И отсутствие разбавления периферической кровью — главное требование к качеству изучаемого образца. Только в этих случаях мы можем говорить об органоспецифичности определяемых опухолевых клеток, их костногомговой принадлежности.

Проблема: разбавление костного мозга периферической кровью

- Abrahamsen J.E. et al. Cytometry 1995, V.19, P.77-85
- Примесь крови отсутствует при взятии маленьких объемов костного мозга, менее 0,2 мл
- Учитывая высокую клеточность костного мозга (примерно в 20 раз выше, чем крови) допустимо взятие менее 1,0 мл костного мозга

Установить является ли костный мозг в действительности костным мозгом или разбавлен кровью можно по миелограмме или, используя иммунологический подход Локена, основанный на экспрессии CD16 на клетках гранулоцитарного ряда.

Степень разбавления костного мозга можно оценить по миелограмме или по методу Loken M. et al., 2010.



Метод основан на экспрессии антигена CD16 на гранулоцитах костного мозга:

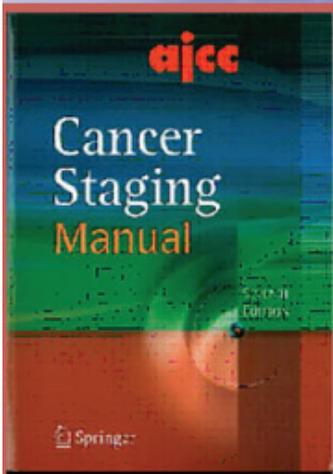
A. кровь;

B, F – нет разбавления костного мозга кровью;

C, E – костный мозг разбавлен кровью

Проблема микрометастазов и диссеминированных опухолевых клеток нашла свое отражение в классификации ВОЗ, где существует раздел M0(i+) — в котором отмечается наличие микрометастазов, выявляемых молекулярными или иммунологическими методами при отсутствии явных признаков отдаленных метастазов. Этот раздел классификации, на сколько мне известно, практически не используется.

Микрометастазы в классификации рака



NCCN Guidelines™ Version 2.2011 Staging Breast Cancer

Table 1 (continued)

Pathologic (p) (continued)

<p>pT1b Microinvasive, or micrometastases in ≤ 1.0 solitary lymph node, section of internal mammary nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected*</p>	<p>pT1c Microinvasive, greater than 1.0 mm (greater than 0.5 mm) in greatest linear extent (GLIE), but not ≥ 2.0 mm (GLIE)</p> <p>pT1d Microinvasive of ductal carcinoma in situ with microinvasive of lobular carcinoma in situ (LCIS) (ductal carcinoma in situ plus lobular carcinoma in situ) (GLIE ≤ 2.0 mm) (GLIE ≤ 2.0 mm)</p> <p>pT1e Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected</p> <p>pT1f Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected</p> <p>pT1g Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected</p> <p>pT1h Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected</p> <p>pT1i Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected</p>	<p>pT2a Microinvasive in clinically detected** (sentinel internal mammary lymph nodes in the presence of one or more ipsilateral axillary lymph nodes, ipsilateral chest wall lymph nodes and/or ipsilateral internal mammary lymph nodes) detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected**</p> <p>pT2b Microinvasive in clinically detected** (sentinel internal mammary lymph nodes in the presence of one or more ipsilateral axillary lymph nodes, ipsilateral chest wall lymph nodes and/or ipsilateral internal mammary lymph nodes) detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected**</p> <p>pT2c Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected**</p> <p>pT2d Microinvasive in ≤ 1.0 solitary lymph node and in internal mammary lymph nodes and/or metastases detected by sentinel lymph-node biopsy, but not clinically detected**</p>
---	---	---

Notes:

- *Not clinically detected** defined as not detected by imaging studies, including mammography or not detected by clinical examination.
- **Clinically detected** is defined as detected by imaging studies, including mammography, or by clinical examination and/or, if applicable, lymph node biopsy for malignancy or at sentinel lymph-node metastases based on the number and size of nodes and lymph node enlargement.

Relevant References (in order of citation):

- 1. The extent of histopathologic evidence of distant metastases, but details of histopathologic or immunohistochemical studies vary in processing about some features, or other histopathologic studies have that are not larger than 1.0 mm in a patient without symptoms at signs of metastases.
- 2. Distant metastases metastases as determined by cancer staging and histopathologic studies about histopathologic studies larger than 1.0 mm.

<http://www.nccn.org/docs/pdfs/clinical/breast/breast.pdf>

В нашей работе используются различные методы обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге. Иммуноцитология.

Иммуноцитологическое обнаружение ДОК. Флуоресцентный метод, антитела САМ 5.2



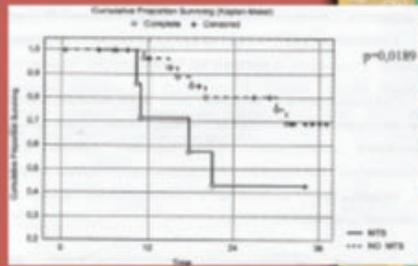
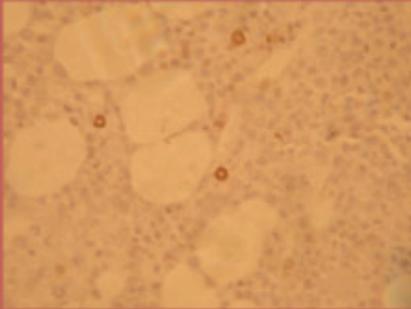
Иммуногистохимия. Приведен пример при раке яичников. Отчетливо видны разрозненные диссеминированные раковые клетки.

Иммуногистохимическое обнаружение ДОК в костном мозге при раке яичников.

(Mabs KL-1, CAM5.2, CK-20)

Frequency: 9/41 (22%)

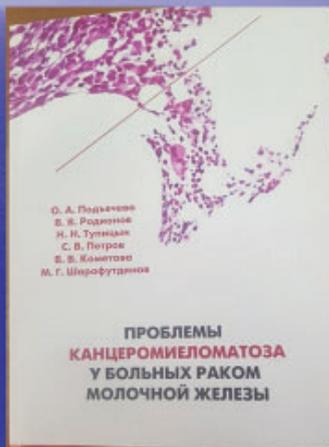
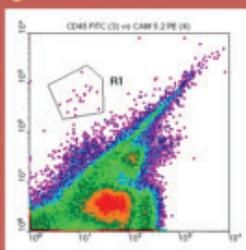
DTC-positive group of ovarian cancer Pts has a poorer prognosis (OS) at a 3-year follow-up ($p=0.0189$). Bokin I., 2010



Проточная цитометрия с предварительным иммуномагнитным обогащением

Детекция ДОК методом проточной цитометрии после иммуномагнитного обогащения

Flow cytometry after immunomagnetic enrichment



Проведенные нами экспериментальные работы показали, что при использовании иммуномагнитного обогащения теряется значительное количество ДОК. На представленной картинке — потеря 70% клеток. Поэтому встает вопрос об изучении ДОК в нефракционированном костном мозге.



Это очень сложно, так как требует создания огромных файлов (до 20–100 млн клеток) или особого программного обеспечения — Калуза. Именно данную методику мы отработали, внедрили и используем в последние годы в лаборатории. Следует отметить, что диссеминированные опухолевые клетки выявляются при операбельном раке (в первую очередь, раке молочной железы) с частотой 30–40%. Они выявляются почти у трети больных с ранними стадиями и даже при раке *in situ*.

Для исследования нефракционированного костного мозга требуется создание огромных файлов, дающих информацию о 10-100 млн клеток костного мозга

- Использование современных проточных цитометров типа ATTUNE с акустической фокусировкой, позволяющих создавать файлы до 100 млн клеток
- Либо использование программного обеспечения, позволяющего объединять несколько небольших файлов в один большой файл – программа Caluza

Іменно поэтому і по ряду других причин в літературе последних лет всё чаще ставится вопрос о том, является ли гематогенная диссеминация поздним событием в опухолевой прогрессии. Ответ однозначен — нет. И поэтому лечение должно быть направлено не только на первичную опухоль, но и на диссеминированные опухолевые клетки. Что сложно, так как селективных методов нет.

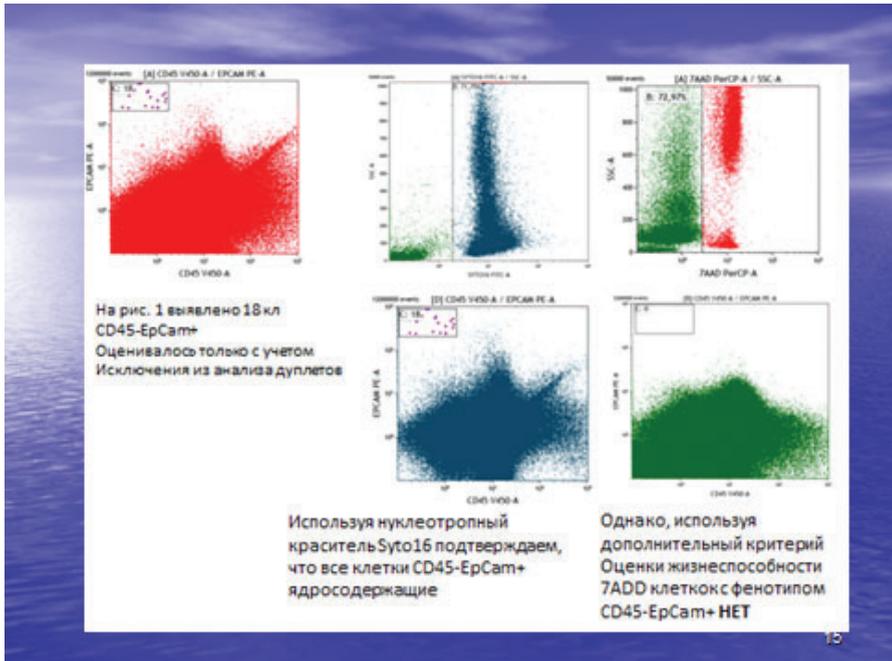
Гематогенная диссеминация — раннее или позднее событие в опухолевой прогрессии?

- Не менее 10% раков не имеют первичного очага
- Ранние СТС более важны с точки зрения прогноза и возможности инициации метастазов, чем поздние
- Ранние ДОК формируют метастазы (Husemann et al., 2008)
- ДОК не имеют многих геномных aberrаций, которые характерны для первичной опухоли, и эволюционируют параллельно с первичной опухолью.

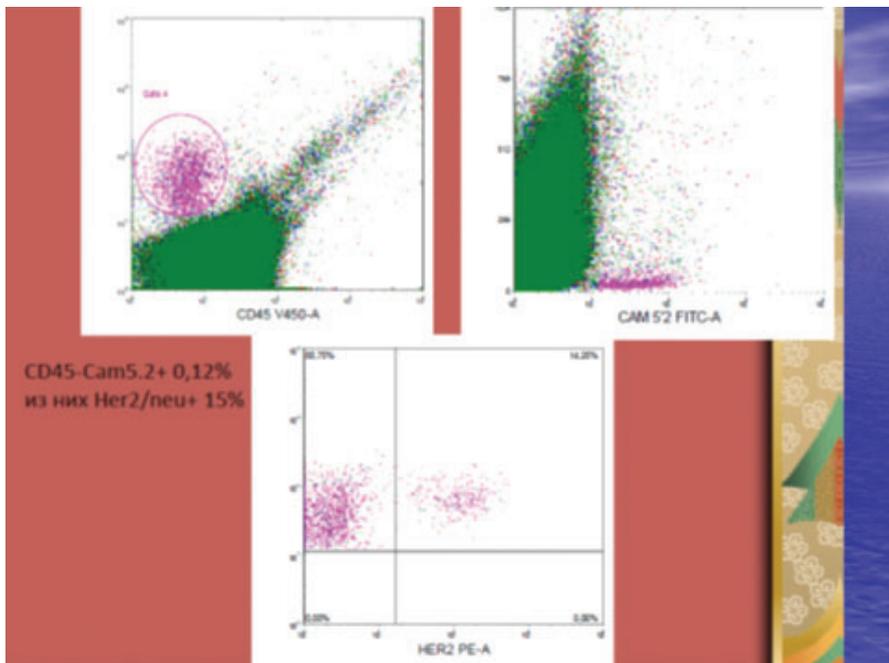
Всё это говорит о необходимости изменения парадигмы в исследованиях метастазов таким образом, чтобы персонализированная терапия была направлена на ДОК (и их циркулирующий отдел — ЦОК), а не только на первичную опухоль.

Как сдвинуть фокус с лечения метастазов к предупреждению метастазов, если на сегодняшний день нет ни одного лекарственного препарата, который может специфически взаимодействовать с ДОК или ЦОК?

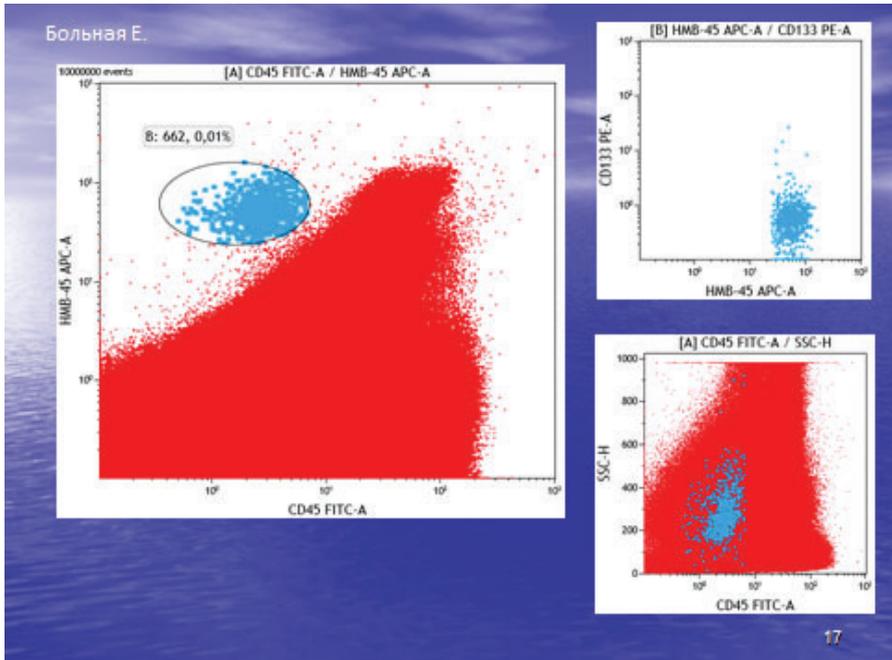
Помимо точного количественного определения диссеминированных опухолевых клеток для понимания их роли и возможных подходов к эрадикации необходимо установление их жизнеспособности и мишеней возможной иммунотерапии. На рисунке показано наличие 18 раковых клеток в костном мозге больной. Синим цветом в верхнем ряду выделены ядродержащие клетки. Как видно все опухолевые клетки соответствуют этому критерию. Зеленым окрашены жизнеспособные клетки, которые не окрашиваются 7-ААД. Среди этих клеток нет опухолевых, то есть все опухолевые клетки, присутствующие в костном мозге больной нежизнеспособны.



Распространенной мишенью иммунотерапии рака молочной железы является Her2/neu. На рисунке представлена яркая экспрессия Her2/neu на диссеминированных опухолевых клетках в костном мозге больной раком молочной железы в случае, когда первичная опухоль была негативна по Her2/neu. В зарубежной литературе накоплено достаточно информации о том, что применение Герцептина или других анти-Her2/neu терапевтических антител в подобных случаях оправдано и значительно продляет жизнь больных. Наши наблюдения при раке молочной железы и раке желудка подтверждают эти данные.

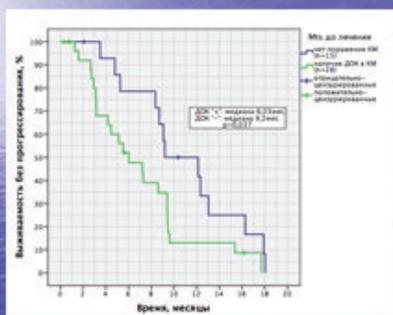


Тематикой лаборатории является изучение стволовых опухолевых клеток. На рисунке показано, что лишь небольшая фракция диссеминированных в костном мозге опухолевых клеток меланомы экспрессирует стволовыхклеточный для данной опухоли антиген CD133.

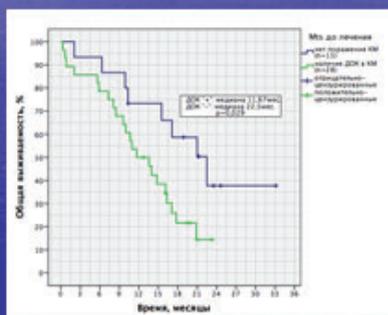


В ходе нашего сотрудничества с отделением химиотерапии был установлен интересный факт. Наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных диссеминированным раком желудка является фактором прогноза общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования. Ни один из изученных клинических и морфологических признаков такими прогностическими свойствами не обладал. Очень важно, что негативным влиянием на прогноз у этой категории больных являлась также нечувствительность ДОК к проводимой химиотерапии, то есть отсутствие снижения количества этих клеток после лечения.

Диссеминированный рак желудка (Н.С.Бесова, Е.С.Обаревич)

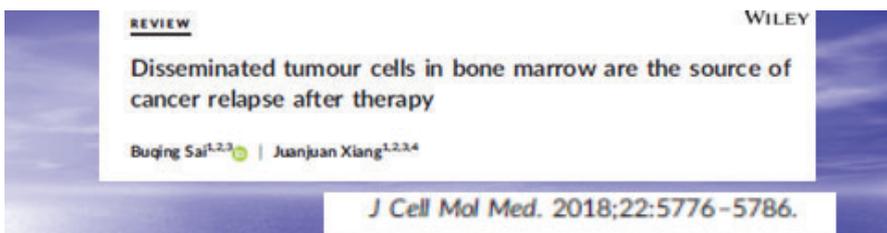


ВБП



ОВ

Именно поэтому в работах последних лет предлагается использовать ДОК, остающиеся в костном мозге после лечения в качестве маркера эффективности терапии — своего рода минимальная резидуальная болезнь по аналогии с онкогематологией. *Подводя итог по этому разделу, можно отметить, что современные методы позволяют количественно определять диссеминированные опухолевые клетки уже на самых ранних стадиях рака, проводить их характеристику с позиций потенциальных мишеней терапии, определять стволовоклеточный компонент. Гематогенная диссеминация не является поздним этапом опухолевой прогрессии. Оценка ДОК после проведения курса терапии целесообразна в качестве критерия эффективности лечения.*



REVIEW WILEY

Disseminated tumour cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy

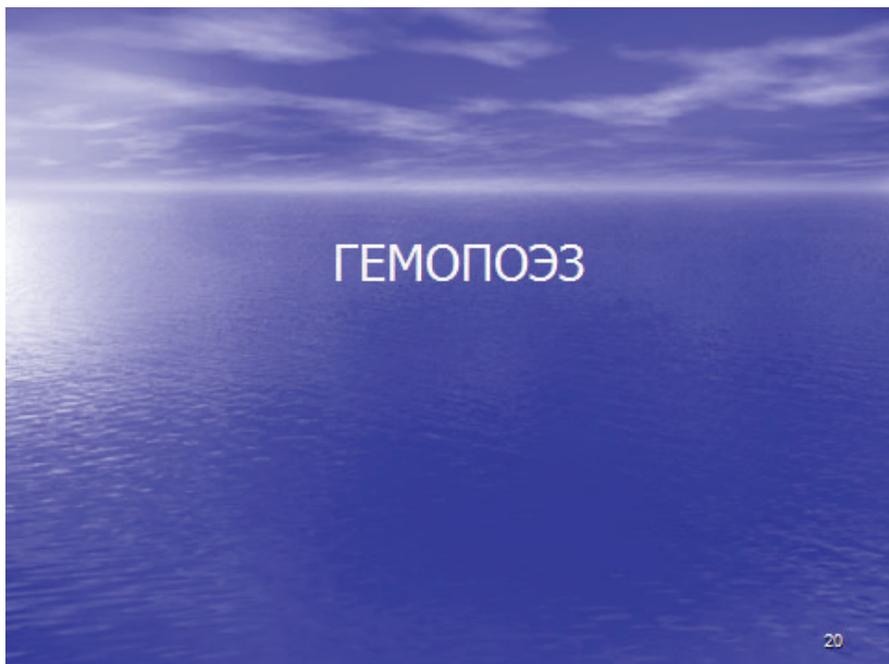
Buqing Sai^{1,2,3} | Juanjuan Xiang^{1,2,3,4}

J Cell Mol Med. 2018;22:5776–5786.

«...ДОК, остающиеся в костном мозге после лечения, могут быть использованы в качестве более надежного маркера, чем ЦОК, для выделения пациентов с неблагоприятным прогнозом и могут быть потенциальным прогностическим фактором и терапевтической мишенью в терапии рака»

19

А теперь обратимся ко второму разделу доклада — к гемопоэзу.

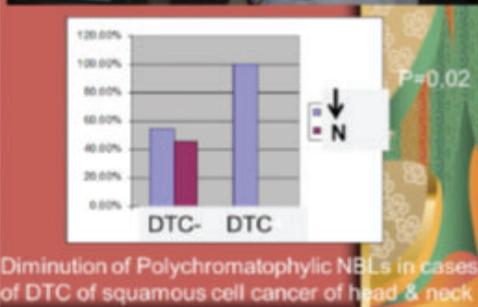


Это чрезвычайно стабильная система. Возьмем эритропоэз. Каждую минуту образуется 2 миллиарда эритроцитов. Их общее количество — триллионы.



Морфологія і імунологія кісткового мозга — це дуже складні розділи онкології. І вони вивчаються в нашій лабораторії дуже опытними спеціалістами. Іменно в такому форматі було встановлено зниження поліхроматофілних нормобластів во всіх випадках наявності ДОК в кістковому мозгу хворих плоскоклітинним раком голови і шиї.

FSBI "RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER" HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY Lab.	
MYELOGRAM	
N CASE HIST.	104070
NAME	BOUKOVA, Department
Diagnosis	Head Cancer
Cellularity	210 000/ml (91,8-195) Megakaryocytes enough
Number of cells	500 100
Blasts	0.0 (0-2.0)
Granulocytic Row	
Promyelocytes	1.0 (1.0-4.0)
	neutrophils eosinophils basophils
Myelocytes	9.0 (7.0-12.2) 0 (0-1.0) 0
Metamyelocytes	11 (8.0-15.8) 0 (0-1.0) 0
Bands	23.0 (12.0-23.7) 0.2 (0.1-1.2) 0
Segments	10.0 (11.1-24.1) 0.0 (0.4-2.4) 0 (0-0.4)
Sum of granulocytes	63.0 (57.1-66.5)
Index of neutrophil maturation	0.5 (0.5-0.9)
Monocytic Row	
Monoblasts	0
Promonocytes	0
Monocytes	2.2 (0.1-5.0)
Lymphoid Row	
Lymphoid cells	0 Plasmoblasts 0
Polymorphocytes	0 Proplasmocytes 0
Lymphocytes	3.4 (4.5-10.7) Plasmocytes 1.0 (0.1-1.0)
Erythroid Row	
Prorubricblasts	0 (0.2-1.1)
Normoblasts Basophilic	2.2 (1.4-4.0)
Normoblasts Polychromatophilic	17.2 (8.0-16.0)
Normoblasts anaphylic	0.0 (0.0-0.0)
Sum of erythroid cells	39.0 (14.5-26.5)
Index of erythroid cell maturation	0.0 (0.7-0.0)
Leuco-erythroid ratio	2.2 (2.1-4.5)
Description	
Bone marrow is hypercellular. Enough megakaryocytes. Myelogram is normal. Metastatic cells are not found (if smear investigated).	
Signature of Physicians	

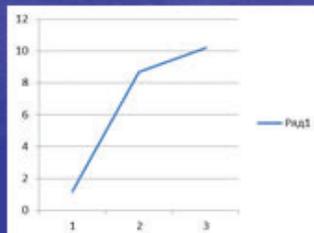
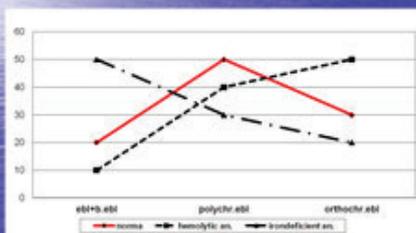


Diminution of Polychromatophilic NBLs in cases of DTC of squamous cell cancer of head & neck

В последующем этот факт подтвержден при фолликулярной и В-крупноклеточной лимфомах. Было установлено изменение эритроблостограммы у 60–80% больных. Преобладание терминальных форм эритробластической дифференцировки — оксифильных нормобластов. Кривая эритроблостограммы — чрезвычайно стабильный признак у человека.

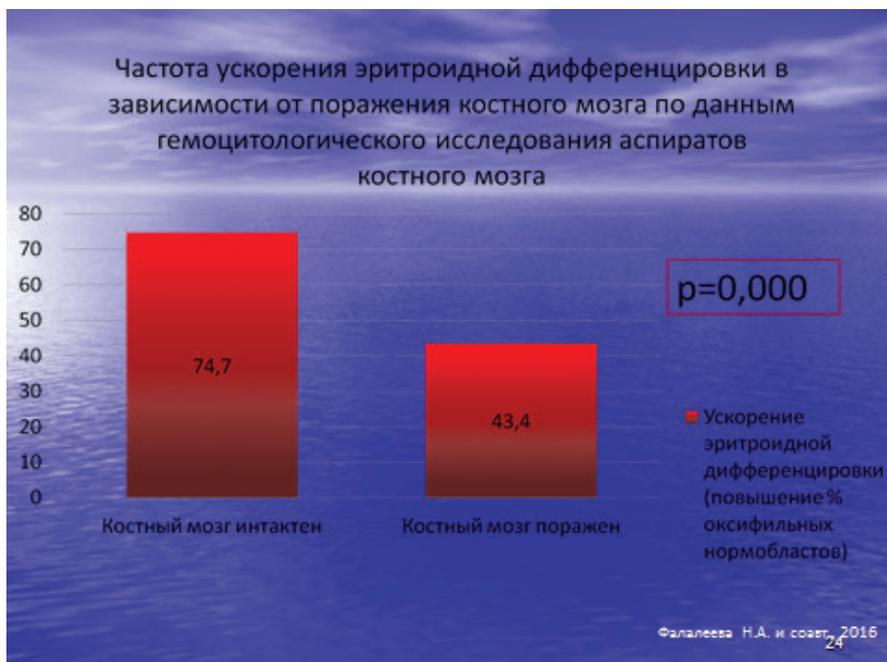
Изменение характера эритроблостограммы у абсолютного большинства больных ДВКЛ и ФЛ

лимфомы

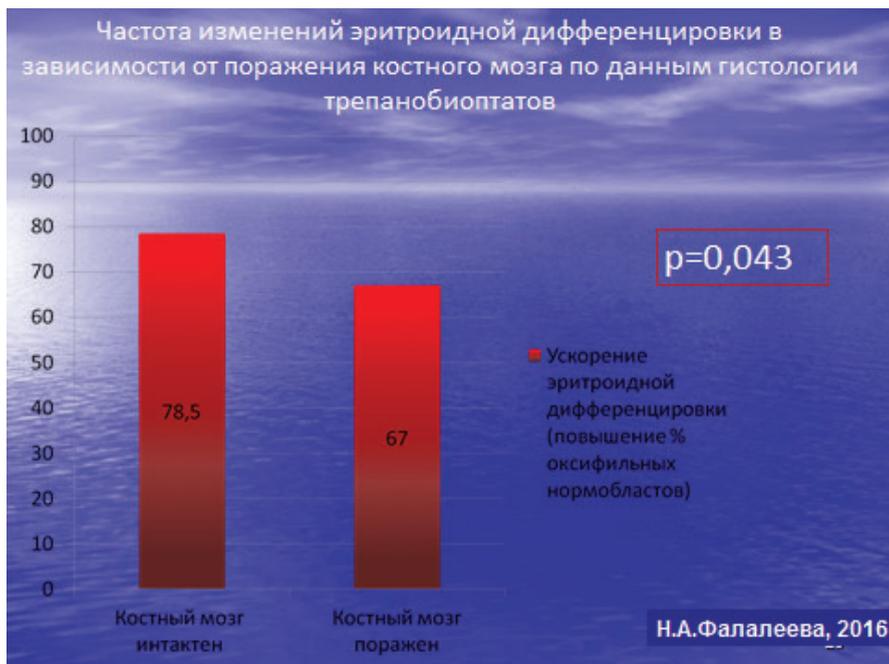


Тупицын Н.Н. и соавт., 2014

Изменения эритробластограммы не были связаны с поражением костного мозга по данным цитологического и



гистологического исследований



и могло быть расценено как компенсаторный признак, так как ассоциировалось с нормальным содержанием эритрокариоцитов костного мозга



и гемоглобина крови

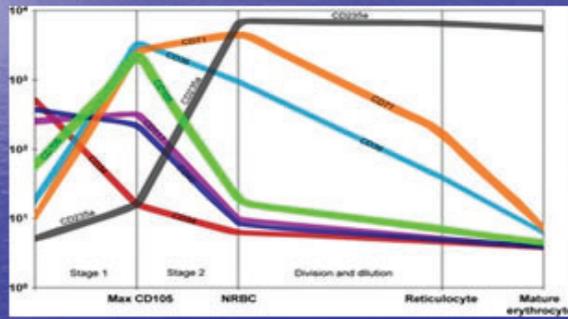


Мы отработали проточно-цитометрический метод определения наиболее зрелой фракции эритрокариоцитов

Возможности определения
более зрелых
эритрокариоцитов
иммунологическими
методами

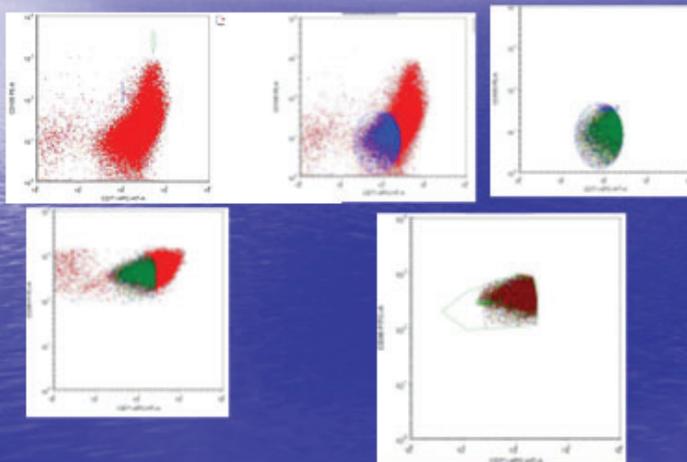
основанный на изменении экспрессии дифференцировочных антигенов этих клеток

Изменения иммунофенотипа в ходе эритроидной дифференцировки



Как видно, в гейте CD36-позитивных эритрокариоцитов можно видеть 2 уровня экспрессии трансферринового рецептора и 2 уровня экспрессии CD105. Выделение клеток с более низкой экспрессией этих антигенов и затем доведение анализируемого окна с учетом более низких CD36 представляет популяцию наиболее близкую к оксифильным эритробластам. Таким образом, установлены особенности дифференцировки эритрокариоцитов у онкологических больных и предложен молекулярный метод их количественного измерения. Причина подобных изменений пока не ясна, и это может являться отражением взаимоотношений организм-опухоль.

Различные уровни CD105 и CD71-позитивных клеток среди CD36+ эритрокариоцитов



И, наконец, несколько слов об особенностях **иммунной системы** костного мозга онкологических больных



Костный мозг является центральным органом иммунитета, но сочетает ряд характеристик периферического лимфоидного органа и имеет отличия от крови по субпопуляционному составу лимфоцитов. Здесь может происходить примирование Т-клеток, накопление CD4, CD8 и В-лимфоцитов памяти и целый ряд других процессов.

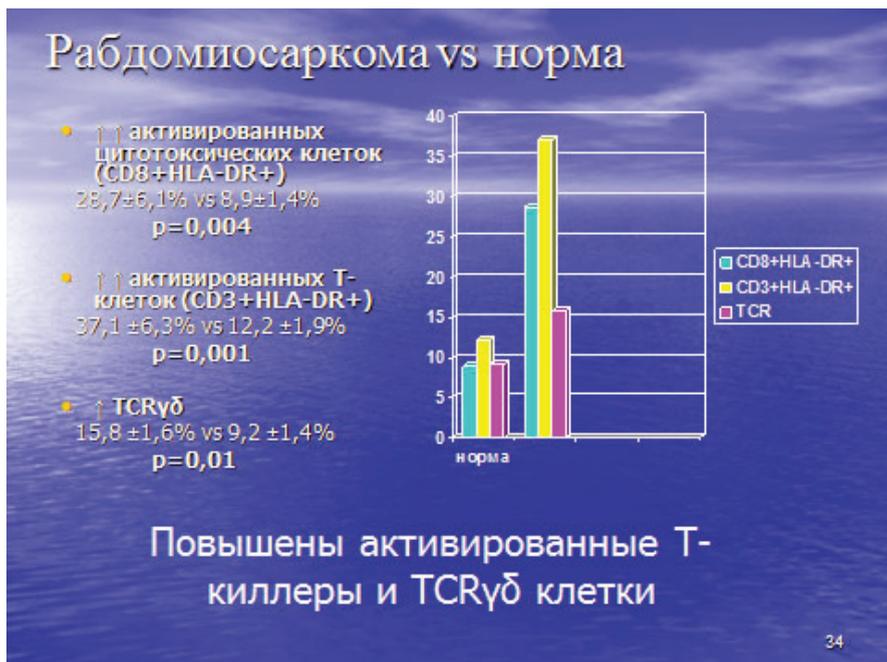
Костный мозг - периферический лимфоидный орган

- Примирование Т-клеток
- Накопление CD8+ Т-клеток центральной памяти
- Накопление CD4-лимфоцитов памяти
- Накопление В-лимфоцитов памяти
- Присутствие В1-лимфоцитов врожденного иммунитета
- Персистенция плазматических клеток, длительно продуцирующих антитела

Нет возможности остановиться на всех разделах наших исследований иммунной системы костного мозга при опухолях. Вместе с тем, отмечу, что уровни клеток врожденного иммунитета в костном мозге были более высокими при раке молочной железы в сравнении с неопухолевыми процессами (NK-клетки, В1-лимфоциты). Это данные Т.В. Григорьевой, хирургическое отделение опухолей молочных желез.



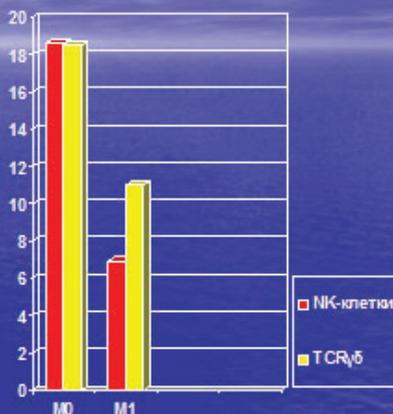
Заслуживает внимания тот факт, что при саркомах у детей повышением уровней TCRγδ-лимфоцитов костного мозга, то есть еще одной группы клеток врожденного иммунитета характеризовалась рабдомиосаркома. Уровни этих клеток были достоверно выше, чем в группе сравнения. Это данные Т.В. Горбуновой, НИИ ДОнГ РОНЦ.



У больных с наличием отдаленных метастазов эти показатели были достоверно более низкими. Конечно, необходимо увеличение числа наблюдений для окончательных выводов (Горбунова Т.В.).

Рабдомиосаркома: M0 (13) vs M1 (5)

- ↓ ↓NK-клеток
 $6,9 \pm 1,9\%$ vs $18,6 \pm 4,8\%$,
 $p=0,039$
- ↓ TCR $\gamma\delta$
 $11,0 \pm 1,7\%$ vs $18,5 \pm 1,7\%$,
 $p=0,019$



При M0 достоверно выше NK-клетки и
TCR $\gamma\delta$ -клетки

Я не случайно особо остановился на показателях врожденного иммунитета. Именно такого рода эффекторы можно предполагать, если рассмотреть протокол Трапезникова-Дейчман, основанный на введении аллогенного костного больным остеогенной саркомой для предотвращения легочных метастазов. Фундаментальные работы Дейчман были опубликованы в 1982,1983 годах в центральных отечественных и зарубежных журналах.

Протокол Н.Н.Трапезникова- Г.И.Дейчман

- Внутривенная инъекция клеток костного мозга сирийских хомячков животным, которым были введены клетки высокоагрессивной саркомы предотвращало развитие легочных метастазов
- Работы Г.И.Дейчман: Int.J.Cancer 1983; 31 (5), 609-15. Булл.эксп.биол.мед. 1982, ХСІV, 10, 102-105

Статья в International Journal of Cancer 1983г так и называлась «Ингибирование экспериментальных и спонтанных легочных метастазов клеток высоко метастатической саркомы сирийских хомячков клетками неактивированного костного мозга и перитонеального экссудата».

Int J Cancer.
1983 May 15;31(5):609-15.
Deichman GI, Kashkina LM, Kluchareva TE,
Vendrov EL, Matveeva VA.

Inhibition of experimental and spontaneous lung metastases of highly metastatic Syrian hamster sarcoma cells by non-activated bone marrow and peritoneal exudate cells.



Принцип експеримента состоял в том, что при одновременном введении клеток аллогенного костного мозга и клеток высокометастазирующей саркомы развитие метастазов в легких подавлялось. В эксперименте метод хорошо зарекомендовал себя и для предотвращения спонтанных метастазов. Я хорошо помню тот день, когда в этом зале во время утренней конференции Николай Николаевич Трапезников сидел за этим столом с Галиной Исааковной и сказал: «Получены очень важные данные, мы на этой основе утвердим клинический протокол»

Принцип экспериментов:

Экспериментальные метастазы

Спонтанные метастазы

Исследования экспериментальных метастазов в легких саркомы клетки, интратрахеальных инъекциями клеток КМ (при интратрахеальной и интратрахеальной инъекции)

Интратрахеальная инъекция клеток		Интратрахеальная инъекция в легкие	
№ группы	КСА	число животных	число метастазов у животных
1,3-10 ⁶	Контроль	---	5 (n=5)
1,3-10 ⁶	5x10 ⁶	1	0, 0, 0, 0, 55
1,3-10 ⁶	2,2-10 ⁷	2	0, 0, 0, 7, 15
1,3-10 ⁶	1,1-10 ⁷	2	0, 0, 10, 31, 80

* Сопоставимы между собой данные КМ и спонтанные клетки, введенные интратрахеально и интратрахеально в группы.

№ группы	КСА	число животных	число метастазов у животных
1,3-10 ⁶	Контроль	---	5 (n=5)
1,3-10 ⁶	5x10 ⁶	1	0, 0, 0, 0, 55
1,3-10 ⁶	2,2-10 ⁷	2	0, 0, 0, 7, 15
1,3-10 ⁶	1,1-10 ⁷	2	0, 0, 10, 31, 80

Deitchman G.I., 1982
5 times, 2-5 day interval

Injection of effector cells	Number of cells x10 ⁶	Spontaneous lung metastases	Number of animals with Mts	Number of Mts in animal
Control	-	17 (n=17)	4, 5, 8, 22, 25, 37, 41, 47, 54, 55, 69, 63, 64, 72, 112, 141	
PF	10,3	6 (n=10)	0, 0, 0, 0, 2, 6, 9, 19, 23, 84	
BM	24,7	3 (n=8)	0, 0, 0, 0, 7, 10, 25	
Spleen	16,7	7 (n=8)	0, 1, 3, 3, 22, 32, 116, 116	

На слайде некоторые детали протокола. Он был проведен 24 больным в том числе детям. Переливался костный мозг в основном от близких родственников. Совместимость оценивалась только по группе крови и резус-фактору. На следующий день после однократной инфузии большого количества клеток костного мозга проводилось радикальное удаление опухоли (ампутация).

Протокол Н.Н.Трапезникова – Г.И.Дейчман

- 24 больных остеогенной саркомой (возраст: 6-44 лет)
- Однократная инъекция клеток костного мозга – $12-22 \times 10^9$ в 500мл среды (buffy coat)
- На следующий день радикальное удаление опухоли (ампутация)
- Совместимость по группе крови и резус-фактору
- Как правило, близкие родственники (братья, сестры, родители)
- В редких случаях – не родственники

А вот его результат. Существенное предотвращение развития легочных метастазов остеогенной саркомы. Опубликовано в International Journal of Cancer в 1993 году.

Клинический протокол по применению аллогенного костного мозга при остеосаркомах



Н.Н.Тралезников

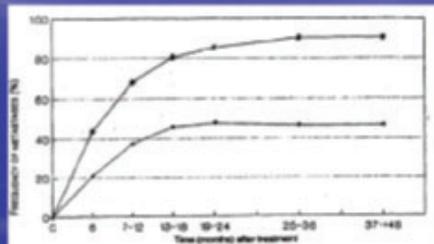


FIGURE 1 - Dynamics of appearance of metastases in osteogenic sarcoma patients treated with allogenic bone-marrow cells and radical surgery (Group I; ■-). Patients in Group II (*-) were treated with radical surgery only (controls).

IJC 1993, 54, 907-910

Таким образом, клетки нормального неактивированного аллогенного костного мозга могут быть использованы для подавления развития метастазов примерно у 50% больных остеогенной саркомой.

Вывод

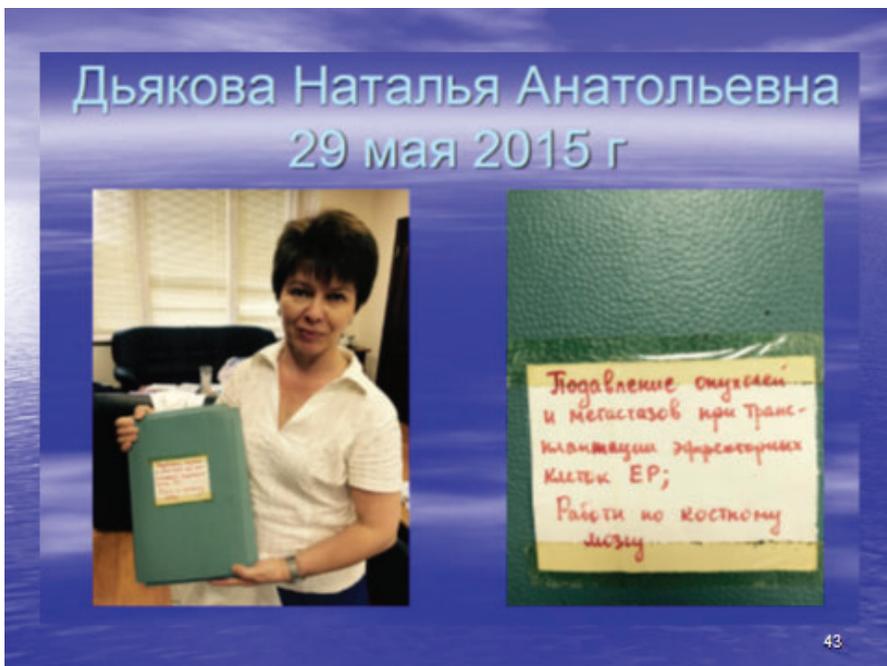
- Клетки нормального неактивированного аллогенного костного мозга могут быть использованы для подавления развития метастазов примерно у 50% больных остеогенной саркомой

Мы неоднократно обсуждали возможности проведения этого протокола в рамках нашей международной конференции «Иммунология гемопоза» и в стенах онкоцентра. Общее мнение отечественных и зарубежных гематологов и трансплантологов позитивное. Осенью прошлого года я попросил Роберта Гейла написать статью, своего рода анализ, рецензию работы Н.Н. Трапезникова. Он это сделал, и данная статья будет опубликована в ближайшем номере журнала «Иммунология гемопоза» на русском и английском языках. Роберт Гейл дал высокую оценку работе Трапезникова, о чем говорит само название: **Иммунотерапия сарком в России: еще один спутник?** Он отмечает необходимость проведения на этой основе, которую он называет II фазой клинических испытаний, рандомизированных исследований. В данном номере журнала представлена статья Роберта Гейла.

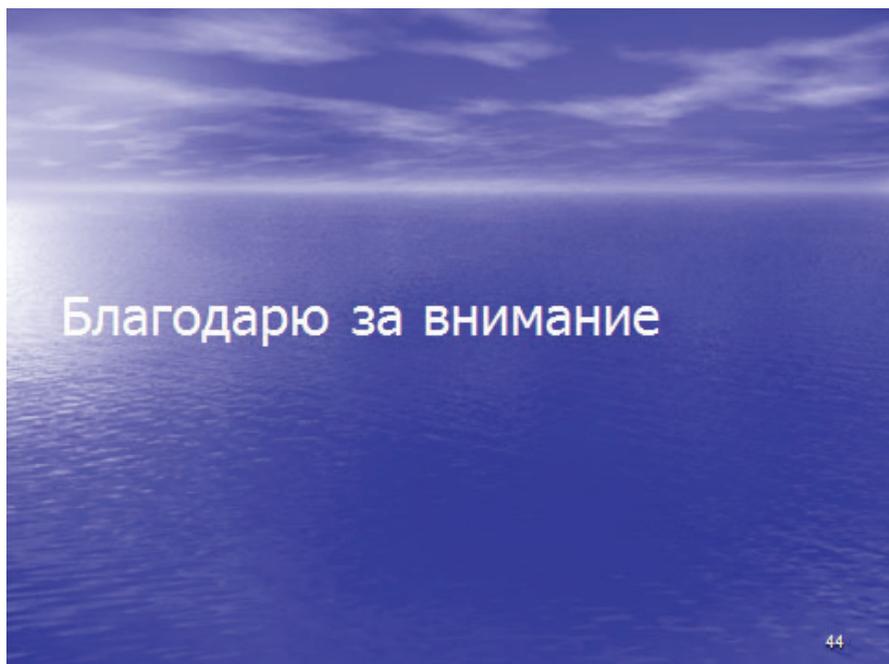
Роберт Гейл

- **Иммунотерапия сарком в России: еще один спутник?**
- **Immune therapy of sarcomas in Russia: Another Sputnik?**

3 года назад ко мне зашла сотрудница лаборатории Галины Исааковны Дейчман Наталья Анатольевна Дьякова и подарила папку, оставшуюся после смерти Галины Исааковны с её записями и докладами по данному вопросу. Галина Исааковна и ее сотрудники очень верили и верят в данный протокол и очень хотят его возобновить. Такого же мнения Димури Мелитонович Мхеидзе, он мне неоднократно об этом говорил. Я думаю, что мы можем это сделать. Таким образом, изучение диссеминированных клеток в костном мозге, их динамики в процессе лечения, особенностей гемопоэза у онкологических больных, а также иммунной системы костного мозга дает дополнительные сведения к пониманию степени истинной распространенности процесса, поиску путей селективной эрадикации ДОК, включая иммунные и гематологические механизмы.



Благодарю за внимание.



И благодарность всем сотрудничающим с нами отделениями, материалы которых я сегодня использовал.

Отделения, изучающие ДОК

- НИИ ДОиГ
- 23 голова и шея
- 22 клиническая фармакология
- 21 биотерапии
- 20 гематологии
- 19 химиотерапии
- 16 гинекологии
- 15 урологии (рак предстательной железы)
- 13 абдоминальное отделение (рак желудка)
- 12 опухолей молочных желез
- 11 торакальное

IMMUNE THERAPY OF SARCOMAS IN RUSSIA: ANOTHER SPUTNIK?

Robert Peter Gale

Haematology Research Centre, Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, Imperial College London, London, UK.

Correspondence

Robert Peter Gale MD, PhD, DSc(hc), FACP, FRCP, FRSM
Haematology Research Centre, Division of Experimental Medicine,
Department of Medicine, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK
P +1-908-656-0484
F +1-310-388-1320
E robertpetergale@alumni.ucla.edu

*The thing that hath been, it is that which shall be;
and that which is done is that which shall be done:
and there is no new thing under the sun.
Ecclesiastes 1.9*

Cancer immune therapy is all the rage with a long list of persons claiming credit, many living and even some dead (Don't ask me how.). One early pioneer in 2600 BCE was Imhotep, physician to Egyptian pharaoh Dejesa, who applied purulent material from a wound to the pharaoh's cancer and claimed it regressed (Figure). In the 13th century St. Peregrine (patron saint of cancer survivors) reported spontaneous regression of his cancer when the lesions became infected. During the 18th and 19th centuries cancer surgeons often left wounds out to facilitate development of infections which they claimed resulted in favourable anti — cancer effects. The pathologist Rudolph Virchow in the mid-19th century noted inflammatory infiltrates in cancer biopsies. In 1866, Wilhelm Busch reported regressions in persons with sarcomas who had post — operative wound infections. Russians were also in the game: Dr. (later writer) Anton Chekov noted an association between erysipelas (έρυσίπελας [red skin]; usually β -hemolytic group A Streptococcus) and cancer regression in 1884. A few years later William Coley, a American sarcoma surgeon, used bacterial toxins to induce an inflammatory response in people with metastatic cancers including sarcomas with some success but mostly failures. Early in the 20th century Paul Ehrlich hypothesized that host defense may prevent neoplastic cells from developing into tumors.¹ Nothing much happened for the next 70–80 years when there was a flurry of interest in reviv-



Prof. Nikolai Trapeznikov

ing immune therapy of cancer based on several interesting clinical observations including: (1) an increased incidence of cancers in persons with congenital and acquired immune deficiency including solid organ transplant recipients (so-called *immune surveillance*; reviewed in 2); (2) spontaneous regression of some cancers such as neuroblastoma (especially infants with stage IV_s disease), sarcomas and kidney cancer (reviewed in 3); and (3) reports of immune-mediated anti-leukaemia effects after allogeneic bone marrow transplants (reviewed in 4). Many, but not all these cancers, are virus-associated such as lymphomas (Epstein—Barr virus) and cervix cancer (human papilloma virus [HPV]).⁵ Considerable experimental data were marshalled to support the role of the immune system in cancer (reviewed in 6) followed by 20 years of clinical trials of interventions such as Bacillus Calmette—Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum*, cancer cell vaccines, di-nitro-chloro-benzene (DNCB), interleukin-2 and others. None of these therapies, all claimed to be effective in uncontrolled trials, proved effective in randomized studies with the. Enthusiasm for immune therapy waned only to be revived in the past 10 years by a series of advances in specific cancers such as lymphomas, leukaemias, melanoma and kidney cancer with conventional and bi-specific monoclonal antibodies such as anti-CD20 (rituximab in lymphoma), anti-CTLA4 antibodies (in melanoma) and anti-PD1 and PD1-R antibodies (in practically ev-

everything) and, most recently, chimeric antigen receptor (CAR) — T-cells (in lymphoid cancers). These advances led to a recent Nobel Prize for immune therapy to James Allison of the US and Tasuku Honjo of Japan.

However, there is a largely unrecognized experiment in the history of cancer immune therapy: that of Prof. Nikoli N. Trapeznikov (Figure) and his colleagues at the Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences in Mockba (now the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center). In 1983, Deichman and co-workers published a typescript in the *International Journal of Cancer* in which they described the ability of allogeneic bone marrow cells to inhibit the growth of experimental and spontaneous lung metastases in a Syrian hamster sarcoma model.⁷ Spleen cells were ineffective as were syngeneic cells. Curiously, lethally — irradiated bone marrow cells were also effective but heat-killed cells were not. Another curiosity is that although lung metastases were inhibited, subcutaneous cancer implants in the same animals were not.

The Trapeznikov team extended these observations to 24 subjects with osteogenic sarcoma in a phase-2 clinical trial reported in the same journal 10 years later.⁸ They described giving allogeneic bone marrow cells immediately after surgery and compared results with 41 seemingly similar subjects receiving surgery only. They claimed a substantial reduction in the incidence of lung metastases with several long-term, cancer-free survivors. No randomized trial was ever reported and we are left to wonder whether their intervention was effective. Interestingly, the infused bone marrow cells were matched for ABO and Rh but for HLA. However, because most donors were close relatives it is likely many donors were at least HLA-haplo-type-matched. No post-infusion immune suppression was given and there no studies to document whether the infused cells engrafted, even transiently, and no report of any subject developing graft-*versus*-host disease (GvHD). In general, untreated persons with cancer, although not immunologically normal, are able to reject a graft of bone marrow cells unless they are receiving anti-cancer drugs and/or immune suppression. None of Prof. Trapeznkov's subjects received these modalities. Consequently, these subjects are best regarded as having received an infusion of bone marrow cells rather than a transplant.

The question is how to interpret these data in the light of recent progress understanding the immune system and progress in immune therapy? There are many possible issues to discuss. The 1st relates to anti-cancer effects associated with haematopoietic cell (bone marrow) transplants. In persons with leukaemia receiving haematopoietic cell transplants there is clear evidence of an anti-leukaemia effect termed *graft-versus-leukaemia* (reviewed in 9). Whether this effect is leukaemia — specific or a form of GvHD (or both) is controversial (reviewed in 10). However, no such anti-cancer effect is convincingly reported after haematopoietic cell transplants for solid cancers save some controversial data from persons with kidney cancer.¹¹

There are certainly no convincing data of a *graft-versus-sarcoma* effect in humans but this is not well-studied.

Did Prof. Trapeznikov's subject have engraftment or persistence of the infused bone marrow cells or were they immediately rejected and destroyed? As discussed above engraftment seems unlikely absent pre — and post — infusion drug-induced immune suppression and the absence of GvHD. However, I cannot exclude the possibility of transient persistence of the infused cells followed by rejection.

The next question is whether Prof. Trapeznikov giving some form of cell-based immune therapy such as allogeneic T — or natural killer (NK)-cells. Unmodified allogeneic T-cells from HLA-match, HLA-haplotype-matched or unrelated donors to persons with solid cancers is not reported to be successful in most instances. However, we know solid cancers can grow and metastasize when a person with cancer receives immune suppression such as after a kidney transplant.¹² In 2011, Rosenberg and co-workers reported adoptive immune therapy with CD8 — positive T-cells genetically engineered to recognize the NY-ESO-1 antigen could induce regressions in persons with metastatic synovial sarcoma.¹³ However, the bone marrow cells Prof. Trapeznikov infused were allogeneic and were not genetically-modified.

Could it be Prof. Trapeznikov was giving NK-cells which inhibited the development of lung metastases? NK-cell therapy is reported effective in acute myeloid leukaemia (reviewed in 14–16) including cells from HLA-haplotype-matched relatives like those used by Prof. Trapeznikov. There are no controlled trials of this approach in persons with solid cancers and certainly not in sarcomas. In their report the Trapeznikov team suggested lung metastases were more common in subjects who had low levels of NK-cell activity pre — bone marrow infusion and surgery. They also suggested another possible mechanism for the claimed suppression of lung metastases: binding of the infused bone marrow cells to sarcoma cells in the lung followed by a host-mediated allogenic response (rejection) with the sarcoma micro-metastases killed as *innocent* bystanders. Creative thinking indeed. In the end the authours correctly stated: *The mechanism of anti-metastatic activity of normal allogeneic bone marrow cells may be proposed only very approximately.* How true.

I find it interesting many trials of immune therapy of solid cancers were done by cancer surgeons rather than medical oncologists or immunologists. Profs. Coley, Trapeznokov, Donald Morton and Steven Rosenberg come to mind. Why? Are cancer surgeons smarter, more creative, more aggressive, greater risk takers or, as most medical oncologists would say: *less disciplined* (or some or all of these)? This is a mine field I will avoid.

The bottom line is Prof. Trapeznikov and his colleagues may have been early pioneers of immune therapy of sarcoma but it is impossible for us to know without a randomized trial proving efficacy and with data on the *mechanism-of-action*, if any. Certainly, his approach was creative and based on interesting pre-clinical data.

What we need is someone to repeat his clinical trial with a control cohort and with analyses of surrogate makers of immunity. Current immune therapy trials for sarcomas fall into 6 categories: (1) adoptive cell therapy; (2) therapeutic vaccines; (3) checkpoint-inhibitors; (4) immune modulators; (5) oncolytic viruses; (6) adjuvant immune therapy; and (7) monoclonal antibodies. > 50 clinical trials are registered in clinicaltrials.gov and there are several recent reviews.^{17,18} Will any of these interventions be effective? Time will tell (hopefully).

REFERENCES

1. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tjdschr Geneesk.* 1909;5:273–290.
2. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;11:991–8.
3. Everson T.C. The spontaneous regression of cancer. Philadelphia, JB Saunders & Co. 1966.
4. Horowitz M.M., Gale R.P., Sondel P.M., Goldman J.M., Kersey J., Kolb H.J., et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75:555–62.
5. Vajdic C.M., van Leeuwen M.T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer.* 2009;125:1747–54.
6. Schwann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007;117:1137–46.
7. Deichman G.I., Kashkina L.M., Kluchareva T.E., Vendrov E.L., Matveeva V.A. Inhibition of experimental and spontaneous lung metastases of highly metastatic Syrian hamster sarcoma cells by non-activated bone marrow and peritoneal exudate cells. *Int J Cancer.* 1983;31:609–15.
8. Esartia P.T., Deichman G.I., Kluchareva T.E., Matveeva V.A., Uvarova E.N., Trapesnikov N.N. Allogeneic bone-marrow transfusion suppresses development of lung metastases in osteogenic sarcoma patients after radical surgery. *Int J Cancer.* 1993;54:907–10.
9. Negrin R. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *ASH Education Book* 2015; 1:225 – 30.
10. Gale RP, Fuchs EJ. Is there really a specific graft-versus-leukaemia effect? *Bone Marrow Transplant.* 2016;doi:10.1038/bmt.2016.183 (advance online publication).
11. Childs R, Chernoff A, Contention N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloabla-

- tive allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003;343:750 – 8.
12. Penn I. The effect of immunosuppression on pre-existing cancers. *Transplantation.* 1993;55:742 – 7.
 13. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29:917 – 24.
 14. Hansrivijit P, Gale RP, Barrett J, Ciurea SO. Cellular therapy for acute myeloid leukemia- current status and future prospects. *Blood Reviews.* 2019:in press.
 15. Dahlberg CIM, Sarhan D, Chrobok M, Duru AD, Alici E. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Front Immunol.* 2015;6 – 605.
 16. Bjorklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, *et al.* Complete remission with reduction of high-risk clones following haploidentical NK-cell therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res.* 2018;15:1834 – 44.
 17. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science.* 2015;348:52 – 8.
 18. Hoos A. Development of immune-oncology drugs- from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15:235 – 47.

ИММУНОТЕРАПИЯ САРКОМ В РОССИИ: ЕЩЕ ОДИН СПУТНИК?

Роберт Питер Гейл

Гематологический исследовательский центр, Отделение экспериментальной медицины, Медицинский отдел, Лондонский имперский колледж, Лондон, Великобритания

Адрес для корреспонденции

Robert Peter Gale, MD, PhD, DSc(hc), FACP, FRCP, FRSM

Haematology Research Centre, Division of Experimental Medicine,

Department of Medicine, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK

P +1-908-656-0484

F +1-310-388-1320

E robertpetergale@alumni.ucla.edu

*Что было, то и будет; и что делалось,
то и будет делаться, и нет ничего нового под солнцем.*

1.9 Экклезиаст

Иммунотерапия рака всегда будоражила умы людей, многие из которых живы и поныне, а некоторые уже умерли (не спрашивайте меня, как!). Одним из ранних пионеров являлся Имхотеп (2600г. до н.э.) — врач египетского фараона Джосера; он лечил фараона больного раком, прикладывая к опухоли гнойный материал из раны, уверяя, что опухоль после этого регрессировала (Рисунок). В 13-м веке Св. Перегрин (небесный покровитель излечившихся от рака) сообщал о спонтанной регрессии рака у себя после инфекции. В XVIII–XIX веках хирурги-онкологи во время операции часто оставляли раны открытыми, чтобы в них развилась инфекция, которая по их уверению, давала противоопухолевый эффект. В середине XIX столетия патологоанатом Рудольф Вирхов обнаружил воспалительные инфильтраты в биоптатах опухолей. В 1866г. Вильгельм Буш сделал сообщение о регрессии опухолей у больных саркомой в результате инфекции в послеоперационном периоде. Русские тоже вступили в игру: врач Антон Чехов (впоследствии ставший писателем) заметил связь между рожистым воспалением (*έρυσιτελας* [красная кожа]; обычно β -гемолитическая стрептококковая инфекция группы А) и регрессией злокачественной опухоли (1884г.). Несколькоими годами позже американский хирург Уильям Коули при помощи бактериальных токсинов вызывал воспалительную реакцию у пациентов с метастатическим раком, в том числе саркомой: в не-



Prof. Nikolai Trapeznikov

которых случаях успешно, хотя в большинстве — нет. В начале XX века Пауль Эрлих выдвинул гипотезу о том, что защитная система организма может препятствовать развитию опухоли из неопластических клеток.¹ В следующие 70–80 лет ничего не происходило, однако затем проявилась новая вспышка интереса к иммунотерапии рака после публикации ряда интересных наблюдений: (1) повышение заболеваемости раком у пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, в том числе перенесших трансплантацию солидных органов (так называемый «иммунологический надзор», см. 2); (2) спонтанная регрессия некоторых злокачественных опухолей, таких как нейробластома (особенно у детей первых лет жизни с IVs стадией заболевания), саркома и рак почки (см. 3); и (3) сообщения о противоопухолевом эффекте, опосредованном иммунитетом, при лейкозах после аллогенной трансплантации костного мозга (см. 4). Многие, но не все из этих форм рака связаны с вирусами, как например лимфомы (вирус Эпштейна—Барр) и рак шейки матки (вирус папилломы человека [HPV]).⁵ Было получено значительное число экспериментальных данных, подтверждающих роль иммунной системы при раке (см. 6) и затем последовали 20 лет клинических исследований с использованием бациллы Кальметта—Герена (BCG), *Corynebacterium parvum*, вакцин из раковых клеток, динитрохлорбензола (DNCB), интерлейкина-2 и других

веществ. Ни один из этих терапевтических подходов (которые якобы были эффективными в неконтролируемых исследованиях) не доказал эффективность в рандомизированных испытаниях. Энтузиазм по поводу иммунотерапии затих, чтобы снова возродиться через 10 лет после публикации сообщений об успешном лечении некоторых форм рака, таких как лимфома, лейкоз, меланома и рак почки, после применения обычных и би-специфичных моноклональных антител, таких как антитела к CD20 (ритуксимаб при лимфоме), к CTLA4 (при меланоме) и антитела к PD1 и PD1-R (практически универсальные) и, недавно, Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR) — Т-клетки (при лимфоидных опухолях). Эти успехи послужили основанием для присуждения Нобелевской премии за иммунотерапию Джеймсу Аллисону из США и Тасуки Хондзе из Японии.

Однако в истории иммунотерапии рака известен до конца не признанный эксперимент, проведенный Николаем Николаевичем Трапезниковым (Рисунок) с коллегами в Российском онкологическом научном центре Российской академии медицинских наук в Москве (в настоящее время Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина). В 1983 г. Дейчман с соавт. опубликовали в *International Journal of Cancer* статью о способности аллогенных клеток костного мозга подавлять рост экспериментальных и спонтанных метастазов саркомы в легкие у сирийского хомяка.⁷ Клетки селезенки, так же как и сингенные клетки, оказались неэффективными. Любопытно, что летально облученные клетки костного мозга были эффективными, тогда как клетки, погибшие от нагревания — нет. Также интересно, что несмотря на подавление метастазов в легкие, подкожные имплантаты рака в тех же животных не пострадали.

Команда Трапезникова расширила свои наблюдения на 24 больных остеогенной саркомой в рамках клинического исследования II фазы, сообщение о котором было опубликовано в том же журнале 10 лет спустя.⁸ Авторы вводили аллогенные клетки костного мозга в виде инфузии сразу после хирургического вмешательства и сравнивали результаты у этих больных с результатами в аналогичной группе из 41 пациента, получавшей только хирургическое лечение. Сообщалось о существенном снижении частоты метастазирования в легкие у нескольких больных, проживших длительное время после лечения. Рандомизированные исследования не проводились, и нам остается только надеяться, что указанное вмешательство было действительно эффективным. Интересно отметить, что введенные клетки костного мозга совпадали по ABO и Rh, но не HLA. Однако, учитывая, что большинство доноров были близкими родственниками, скорее всего многие доноры имели, по крайней мере, тот же гаплотип HLA. Подавление иммунитета после инфузии не проводили, также не было исследований, подтверждающих приживаемость (даже временную) введенных клеток, не сообщалось также о развитии реакции трансплантат

против хозяина (ТПХ). В общем случае организм онкологических больных, не являясь иммунологически нормальным, способен отторгать пересаженные клетки костного мозга, если больные не получают противоопухолевые препараты и/или средства, подавляющие иммунитет. Ни один из больных Н.Н. Трапезникова такие препараты не получал. Следовательно, в этом случае следует говорить об инфузии, а не трансплантации клеток костного мозга.

Возникает вопрос, как интерпретировать эти данные в свете прогресса в нашем понимании иммунной системы и достижений в иммунотерапии. Здесь много тем для обсуждения. Первая связана с противоопухолевыми эффектами при трансплантации гематопоэтических клеток (клеток костного мозга). У больных лейкозом, перенесших трансплантацию гематопоэтических клеток, наблюдались четко выраженные признаки эффекта, который получил название «трансплантат против лейкоза» (см. 9). Неясно, является этот эффект специфичным для лейкоза или формой ТПХ (или и тем и другим) (см. 10). Однако, не имеется убедительных сообщений о подобном противоопухолевом эффекте после пересадки гематопоэтических клеток при солидных опухолях, за исключением некоторых противоречивых данных о больных раком почки.¹¹ И конечно, нет убедительных данных об эффекте «*трансплантат против саркомы*» у человека, однако этот вопрос достаточно не изучен.

Наблюдался у больных профессора Трапезникова эффект приживаемости или персистенции введенных клеток костного мозга, либо они подвергались немедленному отторжению и разрушению? Как указывалось выше, вероятность приживаемости трансплантата представляется достаточно низкой, учитывая отсутствие индуцированного препаратами подавления иммунитета до или после инфузии и ТПХ. Однако нельзя исключить возможность транзитной персистенции введенных клеток перед отторжением.

Следующий вопрос: «Может ли быть так, что проф. Трапезников проводил некоторую форму клеточной иммунотерапии, такую как введение аллогенных Т-клеток или естественных киллеров (NK)?». Не имеется сообщений об успешном применении в большинстве случаев немодифицированных аллогенных Т-клеток от доноров с совпадением по HLA, гаплотипу HLA или неродственных доноров у больных солидными опухолями. Тем не менее, нам известно, что солидные опухоли могут расти и метастазировать у больных раком, получающих иммуносупрессивную терапию, например, после пересадки почки.¹² В 2011 г. Розенберг с соавт. опубликовали сообщение о регрессии опухолей у больных метастатической синовиальной саркомой после адоптивной иммунотерапии CD8-положительными Т-клетками, генетически модифицированными таким образом, чтобы распознавать антиген NY-ESO-1.¹³ Однако, клетки костного мозга в работах проф. Трапезникова были аллогенными и не генетически модифицированными.

Может быть проф. Трапезников использовал НК-клетки, подавляющие развитие метастазов в легкие? Имеются сообщения об эффективности терапии НК-клетками при остром миелоидном лейкозе (см. 14–16), в том числе с использованием клеток, полученных от сходных по гаплотипу HLA родственников, как это было в наблюдениях проф. Трапезникова. Контролируемые исследования этого подхода не проводились при солидных опухолях и, конечно, при саркоме. В сообщении команды Трапезникова высказывалось предположение, что метастазы в легкие чаще развивались у больных с низкими уровнями активности НК-клеток до инфузии клеток костного мозга и хирургического вмешательства. Авторы также предложили другой возможный механизм наблюдаемого подавления метастазов в легкие: связывание введенных клеток костного мозга с клетками саркомы в легких и последующая опосредованная хозяином аллогенная реакция (отторжение), при этом микрометастазы саркомы погибали как «невинные зеваки». Действительно креативное мышление! В конце статьи авторы корректно указали: «*Механизм антиметастатической активности нормальных аллогенных клеток костного мозга может быть предложен только очень приблизительно*». Как правильно!

Интересно отметить, что многие исследования иммунотерапии солидных опухолей проводились онкохирургами, а не терапевтами-онкологами или иммунологами. Приходят на память имена профессоров Коули, Трапезникова, Дональда Мортон и Стивена Розенберга. Почему? Может быть онкохирурги умнее, более креативны, более агрессивны, скорее идут на риск или, как сказали бы большинство клинических онкологов, *менее дисциплинированы* (или обладают некоторыми или всеми из перечисленных качеств)? По этому минному полю я предпочел бы не ходить.

В завершение, проф. Трапезников и его коллеги возможно стали пионерами иммунотерапии сарком, однако, эффективность этого подхода нельзя доказать без рандомизированных исследований и без данных о *механизме действия*, если они будут получены. Конечно, его подход был новаторским и основывался на любопытных доклинических данных. Требуется, чтобы кто-нибудь повторил его клиническое исследование с контрольной когортой и анализом суррогатных факторов иммунитета. В настоящее время исследования иммунотерапии сарком проводятся по 7 направлениям: (1) адоптивная клеточная терапия; (2) терапевтические вакцины; (3) ингибиторы контрольных точек; (4) модуляторы иммунитета; (5) онколитические вирусы; (6) адъювантная иммунотерапия; (7) моноклональные антитела. На сайте clinicaltrials.gov зарегистрировано более 50 клинических исследований и несколько недавних отчетов.^{17,18} Будут ли какие-либо из этих вмешательств эффективными? Время покажет (надеемся).

ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОПОЭЗА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

А.Д. Палладина¹, Чэн-Цзяо², П.А. Зейналова¹, Е.В. Тимонина¹, С.О. Подвязников², Н.А. Фалалева¹, А.М. Мудунов¹, М.А. Френкель¹, Н.Н. Тупицын.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) 115478, г. Москва, Каширское шоссе 24

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

РЕЗЮМЕ

При анализе аспиратов костного мозга у больных злокачественными опухолями гемопоэтической и негемопоэтической природы были отмечены сходные изменения соотношения количественного состава компонентов эритроидного ростка в костном мозге. Данные изменения выявляются морфологически и подтверждены методом проточной цитометрии у большинства обследованных нами пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи, фолликулярной лимфомой, диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Обнаруженное изменение эритроидного ростка — резкое увеличение процента оксифильных нормобластов — достоверно взаимосвязано с показателями периферической крови, а также с прогнозом заболеваний. В данной статье освещены основные из выявленных закономерностей изменений эритроидного ростка костного мозга и рассмотрены возможные механизмы их возникновения.

Ключевые слова: эритропоэз, эритробластограмма, диффузная В-крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, оксифильные нормобласты, CD36, CD71, CD105.

ERYTHROPOIESIS IN CANCER PATIENTS

*A. Palladina¹, C. Jiao², P. Zeinalova¹, E. Timonina¹, S. Podviaznikov²,
N. Falaleeva¹, A. Mudunov¹, M. Frenkel¹, N. Tupitsyn¹*

¹Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation 24, Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University) 119991, Moscow, st. Trubetskaya, 8, b. 2

ABSTRACT

When analyzing bone marrow aspirates in patients with hematopoietic and non-hematopoietic malignant tumors, similar changes in the ratio of the quantitative composition of erythroid lineage components in the bone marrow were noted. These changes are detected morphologically and confirmed by flow cytometry in the majority of the examined patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma. The detected change in the erythroid lineage — an increase in oxyphilic normoblasts percentage — was significantly correlated with the erythroid parameters of peripheral blood. This article highlights the main regularities of changes in erythroid lineage of the bone marrow and discusses possible mechanisms for their occurrence.

Keywords: erythropoiesis, erythroblastogram, diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma, head and neck squamous cell carcinoma, oxyphilic normoblasts, CD36, CD71, CD105.

1. ВВЕДЕНИЕ

Совокупность всех эритроидных клеток в организме обозначается термином «эритрон»: это понятие введено в 1936 г. У. Каслом. Эритрон включает в себя следующие клеточные типы: ядросодержащие эритроидные костномозговые формы: проэритробласты, базофильные, полихроматофильные, оксифильные нормобласты, ретикулоциты костного мозга, ретикулоциты крови, эритроциты.

Костный мозг содержит 6% клеток эритрона, в то время как в крови находятся остальные 94%. Эритроидный костный мозг взрослого человека поддерживает на постоянном уровне популяцию в 25×10^{12} циркулирующих эритроцитов, в день 1,25% этого количества ежедневно удаляется из крови системой макрофагов, ежедневная продукция эритроцитов составляет в норме 3×10^9 /кг массы тела. Резервы нормального эритрона огромны, что объясняет способность к повышению скорости продукции эритроцитов в 10–12 раз при кровопотере, гемолизе и некоторых иных состояниях.

Нормальный эритропоэз начинается с плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки, общей с миелоидной и мегакариоцитарной линиями дифференцировки. Следующим звеном является эритроидный коммитированный предшественник, который затем дифференцируется в проэритробласт. Проэритробласт — самая ранняя из клеток эритрона, которая может быть распознана морфологически световой микроскопией в мазке костного мозга. Из одного проэритробласта путем последовательной трансформации образуются от 8 до 16 эритроцитов. Проэритробласт при делении превращается в два базофильных эритробласта; из них образуются полихроматофильные эритробласты, в которых отчетливо накапливается гемоглобин. Полихроматофильные эритробласты подвергаются последнему делению и превращаются в неделящиеся полихроматофильные нормобласты диаметром 8–12 мкм, созревающие в оксифильные (ортохромные) нормобласты — самые зрелые ядросодержащие клетки эритрона. Следующей стадией созревания является ретикулоцит, клетка, лишенная ядра, но продолжающая синтезировать гемоглобин благодаря остаточным органеллам. Ретикулоциты находятся в костном мозге около 2 суток, затем поступают в циркулирующую кровь, созревая в эритроциты. Полихроматофильные эритробласты могут без деления созревать до оксифильных нормобластов и больших ретикулоцитов, которые затем поступают в кровь. Этот путь развития, характерный для эритропоэтических стрессов (кровопотеря, гемолиз), по времени экономит около 70 часов (за счет уменьшения на 50% числа эритроцитов, образующихся при нормальном пути развития и 3–5-клеточных генерациях). С другой стороны, часть клеток может погибать на стадиях базофильного или полихроматофильного эритробласта, что называется неэффективным эритропоэзом. Величина неэффективного эритропоэза повышается у лиц, длительное время находившихся на больших высотах (у горцев, альпинистов). В этой ситуации неэффективный эритропоэз служит фактором регуляции эритроцитарного гомеостаза. В костном мозге здоровых людей неэффективный эритропоэз составляет от 5 до 20%, а при некоторых анемиях он увеличивается более чем на 50%.

Индекс созревания нормобластов вычисляется следующим образом:

Индекс созревания нормобластов = (Полихроматофильные + оксифильные нормобласты) / (все ядродержащие клетки красного ростка костного мозга). В норме он составляет 0,8–0,9.

При анализе состояния эритропоэза производится оценка так называемой парциальной эритроблостограммы. Характерным параметром эритропоэза является соотношение отдельных видов эритрокариоцитов: базофильных (эритробласты + базофильные нормобласты), полихроматофильных и оксифильных форм эритрокариоцитов. Для нормального эритропоэза характерно преобладание полихроматофильных нормобластов. Относительное содержание базофильных форм составляет примерно менее половины полихроматофильных, а доля оксифильных должна быть меньше полихроматофильных, но больше базофильных форм. При гемолитической или острой постгеморрагической анемиях пик кривой приходится на оксифильные нормобласты, а при железодефицитной и начальной стадии апластической анемии — на базофильные формы. Степень преобладания базофильных форм при железодефицитной анемии может отражать уровень дефицита железа. [1]

Появление в организме злокачественной опухоли сопровождается не только местными изменениями, связанными с перестройкой архитектоники того или иного органа, но и с системными изменениями работы организма. В частности, мы наблюдали, как злокачественный процесс индуцирует изменения гомеостаза костномозгового кроветворения.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены: 41 больной плоскоклеточным раком головы и шеи (ПРГШ): первичные пациенты II–IV стадий заболевания. У всех больных диагноз был гистологически верифицирован, стадирование опухоли выполнялось по TNM классификации 6-го пересмотра. Среди пациентов были преимущественно мужчины — 38 (92,6%), женщин — 3 (7,3%). Возраст больных варьировал от 33 до 75 лет (медиана 54,4 года). Наибольшую группу составили пациенты старше 50 лет — 29 человек (70,7%). Отдаленных метастатических изменений у больных, включенных в исследование, выявлено не было. [4]

Вторую группу исследуемых больных составили 118 больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ). Исследование проведено у 65 мужчин (55,1 %) и 53 женщин (44,9 %) в возрасте от 15 до 86 лет (медиана — 57,5 лет). Всем больным диагноз диффузной В-крупноклеточной лимфомы был установлен иммуноморфологическим методом в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной

Организации Здравоохранения [Swerdlow S.H et al., 2008] в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. В исследование включены больные неспецифицированной диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ), больные со специфическими вариантами ДВКЛ (лимфомы ЦНС, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома и другие) были исключены из анализа. [5]

Третью группу исследуемых составили 373 больных фолликулярной лимфомой (131 мужчина и 242 женщины) в возрасте от 23 до 99 лет (медиана 58 лет). Все пациенты находились под наблюдением, проходили обследование, получали лечение или рекомендации по его проведению в отделении химиотерапии гемобластозов и/или в научно-консультативном отделении амбулаторных методов диагностики и лечения НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Иммуноморфологическая диагностика фолликулярной лимфомы производилась по результатам гистологического и иммунологического — для установления варианта неходжкинской лимфомы — исследований опухолевой ткани в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008 года [Swerdlow S.H et al., 2008]. Для анализа клинического значения состояния костномозгового кроветворения при фолликулярной лимфоме были отобраны 263 миелограммы. [6].

Всем больным после проведения общеклинического обследования было проведено морфологическое исследование аспирата костного мозга; исследовались от 2 (ФЛ, ДВКЛ) до 6 (ПРГШ) мазков пунктата. Мазки фиксировались с помощью красителей методом Май—Грюнвальда и окрашивались по Романовскому—Гимзе и оценивались по следующим параметрам:

- поиск метастатических клеток в 6 препаратах костного мозга — для пациентов с ПРГШ
- подсчет и описание миелограммы — для всех пациентов.

Ни в одном случае метастатические клетки плоскоклеточного рака не были обнаружены в костном мозге больных. Следующим этапом выполнялась молекулярная диагностика 41 аспирата костного мозга больных ПРГШ методом RT-PCR с целью выявления микрометастазов или единичных диссеминированных опухолевых клеток.

В качестве норм показателей аспиратов костного мозга использовались стандартно используемые для эритроидного ростка показатели миелограммы: базофильные нормобласты — 1,4–4,6%; нормобласты полихроматофильные — 8,9–16,9%; нормобласты оксифильные — 0,8–5,6%; сумма клеток эритроидного ряда — 14,5–26,5% [2]. Нормы показателя концентрации гемоглобина в эритроците в граммах на децилитр (МСНС) — 32–36 г/дл. [3] Миелограммы, свидетельствующие о значительном разбавлении костного мозга периферической кровью, не включались в анализ.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программы SPSS 16.0 for Windows 2012. Построение кривых выживаемости осуществлялось по методу Каплана—Мейера (1958). Критический уровень статистической значимости для всех случаев принимался критерий $p = 0,05$, т.е. с вероятностью 5% и менее корреляция являлась случайной, что является основанием для вывода о статистической достоверности полученных данных.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе миелограмм пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи ($n = 41$) было выявлено снижение базофильных и полихроматофильных нормобластов с одновременным повышением содержания оксифильных форм в среднем в три раза по сравнению со средней нормой оксифильных нормобластов ($p = 0,05$), что привело к увеличению индекса созревания эритроидных клеток. При этом клеточность эритроидного ряда оставалась нормальной. Такие изменения наблюдались с большей частотой при опухолях, соответствующих Т4, до $11,5 \pm 1,5\%$ против $6,4 \pm 0,09\%$ при опухолях Т3 ($p = 0,009$) и $7,8 \pm 0,9\%$ при Т2 ($p = 0,037$). Следует отметить, что данный феномен оказался тесно связанным с наличием микрометастазов рака в костном мозге (определение с помощью метода RT-PCR). Характерным и достоверным явилось снижение относительного количества полихроматофильных форм при обнаружении микрометастазов в 100% случаев, $p = 0,02$.

Обнаруженные изменения нашли отражение и в периферической крови больных; в случаях с возрастанием оксифильных нормобластов наблюдался более низкий уровень концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) — $34,2 \pm 0,2$ г/дл, $n = 28$; при отсутствии повышения оксифильных нормобластов — $35,2 \pm 0,3$ г/дл, $n = 13$ ($p = 0,015$). Других различий не выявлено.

У больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой ($n = 118$) изменения в эритроидном ряду дифференцировки характеризовались снижением уровней базофильных и полихроматофильных нормобластов у большинства больных, а также повышением процента оксифильных форм у 77,1% ($n = 91$) больных.

Сходные изменения характеризовали группу больных фолликулярной лимфомой. У большинства отмечалось снижение уровня базофильных и полихроматофильных нормобластов (70% и 54,4% соответственно, $n = 184$) и повышение уровня оксифильных нормобластов у 73,8% ($n = 194$), сниженный уровень оксифильных форм не отмечался ни в одном случае. Среднее содержание оксифильных нормобластов было повышено в три раза ($9,4 \pm 0,32\%$), а

среднее содержание базофильных форм снижено в три раза ($1,0 \pm 0,05\%$) по сравнению с нормальными средними уровнями оксифильных и базофильных нормобластов ($3,2\%$ и $3,0\%$ соответственно). Было также оценено влияние изменений эритроблостограммы на показатели периферической крови; отмечена прямая корреляция повышения уровня оксифильных форм с уровнем гемоглобина: $124,3 \pm 3,1$ в группе с нормальным уровнем оксифильных нормобластов ($n = 68$) и $132,9 \pm 1,3$ в группе с повышением оксифильных нормобластов ($n = 187$), $p = 0,02$. Отмечена прямая взаимосвязь между процентным содержанием оксифильных нормобластов и количеством эритроцитов периферической крови: $R = 0,125$, $p = 0,044$ ($n = 250$). Таким образом, повышение уровня оксифильных нормобластов оказалось ассоциировано с повышением суммарного содержания эритрокариоцитов в костном мозге и с более высоким уровнем гемоглобина крови при фолликулярной лимфоме. Процентное содержание клеток эритроидного ряда зависело от количества оксифильных нормобластов: при нормальном уровне эритроидный росток составил $9,3 \pm 0,5\%$ ($n = 68$), а при повышенном $22,8 \pm 0,6\%$ ($n = 194$), $p = 0,000$. Интересно отметить, что при фолликулярной лимфоме не было отмечено нарастания оксифильных нормобластов при поражении лимфомой костного мозга, напротив: при поражении костного мозга по данным гистологического исследования трепанобиоптата повышение процента оксифильных нормобластов составило 67% , а при отсутствии поражения — $78,5\%$, $p = 0,043$. Аналогичная зависимость отмечена и для цитологического метода: $74,7\%$ в случаях без поражения костного мозга и $43,4\%$ в случаях с поражением ($p = 0,000$). Объяснением феномену изменения соотношения эритроидных предшественников может стать существование определенного влияния клеток фолликулярной лимфомы на костный мозг, индуцирующее ускорение созревания эритрокариоцитов у больных без поражения костного мозга.

Учитывая важное патогенетическое и прогностическое значение феномена изменения характера эритроблостограммы, была предпринята попытка иммунологической идентификации оксифильных нормобластов как наиболее зрелой фракции эритрокариоцитов.

Это исследование было проведено на основе 8-цветной панели антител, предложенной консорциумом Еврофлоу. В панели впервые отсутствовал GlyA, который был заменен на CD36, который появляется раньше, чем GlyA и отсутствует на эритроцитах; также включены CD105 и CD71 ввиду их важной динамики по мере дифференцировки эритрокариоцитов. На рисунке 1 показано отсутствие экспрессии CD36 на эритроцитах (гликофорин А позитивны).

На рисунке 2 показано взаимоотношение между CD36 и CD45. Практически все CD36+ клетки с низкими характеристиками SSC являются CD45 — негативными. Коэффициент корреляции R между CD36 + SSClow и

CD36 + SSClow CD45 — очень высок ($R = 0,993$; $p = 0,000$; $n = 16$), то есть на практике использование CD45 не является обязательным.

В гейте CD36 — позитивных клеток с низкими SSC четко видны 2 уровня экспрессии CD71, более низкий из которых соответствует и более низкой экспрессии CD105 (рис. 3а). Взятие этих клеток в гейт (рис. 3б, в) и размещение в осях CD71/CD36 свидетельствует о более низкой экспрессии CD36 на этих клетках (рис. 3г). Итоговый гейт соответствует эритрокариоцитам с более низкими уровнями CD71, CD105, CD36, то есть по иммунофенотипическим критериям наиболее близок оксифильным нормобластам. [7]

Таким образом, в нашей работе двумя методами — морфологическим и иммунологическим — было показано, что общим признаком, характеризовавшим костный мозг онкологических больных трёх изученных нозологических единиц, являлось однотипное изменение эритроблостограмм: нарастание оксифильных эритрокариоцитов и снижение уровня их непосредственных предшественников — базофильных и полихроматофильных форм. Интересно обсудить возможную причину такого изменения эритропоза при опухолях. Опухоль можно рассматривать как «ловушку» кислорода; в таком случае можно было бы ожидать снижения парциального давления кислорода, что по-видимому повлекло бы продукцию эритропэтина и нарастание пропорции полихроматофильных форм, имеющих интенсивную экспрессию рецептора эритропэтина. В действительности уровень полихроматофилов, напротив, снижается. [8,9,10]

Можно рассмотреть и то, что опухоль является «ловушкой» железа. На некоторых опухолях показана выраженная экспрессия трансферринового рецептора. Однако при дефиците железа эритроблостограмма носит совсем иной характер и отличается нарастанием уровня ранних эритроидных предшественников, а не их зрелых форм. [1,11]

Вероятен и механизм разрушения эритроцитов, укорочение периода их жизни. В этом случае можно было бы ожидать некоторого увеличения селезёнки, т.к. разрушение эритроцитов, в основном, происходит в селезёнке и опосредуется макрофагами, имеющими скавенджер-рецептор. Однако, спленомегалии и гипербилирубинемии мы не наблюдали.

В 60-х годах прошлого века было отмечено, что нарастание оксифильных нормобластов характерно для костного мозга при алиментарном голодании. [17] Вполне возможно допустить системное влияние опухоли на организм, запускаящее определенные процессы катаболизма и провоцирующее потерю массы тела. Подобные проявления с потерей массы тела, повышенной потливостью, подъемами температуры являются нередкими при злокачественных лимфомах и носят название В-симптомов. Вполне возможно, что катаболические процессы затрагивают и эритроидный росток. Известно, что кахексия

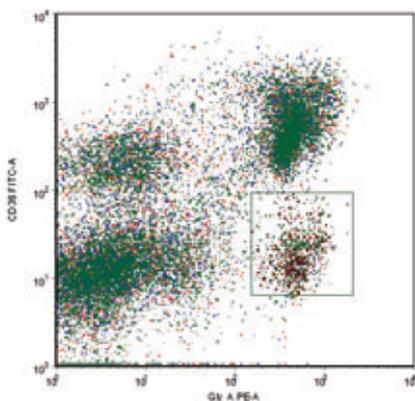
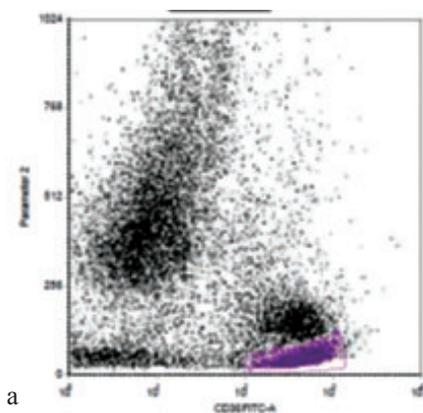
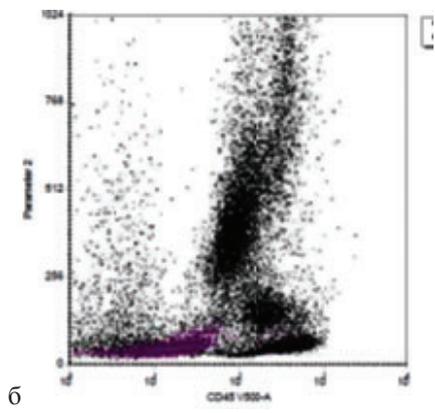


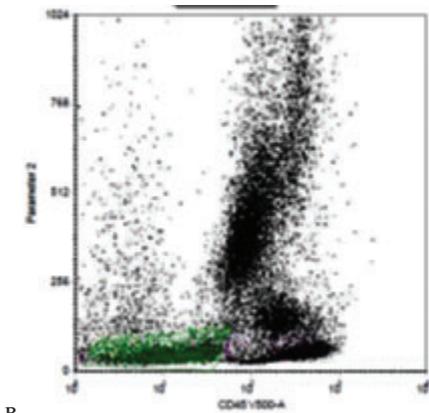
Рисунок 1. Взаимоотношение между уровнями экспрессии CD36 и гликофорина А на эритроидных клетках. Квадратом обведена группа клеток CD36 — гликофорин А+ (эритроциты).



а



б



в

Рисунок 2. а — Гейт CD36 — положительных клеток костного мозга; б — CD36 — положительные клетки не экспрессируют CD45; в — гейт CD45 — негативных клеток совпадает с CD36 — положительными клетками.

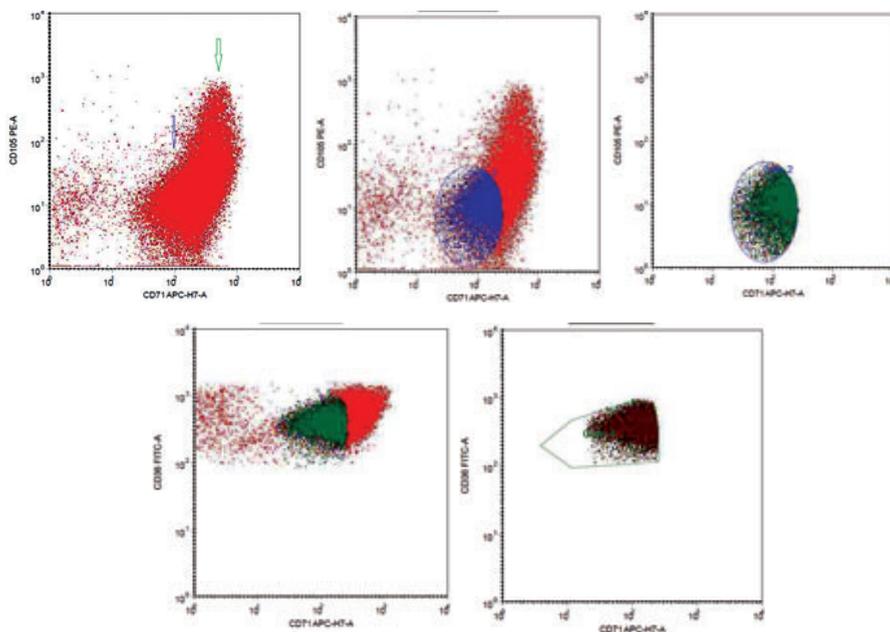


Рисунок 3. Последовательные этапы гейтирования при выделении популяции наиболее зрелых эритрокариоцитов (наиболее соответствуют оксифильным нормобластам). А — стрелками показаны различные уровни экспрессии CD71 на клетках в гейте CD36+ эритрокариоцитов SSCLow. Б — взятие в гейт клеток с более низкими уровнями CD71 и CD105 из числа CD36+SSCLow эритрокариоцитов. В — клетки в гейте, представленном на рис 3б. Г — те же клетки в координатах CD36–CD71, зеленым окрашены клетки с более слабой экспрессией CD36. Д — итоговый гейт клеток.

определяется как системный метаболический процесс, который характеризуется неуклонной потерей мышечной массы с ухудшением функционального состояния организма и который не поддается коррекции путем усиленного питания, а требует радикального устранения причины, запустившей данный процесс. Процессы, приводящие к кахексии, зачастую начинаются задолго до появления симптомов опухолевого заболевания, они обусловлены сложным взаимодействием цитокинов, в частности, TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ , характеризуются появлением маркеров острой фазы воспаления, снижением уровней альбумина, общего белка в крови, постепенным снижением аппетита (патогене-

нез анорексии при опухолях связывают со способностью перечисленных цитокинов преодолевать гематоэнцефалический барьер). [12,13,14,15,16] Такие изменения метаболизма наблюдаются как при ранних, так и при запущенных стадиях болезни.

Доказательство или опровержение патогенетических механизмов возрастания уровня оксифильных и снижения полихроматофильных нормобластов, а также дальнейшее изучение эритроблостограмм при других солидных и гематологических опухолях остается задачей для будущих исследований. По мнению авторов, указанные изменения эритропоэза могут являться отражением системного влияния опухоли на организм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е.Б. Владимирская «Нормальное кроветворение и его регуляция» Клиническая онкогематология. 2015; 8(2):109–19/ Elena B Vladimirska Normal Hematopoiesis and Its Regulation Clinical oncohematology. 2015;8(2):109–19
2. А.И. Воробьев (ред.). Руководство по гематологии. М., Ньюдиамед. 2007.–1275 с.
3. Ю.В Кузнецов, Е.С. Ковригина, Л.В. Байдун и др. Использование эритроцитарных индексов и показателей обмена железа в дифференциальной диагностике микроцитарных анемий. Гематология и трансфузиология 2000;45(6):46–8.
4. Е.Г. Тимонина, Н.Н. Тупицын, С.О. Подвизников, В.А. Спиридонова, М.А. Френкель, О.П. Колбацкая, О.А. Чегринец Результаты исследования характеристик костного мозга больных плоскоклеточным раком головы и шеи, их клиническое значение. Опухоли головы и шеи 1'2016 Том 6.
5. Н.Н. Тупицын, П.А. Зейналова, М.А Френкель, Е.А. Османов Е.А. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, №4, 2015: с.40–47.
6. Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова, Е.А. Османова, Н.В. Кокосадзе, Н.Н. Тупицын Особенности эритропоэза больных фолликулярной лимфомой. Вестник ФГБУ» РОНЦ им. Н.Н. Блохина», т. 27, № 3–2016.
7. Н.Н. Тупицын, Ч. Цзяо, П.А. Зейналова Иммунофенотипическое изучение дифференцировки эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Российский биотерапевтический журнал. 2018;17(4): 52–57.

8. *G.L. Semenza, G.L. Wang* A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec; 12(12): 5447–5454.
9. *O. Kujan, K. Shearston, C.S Farah* The role of hypoxia in oral cancer and potentially malignant disorders: a review. *J Oral Pathol Med.* 2017 Apr; 46(4):246–252.
10. *P. Vaupel, A. Mayer, M. Höckel* Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004; 381:335–54.
11. *T.R. Daniels, E. Bernabeu, J.A. Rodriguez, S. Patel, M. Kozman et al.* The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1820(3):291–317.
12. *T. Aoyagi, K.P. Terracina, A. Raza, H. Matsubara, K. Takabe.* Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol.* 2015 Apr 15; 7(4):17–29.
13. *O’Riordain MG1, J.S. Falconer, J. Maingay, K.C. Fearon, J.A. Ross.* Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism. *International Journal of Oncology.* 1999 Oct; 15(4):823–7
14. *R.J. Skipworth, G.D. Stewart, C.H. Dejong, T. Preston, K.C. Fearon.* Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction? *Clin Nutr.* 2007 Dec; 26(6):667–76.
15. *S.Y. Suh, Y.S. Choi, C.H. Yeom, S.M. Kwak, H.M. Yoon, D.G. Kim, S.J. Koh, J. Park, M.A. Lee, Y.J. Lee, A.R. Seo, H.Y. Ahn, E. Yim.* Interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts survival in patients with advanced cancer. *Support Care Cancer.* 2013 Nov; 21(11):3071–7.
16. *K. Fearon, J. Arends, V. Baracos.* Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013 Feb;10(2):90–9
17. Ю.Л. Шапиро Изменение эритроцитарного состава крови у людей при полном длительном алиментарном голодании (без ограничения воды) и последующем питании Бюллетень экспериментальной биологии и медицины том 55 №5 стр.40–44 1963г

СТВОЛОВЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ МЕЛАНОМЫ.

ИСТОРИЧЕСКИЙ ЭКСКУРС, ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ.

*И.Г. Маркина, Л.В. Демидов, О.А. Чернышева, И.Н. Михайлова,
Н.Н. Тупицын.*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр Российской им. Н.Н. Блохина» МЗРФ

Победить рак человечеству пока не удалось. Но это не повод не замечать успехи, достигнутые учёными и медиками, причём не только в диагностике и лечении онкологических заболеваний, но и, в самом главном, понимании их природы. С незапамятных времен выявление происхождения рака было предметом пристального интереса, поскольку только оно могло бы пролить свет на его полное излечение...

В последнее время появляется все больше доказательств того, что субпопуляции клеток, которые редко делятся и имеют отличную клеточную физиологию от остальной массы опухолевой популяции, названные стволовыми опухолевыми клетками (СОК), ответственны за долгосрочное поддержание роста опухоли при различных злокачественных новообразованиях [1]. Эта концептуальная основа имеет важные последствия не только для исследователей, стремящихся понять механизмы возникновения и прогрессирования опухоли, но также для разработки и оценки эффективных методов лечения. Хотя клиническая значимость СОК за пределами экспериментальных моделей в основном отсутствует, высокая частота прогрессирования и рецидивов после системной противоопухолевой терапии свидетельствует, что СОК выживают при стандартном лечении. Результаты многочисленных наблюдений, экспериментов, исследований и публикаций дают четкие прогнозы о том, что более эффективное таргетирование на СОК приведет к значительному улучшению результатов лечения пациентов. Тем не менее, концепции стволовых клеток и то, как они применимы к раку, существуют не одно десятилетие, но до сих пор имеются многочисленные препятствия на пути развития эффективных противоопухолевых методов лечения. Важно понять исторические основы области СОК, чтобы признать те проблемы, с которыми мы по-прежнему сталкиваемся. Осознав первопричину, у нас будет более четкое представление о сложной биологии опухоли и наших дальнейших действиях.

В природе эволюция создает биоразнообразие, а это в свою очередь делает всю экосистему устойчивой. Со времен великих экспериментальных пато-

логов (Рудольфа Вирхова, Александра Максимова и др.) было признано, что любая опухоль проявляет выраженную морфологическую неоднородность. Предположение о том, что рак может возникать из стволовых клеток, появилось еще в начале 19-го века [2, 3].

Первая научная концепция опухолевого роста была официально представлена в 1874–1875 годах учеником и ассистентом Вирхова Юлиусом Конгеймом [4] и итальянским хирургом Франческо Дуранте [5] в качестве теории эмбрионального покоя. По ее версии, злокачественная опухоль — результат своеобразной формы дисэмбриогенеза, то есть в организме сохраняются дистопированные неактивные клетки эмбрионального типа, которые под влиянием различных экзогенных и эндогенных факторов могут начать пролиферировать и, тем самым, дать основу злокачественной опухоли. Важным в этой теории является положение, что существует необходимость активизации протоонкогенов, как в эмбриогенезе, так и при развитии злокачественного новообразования, что хорошо встраивается в современную теорию опухолевого роста. Ценное наследие теории Конгейма-Дуранте — представление о том, что опухоль растет только «из себя», что впоследствии послужило основой формирования концепции о клональном происхождении злокачественных новообразований [6].

Тем не менее к началу 20-го века теория эмбрионального покоя была полностью дискредитирована, а гипотеза о том, что злокачественные опухоли возникают в результате дедифференцировки стала общепринятой. Как говорилось в книге Уильяма Симана Бейнбриджа, посвященной проблеме рака, [7] «врожденная или эмбриональная теория происхождения рака не получила поддержки ни в каких экспериментальных и сравнительных исследованиях последних времен».

В последующие десятилетия, учитывая остроту проблем, вызванных инфекционными заболеваниями, интерес к изучению рака был незначительным. Пройдет более 50 лет, прежде чем оригинальные исследования тератокарциномы приведут к переосмыслению теории эмбрионального покоя и переведут ее в форму теории стволовых опухолевых клеток. В серии экспериментов Барри Пирс и его коллеги отметили более высокую митотическую активность морфологически недифференцированных клеток в тератокарциномах и указали на то, что именно эти клетки являются потенциальными стволовыми клетками данной опухоли [8]. Эта точка зрения была дополнительно подтверждена открытием, что злокачественные клетки тератокарциномы могут спонтанно дифференцироваться в зрелые доброкачественные клетки [8]. Таким образом, опухоль может рассматриваться как иерархия, определяемая процессом дифференцировки так же, как это происходит при нормальном развитии тканей.

Современная эра исследований стволовых клеток началась в 1961 году с новаторских исследований Джеймса Тилла и Эрнеста Мак Каллоха, которые

перевели изучение СОК из количественной науки в доказательную дисциплину. Разработав клональный анализ репопуляции *in vivo*, ученые вводили смертельно облученным мышам костный мозг здоровых и через 7–10 дней обнаружили в селезенке облученных животных колонии, состоящие из развивающихся кроветворных клеток [9]. Полученные результаты свидетельствовали о существовании отдельных кроветворных клеток, обладающих потенциалом многолинейной дифференцировки и способных к самообновлению. Авторы назвали эти клетки стволовыми, а их метод клонального анализа станет основой для последующего изучения клоногенных предшественников гемобластозов и солидных опухолей.

Особое значение в ранней эпохе исследований СОК при злокачественных новообразованиях имело экспериментальное подтверждение опухолевой гетерогенности, показавшее что способность инициировать новую опухоль и поддерживать заболевание является непостоянной, причем далеко не каждая клетка обладает метастатическим потенциалом и может функционировать в качестве стволовой. Например, было продемонстрировано, что только 1–4% трансплантированных клеток мышинной лимфомы [10] и множественной миеломы [11] образовывали колонии в селезенке реципиентных животных. Аналогичным образом, неопластические клетки, полученные *in vitro* из исходной культуры клеток мышинной меланомы, сильно различались по их способности образовывать метастатические колонии в легких при введении сингенным мышам. Это указывает на то, что в родительских опухолевых клетках существует видовое разнообразие, позволяющее метастазировать только отдельным клонам [12].

Примечательно, что в это же время подобные эксперименты проводились и на людях. Честер Саутам и Александр Брюншвинг подкожно аутооттрансплантировали различные дозы суспензии опухолевых клеток диссеминированным пациентам. Это исследование показало, что реинициация опухоли была вариабельной и редкой, часто требующей более 1 миллиона злокачественных клеток [13].

В знаковой публикации 1988 года, которая содержала итоги исследования деления клеток и клеточной иерархии с помощью радиоактивных меток, Барри Пирс и Уэнделл Спирс показали, что дифференцированные клетки мышинной плоскоклеточной карциномы не способны индуцировать новые опухоли после трансплантации мышам-хозяевам [14]. Ученые предоставили однозначное доказательство клонального происхождения карциномы мыши из одних трансплантированных мультипотентных злокачественных клеток [14]. Эти результаты побудили Пирса и его коллег сформулировать более общий взгляд на рак как на «карикатуру» нормального развития, в которой «более злокачественные клетки не только генерируют рак, но и создают более доброкачественную по-

пуляцию опухолевых клеток, подобно стволовым клеткам нормальной ткани, производящим нормальные дифференцированные ткани».

Значительную роль в сбор доказательств в поддержку модели иерархии сыграли онкогематологические заболевания. Этому способствовала легкость, с которой циркулирующие опухолевые клетки могут быть получены при лейкозах по сравнению с солидными опухолями, и доступность технологии для экстракции, очистки и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Из исследований цитогенетической маркировки были получены четкие доказательства того, что большинство лейкозных бластов были постмитотическими и нуждались в пополнении из небольшой популяции высокопролиферативных клеток [15]. Ранее подобные исследования также свидетельствовали о существовании редкой лейкозной популяции с медленным потенциалом роста, которая демонстрировала устойчивость к антипролиферативной терапии и поэтому считалась источником рецидива. Поскольку сходная цитокинетика наблюдалась и для нормальных гемопоэтических стволовых клеток, было высказано предположение, что медленно циркулирующие лейкозные клетки ответственны за образование пролиферативной фракции, представляющей популяцию лейкозных «стволовых клеток» [16]. Эти исследования вместе с усилиями по выявлению клоногенных предшественников острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) [17–19], побудило ученых к размышлениям о лейкемии с точки зрения иерархической организации, как это было установлено для нормального крововетворения в то время.

В совокупности эти и многочисленные другие подобные клональные исследования, сосредоточенные на проверке существования СОК, предоставили много наблюдений о различных функциональных параметрах злокачественных клеток. Было установлено, что опухоли не представляют собой совокупность гомогенных клеток с равной способностью к пролиферации. Опухоль является отдельной сложной экосистемой, содержащей неопластические клетки с различным онкогенным потенциалом, а также инфильтрирующие, эндотелиальные, гемопоэтические, стромальные и другие типы клеток, которые функционируют вместе, чтобы поддерживать ее рост и жизнеспособность в целом.

Основной проблемой, с которой столкнулись исследователи в это время, была неспособность напрямую идентифицировать и анализировать СОК, что делало невозможным дать им детальную характеристику и, следовательно, использовать полученные знания для терапевтических подходов. В резких комментариях, сделанных, еще в 80-х годах прошлого века, говорилось, что антипролиферативные химиотерапевтические препараты не будут эффективно уничтожать эти субпопуляции опухолевых клеток и что дальнейший прогресс должен быть направлен на понимание их свойств [15]. Эти удивительно проницательные наблюдения сохраняют свою актуальность даже сегодня, почти 40 лет спустя.

Два важных технологических достижения положили начало современной эры исследования СОК. Разработка метода флюоресцентно-активируемой клеточной сортировки клеток (FACS) группой Леонарда Герценберга в Стэнфордском университете в 1972 году [20] в сочетании с технологией создания специфических моноклональных антител способствовала идентификации многих маркеров дифференцировки клеточной поверхности. А создание рациональных моделей ксенотрансплантации, обеспечивших ключевую способность функционально анализировать как нормальные стволовые клетки, так и их опухолевые аналоги [21], привело к долгожданному формальному доказательству концепции иерархии.

Первое убедительное доказательство наличия раковых стволовых клеток появилось в 1994 году. Канадская исследовательская группа из университета Торонто во главе с профессором Джоном Диком, используя сортировку потока клеток с применением маркеров клеточной поверхности CD34 и CD38, впервые сообщила, что небольшая субпопуляция клеток ОМЛ может создать опухоли при трансплантации мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) [22]. Онкогенная субпопуляция определялась наличием маркера клеточной поверхности CD34 и отсутствием антигена CD38. Посредством инъекции разного количества клеток подопытным животным и установления линейной корреляции с приживлением было рассчитано, что только 1 из 250000 клеток может инициировать лейкоэмический трансплантат [22].

Тремя годами позже анализ дополнительных образцов ОМЛ позволил установить, что эти относительно редкие опухолевые клетки были способны восстанавливать гетерогенный фенотип исходной опухоли при трансплантации облученным мышам более чувствительной иммунодефицитной модели (NOD/SCID) [23]. Ученые назвали эти клетки клетками, иницирующими опухоль, или СОК.

Первоначальные исследования ОМЛ заложили основу для последующих исследований СОК при солидных опухолях. Следует подчеркнуть, что доказательства существования СОК в солидных опухолях было получить гораздо сложнее по нескольким причинам. Клетки в солидных опухолях менее доступны, и функциональные анализы, подходящие для обнаружения и количественного определения нормальных стволовых клеток из многих органов, еще не были разработаны. Следовательно, маркеры клеточной поверхности, необходимые для выделения таких клеток, не были идентифицированы.

Одной из первых солидных опухолей, в которой было продемонстрировано присутствие СОК, является рак молочной железы. В 2003 году исследовательская группа из Мичиганского университета, возглавляемая Мухамедом Аль-Хадж, показала, что клеточные популяции, выделенные у восьми из девяти пациентов с раком молочной железы и характеризующиеся экспрессией

маркеров клеточной поверхности CD44 + CD24 low lin-, обладали способностью образовывать опухоли при серийной трансплантации иммунокомпрометированным мышам. Кроме того, в соответствии с моделью стволовых клеток полученные ксенотрансплантаты повторяли фенотипическую гетерогенность, напоминающими родительскую опухоль, из которой они были получены. Ученые также сообщили, что всего лишь 100 клеток с данным фенотипом были необходимы для образования опухолей, в то время как тысячи клеток с другим набором маркеров опухолей не вызывали [24].

Результаты данного исследования показали, что те же принципы СОК, которые ранее были продемонстрированы при ОМЛ, также могут быть переведены на солидную опухоль. Биология СОК, наконец, стала горячей темой, и начала привлекать внимание широкого круга исследователей.

После первоначальной публикации по раку молочной железы было опубликовано множество работ, идентифицирующих СОК при различных злокачественных новообразованиях, включая опухоли головного мозга [25], плоскоклеточный рак головы и шеи [26], рак поджелудочной железы [27], рак легкого [28], рак предстательной железы [29], колоректальный рак [30], саркому [31] и, наконец, меланому [32].

Результаты всех этих исследований показали, что злокачественные новообразования происходят из субпопуляции СОК, которые управляют развитием опухоли, ангиогенезом и метастазированием посредством модуляции определенных специфических путей, зависящим от типа ткани. СОК обладают физиологическими свойствами, сходными с нормальными стволовыми клетками, такими как способность к самообновлению, дифференцировке и неограниченной пролиферации, которые могут быть основной причиной прогрессирования опухоли и приводят к ухудшению клинического прогноза.

Значение термина «стволовая опухолевая клетка» менялось с течением времени и всегда находилось под влиянием соответствующих экспериментальных методов обнаружения. Согласно определению, данному на конференции *Американской ассоциации исследований рака* в 2006 году, ОСК — это отдельная популяция в пределах одной опухоли, которая может быть проспективно выделена из опухолевой массы и обладает способностью к самоподдержанию и дифференцировке в гетерогенные линии зрелых опухолевых клеток. [33].

Открытие СОК ставит вопрос об их происхождении. Понимание происхождения СОК может внести большой вклад в осознание их природы. В настоящее время предложены несколько возможных вариантов возникновения этих клеток.

Первая гипотеза утверждает, что СОК являются продуктом злокачественной трансформации тканеспецифичных стволовых клеток [34], которые, в результате приобретения дополнительных мутаций и эпигенетических анома-

лий, утратили способность самостоятельно регулировать клеточную пролиферацию [35].

Второй механизм происхождения ОСК заключается в том, что в присутствии злокачественного микроокружения некоторые дифференцированные опухолевые клетки могут приобретать свойства СОК в результате дедифференцировки с помощью эпителиально-мезенхимального перехода [36].

Существует и третье предположение, согласно которому приобретение функций самообновления и плюрипотентности, начиная с любого типа клеток, может быть достигнуто путем активации всего лишь четырех транскрипционных факторов (а именно, OCT3/4, Sox2, c-Myc и Klf4) [37]. Важно отметить, что этот процесс перепрограммирования требует временной репрессии p53 и INK4a, двух наиболее часто мутированных локусов опухолевого супрессора при раке человека [38].

Подтверждение происхождения СОК потребует дальнейших исследований, тем не менее, вероятность превращения любого клеточного источника в СОК является случайной, и, скорее всего, является динамическим процессом.

Выделение СОК при солидных опухолях является одним из самых значительных событий современной онкологии. В совокупности это ставит *биологию опухолей на новый фундамент — опухоль имеет иерархическую структуру, в основе которой находятся стволовые клетки.*

В результате идентификации стволовых клеток при злокачественных новообразованиях иерархическая парадигма развития опухоли, которая отличается от более традиционной стохастической модели, получила значительное признание. Согласно теории ОСК, субпопуляция опухолевых клеток, способных к самоподдержанию, ответственна за возникновение, прогрессирование и генерацию фенотипической гетерогенности опухоли. Таким образом, хотя стохастическая модель развития опухоли постулирует, что все опухолевые клетки теоретически способны к образованию опухоли и прогрессирующему росту посредством процесса случайных мутаций и клонального отбора [39], модель СОК предполагает, что ответственность за это несут только отдельные субпопуляции клеток [40], рисунок 1.

СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И ИЕРАРХИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Однако эти две модели не обязательно являются взаимоисключающими, и элементы стохастической модели могут играть роль в субпопуляции стволовых опухолевых клеток. [41, 42]. Так, например, при некоторых типах злокачественных новообразований невозможно отличить СОК от не-СОК, поскольку большинство клеток имеют признаки стволовости. Это происходит потому,

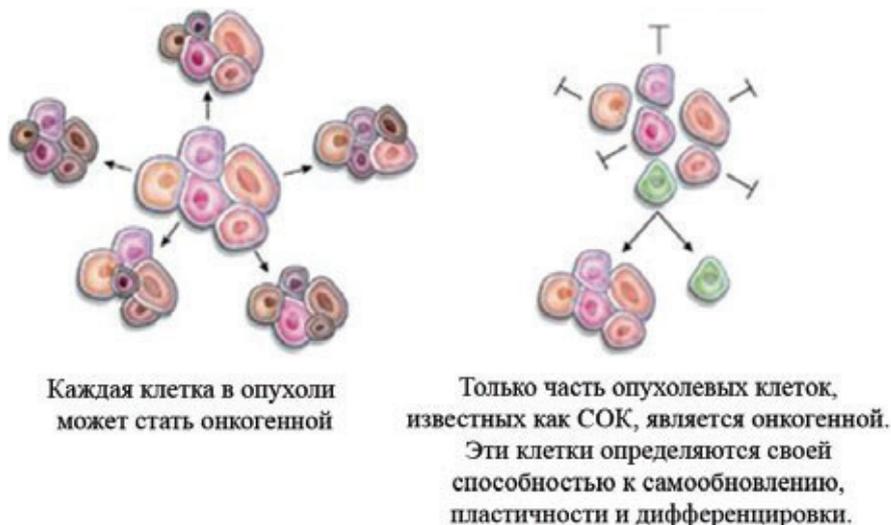


Рисунок 1. Модели канцерогенеза.

что генетически и фенотипически различные клоны СОК могут конкурировать друг с другом, что приводит к отбору СОК с высокой самообновляющейся активностью и одновременной потерей способности к дифференцировке. Такие опухоли кажутся гомогенными или же имеют очень мелкую иерархию (в частности при агрессивном течении опухолевого процесса или же на поздних стадиях), что создает ситуацию, аналогичную той, что предлагается стохастической моделью.

Кроме того, появляются некоторые доказательства того, что некоторые СОК солидных опухолей, являясь высоко адаптивными популяциями, проявляют пластичность — они могут временно приобретать свойства стволовой в зависимости от сигналов микроокружения, межклеточных взаимодействий в нише и иммунной системы [43, 44]. Это свидетельствует о том, что в любой момент времени в опухоли существует субпопуляция медленно циклических, самообновляющихся опухолевых клеток, которые могут непрерывно появляться или исчезать и, следовательно, являются ее «движущей силой» [45].

Таким образом, новые наблюдения, полученные в результате клинических и фундаментальных исследований, направлены на создание более всеобъемлющей модели СОК, чтобы лучше моделировать сложные и высокодинамичные процессы онкогенеза, рецидива опухоли и метастазирования. В насто-

ящее время многие загадки рака могут найти объяснение именно в рамках этой модели. Например, почему некоторые раковые клетки агрессивнее остальных? Почему некоторые клетки невосприимчивы ни к облучению, ни к противоопухолевой терапии? И в чем, наконец, заключается причина минимальной резидуальной болезни?

Резистентность к традиционным противоопухолевым методам лечения является характеристикой СОК, которая наиболее важна с клинической точки зрения. СОК имеют механизмы эндогенной устойчивости к лучевой и лекарственной терапии, что определяет их преимущество в выживаемости по сравнению с дифференцированными аналогами [46, 47]. Кроме того, СОК могут приводить к разнообразному составу клеток в опухолевой ткани, что способствует образованию фенотипически измененных субклонов, тем самым увеличивая шансы на выживание устойчивой фракции после терапевтического воздействия [48]. Таким образом, главная задача в этой области — определить надежные и специфические биомаркеры СОК для каждого типа опухоли.

Концепция СОК предполагает, что одним из основных параметров для оценки эффективности терапии является количественная оценка остаточных опухолевых клеток в рамках минимальной остаточной болезни, а не грубое измерение регрессии опухоли, как это обычно используется в клинической практике [49]. Вопрос о том, являются ли клетки с онкогенным потенциалом распространенными или редкими при различных злокачественных новообразованиях человека, имеет фундаментальное значение не только для теоретического понимания рака, так и для практической медицины.

Представление о том, что СОК должны быть редкими, основано на наших знаниях о физиологических стволовых клетках. Хотя верно и то, что при ряде злокачественных новообразованиях, таких, например, как определенные формы лейкозов [23], СОК действительно чрезвычайно редки, выявление более высокого количества СОК при других опухолях *ей vivo* не отрицает существования модели СОК [50, 51]. Исследование, опубликованное в 2007 году, показало, что более 10% лимфомных клеток мышиноного происхождения, трансплантированных гистосовместимым реципиентам, способны инициировать опухолевый рост [52].

Другой пример меланомы также иллюстрирует сложность определения частоты СОК. В первоначальном исследовании было установлено, что СОК составляют 0,0001% клеток меланомы человека [53]. Впоследствии эта же группа провела другой эксперимент, в котором было продемонстрировано, что частота клеток, инициирующих опухоль, зависит от экспериментальных условий ксенотрансплантата. При использовании мышей с более сильным иммунодефицитом (NOD/SCID с H2rg2/2), каждая четвертая клетка меланомы обладала онкогенными свойствами [54, 55].

Результаты другой исследовательской группы также показали, что СОК при меланоме III–IV стадии крайне многочисленны, составляя до 27% объема опухоли [56]. Более того, скрининг большого числа маркеров клеточной поверхности не смог отличить СОК от других опухолевых клеток [57]. В качестве объяснения этого феномена, ученые считают, что метастазы меланомы могут происходить из нескольких клонов СОК, демонстрирующих различные биомаркеры клеточной поверхности, каждый из которых обладает высокой злокачественностью. Более того, эти субпопуляции СОК могут иметь определенные отличия у различных пациентов, как это было описано для острого лимфобластного лейкоза [58]. Более того, количество СОК может прогрессивно увеличиваться во время развития опухоли, как недавно было продемонстрировано в исследованиях *in vivo* при раке молочной железы I–III стадии [59]. То есть, с концептуальной точки зрения, по мере роста новообразования происходит конкурирующий отбор наиболее агрессивных клонов СОК, которые сохранили небольшую способность дифференцировки или же не имеют ее вообще. В результате этого исходная иерархия, имеющаяся в опухоли, неуклонно уменьшается и уплощается, что и имеет место при диссеминированном процессе, состоящим преимущественно из гетерогенных клонов СОК.

Меланома, как и другие виды злокачественных новообразований, представляет собой гетерогенную опухоль, состоящую из множества субпопуляций с уникальными генотипическими и фенотипическими признаками.

Меланома, по-видимому, в значительно большей степени, чем многие другие солидные опухоли, является идеальным клинико-патологическим примером злокачественного развития, соответствующего модели СОК, где отдельные субпопуляции обеспечивают клеточную основу для сложной биологии заболевания, включая такие явления, как самообновление, дифференцировка, возникновение опухоли, прогрессирование и устойчивость к терапии.

Меланома уникальна тем, что обычно хорошо видна на поверхности тела. Несмотря на то, что визуальная локализация делает ее легко доступной для диагностики, а небольшой размер предполагает кажущийся благоприятный прогноз, меланома одна из самых коварных злокачественных новообразований, обладающая крайне высоким метастатическим потенциалом. На самом деле, некоторые первичные меланомы могут гематогенно диссеминировать и приводить к летальному исходу, даже когда объем опухоли находится в пределах кубического миллиметра.

На ранних этапах эволюции меланомы представляет собой поверхностно растущее новообразование, ограниченной эпидермисом и верхними слоями дермы (радиальная фаза роста), которое имеет небольшой онкогенный потенциал. Соответственно, подавляющее большинство «тонких» меланом на ранней стадии излечимы простым хирургическим иссечением. Однако, как

только онкогенный рост инвазивного компонента затрагивает глубокие слои дермы (вертикальная фаза роста) даже на микроскопическом уровне, характер ее биологического поведения резко меняется — меланома становится высокоагрессивной опухолью с быстро развивающейся устойчивостью к большинству доступных методов терапии. И если, наблюдаемая корреляция между толщиной опухоли и прогнозом хорошо охарактеризована, то взгляд на меланому с позиции концепции СОК только начинает развиваться.

В настоящее время доказано, что онкогенный компонент первичной меланомы проявляет поликлонизм [60] — особенность, часто характеризующаяся разнообразием архитектурных, цитологических и иммуногистохимических признаков в пределах одной опухоли. Эта гетерогенность согласуется с наличием иерархически упорядоченных субпопуляций опухолевых клеток, которые могут отличаться по своим возможностям формировать и управлять онкогенезом посредством самообновления, и участвовать в различных путях клеточной дифференцировки. Действительно, задолго до открытия и экспериментальной идентификации СОК меланомы, в 1999 году группа исследователей Онкологического центра Университета Айовы во главе с Мери Хендрикс установили, что агрессивные клетки меланомы могут стимулировать рост опухоли посредством васкулогенной мимикрии (способность формировать васкулярные каналы, окруженные базальной мембраной, в отсутствие эндотелиальных клеток в качестве альтернативного источника кровоснабжения опухоли) [61]. В то время как все функциональные последствия васкулогенной мимикрии еще предстоит выяснить, этот феномен явно связан с агрессивным поведением опухоли, высоким риском прогрессирования и, следовательно, плохим клиническим прогнозом [62]. Васкулогенная мимикрия является следствием пластичности дифференцировки в примитивных стволоподобных клетках меланомы [63], что позже было подтверждено с помощью маркеров СОК в клеточных линиях и опухолевых образцах [32, 53, 64–70]. Кроме того, молекулярный анализ показал, что эти агрессивные опухолевые клетки экспрессируют гены (в частности, *Nodal*, *Notch*, *Wnt*), характерные для поддержания полипотентного эмбрионального фенотипа [71]. Гетерогенность дифференцировки клеток меланомы в форме различной экспрессии эндотелиальных генов позволяет им дифференцироваться в различные клеточные фенотипы [72, 73].

Также первичная меланома — одна из самых высокоиммуногенных злокачественных новообразований человека. Два типа иммунных реакций вовлечены в первичную эволюцию меланомы, один направлен против более поверхностного компонента поражений и называется регрессией, а другой — против более глубокой инвазивной части, названный реакцией ТИЛ (инфильтрация опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами). В совокупности, данные иммунные реакции являются либо свидетельством элиминации опухолевых

клеток или же признаком торможения роста опухоли. Но, как правило, они крайне редко являются полными, и часть опухоли обычно сохраняется в виде клеток, которые нечувствительны к иммунному ответу организма. Этот клинический феномен предполагает возможность того, что субпопуляции вирулентных клеток меланомы могут избирательно экспрессировать молекулы, которые защищают их от цитотоксических Т-лимфоцитов, или, в качестве альтернативы, не способны экспрессировать антигены, ассоциированные с меланомой. Соответственно, недавние данные о том, что опухолевые клетки меланомы, выражающие стволовклеточные маркеры, также демонстрируют наличие костимулирующих молекул, способные разрушать иммунные реакции организма [55, 74], в настоящее время особенно важны для меланомы как информативной парадигмы поведения СОК.

Кроме того, метастатическая меланома — опухоль, обладающая резистентностью к традиционным видам системного противоопухолевого лечения. Известно, что при злокачественных новообразованиях этот признак является результатом устойчивости к препаратам, которые эффективно уничтожают основную опухолевую массу, но не действуют на популяции СОК. Это защитное свойство СОК может заключаться в экспрессии медиаторов химиорезистентности, осуществляющих выброс цитостатических препаратов из опухолевых клеток, что приводит к снижению концентрации лекарственных препаратов в клетке и, как следствие, к снижению эффективности лечения [75, 76]. Меланома оказалась энциклопедическим примером такой лекарственной устойчивости, поскольку как показано в исследованиях, она способна превращается из резистентного к доксорубину фенотипа в фенотип чувствительный при экспериментальной блокаде медиаторов химиорезистентности, что, как впоследствии было доказано, связано с онкогенными субпопуляциями [76].

И наконец, у многих пациентов с метастатической меланомой, получавших химио-, таргетную или иммуноонкологическую терапию, наблюдается смешанная реакция на лечение. В то время как некоторые метастатические очаги отвечают на проводимое лечение (вплоть до полной регрессии), другие очаги поражения у того же пациента продолжают прогрессировать или, в некоторых случаях, развиваются новые метастазы, что указывает на появление устойчивых лекарственных клонов в результате отбора субпопуляций СОК, имеющих преимущества в отношении выживания.

Таким образом, даже на поверхности существует ряд признаков меланомы, которые показывают, что это может быть новообразование, в котором стволовые опухолевые клетки играют важную роль.

Первое экспериментальное доказательство существования СОК при меланоме появилось в 2005 году [32]. Сотрудники лаборатории Менхарда Херлина в Институте Вистар (Филадельфия) изучали клетки меланомы, выделенные из

метастазов пациентов, а также из клонированных клеточных линий, и обнаружили субпопуляцию клеток, обладающую способностью пролиферировать в виде неадгезивных сфер в процессе культивирования. Было обнаружено, что эти «сфероидообразующие» клетки меланомы характеризовались повышенной экспрессией маркера CD20, который обычно ассоциируется со зрелыми В-лимфоцитами. Клетки меланомы CD20+ были способны к самообновлению и дифференцировке по нескольким линиям, включая адипоциты, остеоциты и хондроциты, а также меланоциты. Именно эта популяция клеток меланомы формировала опухоли при введении иммунодефицитным мышам [32].

В дальнейших исследованиях было продемонстрировано, что клетки меланомы, устойчивые к химиотерапевтическим препаратам, таким как, например, цисплатин, демонстрируют более высокую экспрессию CD20 [77].

Показано, что, нацеливаясь на небольшое подмножество опухолевых клеток CD20+ с помощью инженерных Т-клеток с перенаправленной специфичностью к CD20 в мышинной модели ксенотрансплантата, можно достичь полного ингибирования роста опухоли. Причем, ингибирование роста было продолжительным — рецидива опухоли не наблюдалось более 36 недель [78].

Недавно были опубликованы данные о предварительных клинических результатах, связанных с таргетингом на мелкие меланомные клеточные субпопуляции. Целью исследования было отключение любых оставшихся CD20-позитивных клеток меланомы (например, в спящих микрометастазах) со свойствами потенциальных СОК у пациентов меланомой IV стадии после радикального иссечения отдаленных метастазов. Использование Ретуксимаба (анти-CD20 антитела) с адьювантной целью показало удивительные преимущества с точки зрения продолжительности безрецидивной выживаемости. Из девяти пациентов, получавших лечение, шесть были живы через 42 месяца после начала терапии, причем пять из них — без признаков прогрессирования заболевания. [79]. Пациенты в аналогичной стадии из группы исторического контроля показали выживаемость менее 1 года. Другая группа исследователей подтвердила регрессию метастатических поражений меланомы у пациента, получавшего анти-CD20 в неоадьювантном режиме [80].

В целом, приведенные выше исследования убедительно свидетельствуют о том, что субпопуляция меланомы CD20+ может быть основным движущим фактором прогрессирования опухоли, а устранение этого подмножества может привести к выживаемости без болезни.

Дополнительная поддержка существования стволовых клеток появилась 2 года спустя, когда поверхностный маркер CD133 был использован для выделения СОК из биопсийного материала больных меланомы [67].

CD133 — трансмембранный гликопротеин, также известный как проминин-1, обычно экспрессируется на недифференцированных клетках, включая

эндотелиальные клетки-предшественники, гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки плода и эпителиальные клетки простаты [81]. Хотя точная функция CD133 остается неизвестной, предполагается, что он действует в качестве организатора топологии клеточной мембраны [82].

CD133 экспрессировали менее 1% клеток меланомы, и именно они демонстрировали повышенный онкогенный потенциал и инициировали опухоль при ксенотрансплантации мышам NOD/SCID [67]. При длительном культивировании CD133-позитивные клетки меланомы обладали способностью дифференцироваться в мезенхимальные и нейрональные клеточные линии, а также образовывали сфероиды *in vitro* и экспрессировали ангиогенные и лимфоангиогенные маркеры, которые, как считается, способствуют вирулентности [67].

Положительная корреляция между экспрессией CD133 и прогрессированием меланомы была впоследствии обнаружена при иммуногистохимическом окрашивании тканевых микроочипов [66]. CD133+ лекарственно-резистентные опухолевые субпопуляции демонстрировали повышенный уровень нестина — маркера нейроэпителиальных стволовых клеток, что было связано с дедифференцировкой и более агрессивным поведением заболевания [66, 83]. Кроме того, высокая коэкспрессия маркера CD133 с нестином, определяемая в циркулирующих опухолевых клетках меланомы, является показателем плохого прогноза [84]. Также эти клетки характеризовались низким уровнем пролиферативного маркера Ki-67, который может ассоциироваться с химиорезистентной способностью СОК [85].

И наконец, подавление экспрессии CD133 *in vitro* и *in vivo* с использованием коротких шпилечных РНК и моноклональных тел приводило к замедлению роста клеток меланомы и снижению способности к метастазированию [68], что дополнительно указывает на потенциальную роль этого биомаркера в прогрессии меланомы.

Маркер СОК меланомы ABCB5 был впервые описан группой ученых Центра генетики человека (Бостон) [76, 86] в качестве белка-транспортера различных веществ в нормальных клетках-предшественниках кожи и рассматривался как наиболее важный медиатор устойчивости к доксорубину в клеточных линиях меланомы. Используя профилирование экспрессии генов, авторы продемонстрировали, что экспрессия ABCB5 была выше в первичных меланомах по сравнению с доброкачественными невусами кожи, в «толстых меланомах» по сравнению с «тонкими» и в метастазах по сравнению с первичными поражениями, что коррелирует с клиническим прогрессированием меланомы. Ученые пришли к выводу, что ABCB5 следует считать маркером прогрессирования меланомы.

Основываясь на этих выводах, Тобиас Шаттон с коллегами [53] предположили, что ABCB5 может быть молекулярным маркером, определяющим СОК

меланомы. В серийных экспериментах по ксенотрансплантации от человека к мышши ABCB5-позитивные клетки меланомы обладали значительно большим онкогенным потенциалом по сравнению с ABCB5-негативными клетками, и восстанавливали исходный фенотип родительской опухоли [53]. Эта работа предположила, что в опухолях меланомы существовали два принципиально различных фенотипа клеток. Хотя относительные пропорции этих клеток вариабельные, только один тип клеток с экспрессией ABCB5, доля которого составляла от 1,6% до 20,4%, был способен к самообновлению и дифференцировке.

Если модель СОК меланомы и связанные с ней результаты, касающиеся ABCB5, являются достоверными, то можно было бы ожидать, что абляция этой субпопуляции будет ингибировать развитие опухоли. Системное введение моноклонального антитела, направленного на ABCB5, в ксенотрансплантаты мышшиной меланомы нарушало возникновение и рост новых опухолей и замедляло прогрессирование имеющихся за счет антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [53]. Таким образом, специфический таргетинг субпопуляции ингибировал рост опухоли, обеспечивая тем самым важные «доказательства принципа» с трансляционными терапевтическими последствиями.

В дополнение к вышесказанному, клетки меланомы, экспрессирующие ABCB5, обладают способностью значительно снижать экспрессию молекул HLA класса I, а в некоторых ABCB5+ СОК эти молекулы полностью отсутствуют [55]. Пониженная экспрессия HLA класса I была описана как один из основных механизмов, используемых опухолевыми клетками для ускользания от адаптивного противоопухолевого иммунитета [87]. Клинически, снижение экспрессии МНС класса I связано с прогрессированием меланомы, резистентностью к лечению и плохим клиническим прогнозом [88].

Более того, СОК меланомы, экспрессирующие ABCB5, могут противостоять иммуноопосредованному отторжению, индуцируя толерантность к специфическим Т-клеткам. Лиганд В7.2 и рецептор лиганда PD-1 могут служить в качестве негативных костимуляторных молекул суперсемейства CD28/B7, которые подавляют иммунные ответы, вызывая анергию Т-клеток и активируя регуляторные Т-клетки (Трег-клетки) [89, 90]. Как В7.2, так и PD-1 сверхэкспрессируются на ABCB5+ клетках меланомы в полученных ксенотрансплантатах и биопсийных образцах опухолей и способствуют более высокой онкогенности [55]. Существует мнение, что стволовые клетки меланомы могут избегать противоопухолевого иммунитета путем подавления опухолеспецифических Т-клеток отрицательными костимулирующими молекулами. Действительно, молекула В7.2, экспрессируемая ABCB5-позитивной опухолевой субпопуляцией, индуцирует CD4+CD25+FoxP3+Трег-клетки и регулирует их секрецию иммуносупрессивного цитокина IL-10 [55, 91].

Дополнительные доказательства того, что меланоме следует модели раковых стволовых клеток, появились после идентификации биомаркера CD271 — трансмембранного протеина, обнаруживаемого в ряде тканей, происходящих из нервного гребня человека.

В 2010 году группа ученых из Стенфордского университета продемонстрировала, что субпопуляции, характеризовавшиеся экспрессией CD271, полученные из опухолевой ткани пациентов с первичной или диссеминированной меланомой, являются более онкогенными и агрессивными, чем субпопуляции CD271 — при трансплантации иммунодефицитным мышам Rag2^{-/-}γс^{-/-} [64]. CD271-позитивные клетки меланомы значительно чаще образовывали опухоли по сравнению с их CD271-негативными аналогами (70% против 7%). Более того, опухоли, образованные CD271+ клетками, обладали способностью в дальнейшем продуцировать метастазы.

Многие из ассоциированных с меланомой антигенов, таких как MART1, MAGE и тирозиназа, были потеряны или имели пониженную экспрессию в CD271+ клетках [64]. Через подавление этих маркеров СОК меланомы могут избегать противоопухолевого иммунного ответа, направленного на опухолевые антигены, и, таким образом, достигать состояния иммунной привилегии посредством маскировки их антигенной идентичности.

Еще одним шагом было определение потенциальной клинической корреляции между экспрессией CD271 и прогрессированием меланомы. Швейцарские исследователи провели ретроспективный анализ опухолевых образцов 195 пациентов первичной и диссеминированной меланомы и обнаружили, что экспрессия CD271 коррелировала с более высоким метастатическим потенциалом и статистически достоверным ухудшением прогноза [65]. Авторы наблюдали, что CD271-позитивные субпопуляции клеток меланомы часто демонстрируют более высокую экспрессию транспортных белков ABCB5 и более низкую экспрессию антигенов, ассоциированных с меланомой, что указывает на то, что эти клетки, возможно, пережили специфическую противоопухолевую и иммуноонкологическую терапию.

В недавно опубликованном исследовании показано, что клетки меланомы, которые экспрессировали рецепторный активатор NF-κB (RANK), имели повышенную онкогенность по сравнению с RANK-негативными клетками меланомы у мышей IL-2R γ^{-/-} - NOD/SCID [92]. Клинические данные убедительно свидетельствуют о том, что RANK сильно активирован на клетках, инициирующих меланому, и экспрессия RANK выше в метастазах по сравнению с первичной опухолью [92]. Более того, результаты другого исследования продемонстрировали, что на поздних стадиях меланомы в кровообращении наблюдалось значительное увеличение числа циркулирующих опухолевых клеток с экспрессией RANK [93]. Эти данные

указывают на то, что RANK-позитивные СОК ответственны за образование отдаленных вторичных опухолей.

В нескольких сообщениях предполагается, что ALDH1 является потенциальным маркером СОК меланомы. ALDH1 (альдегиддегидрогеназа) — фермент, окисляющий альдегиды до карбоновых кислот, участвует в детоксикации ряда экзо-и эндогенных веществ, включая химиопрепараты. Редкая субпопуляция клеток меланомы, идентифицированная по высокой активности ALDH1, показала повышенную онкогенность и способность к самообновлению по сравнению с ALDH1-негативными клетками при последовательной трансплантации NOD/SCID и IL-2R γ - / - NOD/SCID мышам [94]. Генетическая абляция молекул ALDH1 с помощью специфической шпилечной РНК приводила не только к значительному снижению роста опухоли, но также демонстрировала существенное уменьшение метастатической нагрузки при меланоме [95]. В аналогичном исследовании было показано, что нокдаун ALDH1 шпилечной РНК повышает чувствительность клеток меланомы к химиотерапии [96]. Недавно было обнаружено, что процент клеток, коэкспрессирующих ALDH1 совместно с антигеном CD44+, был значительно выше в образцах первичной меланомы по сравнению с доброкачественными невусами, что предполагает возможного кандидата для целевой терапии меланомы с целью иррадикации СОК [96].

Существование популяции клеток, индуцирующих меланому, было дополнительно подтверждено недавними исследованиями гистоновых деметилаз (JARID1B), показавшими высокую информативность и одновременно подтверждающими сложность проблемы СОК при меланоме.

Было показано, что JARID1B маркирует медленно дифференцирующими клетки меланомы, которые необходимы для непрерывного роста опухоли, прогрессии и метастазирования, но не являются необходимыми для ее инициации [44]. Экспрессия JARID1B регулируется гипоксией, факторами роста и цитокинами, такими как IGF-1 или TNF- α [98, 99]. Эта субпопуляция не коррелирует с какими-либо генетическими признаками клеток меланомы, такими как статус мутаций BRAF, NRAS или PTEN.

Экспрессия JARID1B ограничивается небольшой субпопуляцией клеток меланомы, представляющих 1–5% всех клеток в опухолевых поражениях. Данные исследования продемонстрировали, что изолированные клетки меланомы, экспрессирующие JARID1B могут дать начало быстро пролиферирующему потомству, которое впоследствии становится снова гетерогенным (JARID1B+ и JARID1B–), как и родительские опухолевые клетки [44].

Кроме того, стабилизированный нокдаун JARID1B приводил к начальному ускорению роста опухоли с последующим истощением, как это и было определено в серийных экспериментах на иммунодефицитных мышах, что позволяет предположить, JARID1B играет существенную роль в непрерыв-

ном росте меланомы [44]. Примечательно, что группа американских ученых недавно сообщила, что JARID1A, близкий гомолог JARID1B, необходим для лекарственной устойчивости клеток немелкоклеточного рака легких [100], полагая, что медленно делящиеся клетки могут выживать при большинстве традиционных и целевых методах лечения.

На основании представленных данных, видно, что меланома является высоко гетерогенной опухолью — как с молекулярно-биологической, так и с фенотипической точки зрения. И независимо от того, имеется ли у меланомы статическая или динамическая, «крутая» или «плоская» иерархическая опухольная организация, существуют явные свидетельства того, что определенные клеточные фенотипы более важны, чем другие, для поддержания опухоли в целом.

Биологическая сложность и методологические трудности в идентификации СОК и их биомаркеров в настоящее время препятствуют прямому переводу экспериментальных данных в клиническую практику. Тем не менее знания об фенотипической гетерогенности и пластичности меланомы актуальны и полезны, например, для тестирования новых методов комбинированного лечения. И независимо от того, какой путь будет выбран для устранения клеточных субпопуляций стволовых опухолевых клеток меланомы, целью всегда должно быть сочетание этого подхода с полной элиминацией всей опухолевой массы. В противном случае, из-за высокого уровня пластичности клеток меланомы, всегда будет возникать угроза возникновения новых фенотипов, ведущая к возобновлению опухолевого роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dalerba P., Cho RW., Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007, 58, 267–284.
2. Recamier J.C.A. Recherches sur le Traitement du Cancer: par la Compression Methodique Simple ou Combinee, et sur l’Histoire General de la Meme Maladie. Paris: Gabon, 1829.
3. Remak R. Ein beitrage zur entwicklungsgeschichte der krebshaften geschwulste. *Deut Klin*. 1854, 6, 70–174.
4. Conheim J. Congenitales, quergestreiftes muskelsarkon der nieren. *Virchows Arch*. 1875, 65, 64.
5. Durante F. Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. *Arch Memorie e Osservazioni di Chirurgia Practica*. 1874, 11, 217–226.
6. Burnet M. The clonal selection theory of acquired Immunity. Cambridge, 1959.

7. Bainbridge W.S. New York: The Macmillan Co. The Cancer Problem., 1914.
8. Pierce G.M., Dixon F.J., Verney E. Teratocarcinogenic and tissue forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Lab Invest.* 1960, 9, 583–602.
9. Tilli J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961, 14, 213–222.
10. Bruce W.R., Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 1963, 199, 79–80.
11. Park C.H., Bergsagel D.E., McCulloch E.A. *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay.* *J Natl Cancer Inst* 1971, 46, 411–422.
12. Fidler I.J., Kripke M.L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science.* 1977, 197, 893–895.
13. Southam C, Brunschwig A, Dizon Q. Autologous and homologous transplantation of human cancer. In: Brennan M.J., Simpson WL, editors. *Biological Interactions in Normal and Neoplastic Growth: A Contribution to the Tumor-Host Problem.* Boston, MA: Little, Brown 1962, 723–738.
14. Pierce G.B., Speers W.C. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res* 1988, 48, 1996–2004.
15. Clarkson B.D. Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukemia *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1969, 30, 81–120.
16. Clarkson B.D., Baserga R. The survival value of the dormant state in neoplastic and normal populations. *Control of proliferation in animal cells*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1974, 945–972.
17. Buick R.N., Till J.E., McCulloch E.A. Colony assay for proliferative blast cells circulating in myeloblastic leukaemia. *Lancet*, 1977, 1, 862–863.
18. McCulloch E.A. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982) *Blood*, 1983, 62, 1–13.
19. Moore M.A., Williams N., Metcalf D. In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1973, 50, 603–623.
20. Bonner W.A., Hulett H.R., Sweet R.G. and Herzenberg L.A. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972, 43, 404–409.
21. Dick J.E. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol* 1996, 8, 197–206.
22. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994, 367, 645–648.
23. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.*, 1997, 3, 730–737.

24. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, 3983–3988.
25. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432, 396–401.
26. Prince M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A. et al. Identification of a sub-population of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 973–978.
27. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1, 313–323.
28. Eramo A., Lotti F., Sette G., et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.*, 2008, 15, 504–514.
29. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 2006, 25, 1696–1708.
30. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007, 445, 111–115.
31. Wu C., Wei Q., Utomo V., et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res.*, 2007, 67, 8216–8222.
32. Fang D., Nguyen T.K., Leishear K., et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005, 65, 9328–9337.
33. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells — perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006, 66, 9339–44.
34. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., et al. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature* 2001, 414, 105–111.
35. Smalley M., Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3(11), 832–844.
36. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008, 16, 133(4), 704–715.
37. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006, 126(4), 663–676.
38. Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 2009, 460, 1145–1148.
39. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976, 194, 23–28.

40. Ailles L.E., Weissman I.L. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007, 18, 460–466.
41. Chang H.H., Hemberg M., Barahona M., et al. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 2008, 453, 544–547.
42. Dirks P. Cancer stem cells: invitation to a second round. *Nature* 2010, 466, 40–41.
43. Cabrera M.C., Hollingsworth R.E., Hurt E.M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells*. 2015, 7(1), 27–36.
44. Roesch A., Fukunaga-Kalabis M., Schmidt E.C., et al. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. *Cell*. 2010, 141, 583–594.
45. Kreso A., Dick J.E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014, 14, 275–291.
46. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444, 756–760.
47. Jeon H.M., Sohn Y.W., Oh S.Y., et al. ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res*, 2011, 71, 410–421.
48. Brooks M.D., Burness M.L., Wicha M.S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*, 2015, 17, 260–271.
49. Blagosklonny M.V. Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia* 2006, 20, 385–391.
50. Gupta P.B., Chaffer C.L., Weinberg R.A. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 2009, 15, 1010–1012.
51. Kennedy J.A., Barabe F., Poepl A.G., et al. Comment on «Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells». *Science* 2007, 318, 1722.
52. Kelly P.N., Dakic A., Adams J.M., et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*. 2007, 317, 337.
53. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y., et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008, 451 (7176), 345–349.
54. Frank N.Y., Schatton T., Frank M.H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 2010, 120 (1), 41–50.
55. Schatton T., Schutte U., Frank N.Y., et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res*. 2010, 70 (2), 697–708.
56. Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S., et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 2008, 456, 593–598.

57. Quintana E., Shackleton M., Foster H.R., et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*, 2010, 18, 510–523.
58. Anderson K., Lutz C., van Delft F.W., et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011, 469, 356–361.
59. Pece S., Tosoni D., Confalonieri S., et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*, 2010, 140, 62–73.
60. Laga AC, Murphy GF. Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma. *Arch Pathol Lab Med.*, 2010, 134(12), 1750–1757.
61. Folberg R., Hendrix M.J.C., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000, 156, 361–381.
62. Seftor R.E., Seftor E.A., Koshikawa N., et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res*. 2001, 61 (17), 6322–6327.
63. Hendrix M.J., Seftor E.A., Hess A.R. and Seftor R.E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3(6), 411–421.
64. Boiko A.D., Razorenova O.V., van de Rijn M., et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 2010, 466 (7302), 133–137.
65. Civenni G., Walter A., Kobert N., et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res*. 2011, 71 (8), 3098–3109.
66. Klein W.M., Wu B.P., Zhao S., et al. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2007, 20 (1), 102–107.
67. Monzani E., Facchetti F., Galmozzi E., et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer*. 2007, 43 (5), 935–946.
68. Rappa G., Fodstad O., Lorico A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells*. 2008, 26 (12), 3008–3017.
69. Sharma B.K., Manglik V., Elias E.G. Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J Surg Res*. 2010, 163 (1), 11–15.
70. Vasquez-Moctezuma I., Meraz-Rios M.A., Villanueva-Lopez C.G., et al. ATP-binding cassette transporter ABCB5 gene is expressed with variability in malignant melanoma. *Actas Dermosifiliogr*. 2010, 101 (4), 341–348.

71. Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999, 155 (3), 739–752.
72. Seftor E.A., Meltzer P.S., Schatteman G.C., et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002, 44, 17–27.
73. Bittner M., Meltzer P., Chen Y., et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000, 406, 536–540.
74. Schatton T., Frank M.H. Antitumor immunity and cancer stem cells. *Ann N Y Acad Sci.*, 2009, 1176, 154–169.
75. Aleman C., Annereau J.P., Liang X.J., et al. P-glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential. *Cancer Res.*, 2003, 63 (12), 3084–3091.
76. Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y., et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.*, 2005, 65 (10), 4320–4333.
77. Somasundaram R., Villanueva J. and Herlyn M. Intratumoral Heterogeneity as a Therapy Resistance Mechanism: Role of Melanoma Subpopulations. *Adv Pharmacol.* 2012, 65, 335–359.
78. Schmidt P., Kopecky C., Hombach A., et al. Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108(6), 2474–2479.
79. Pinc A., Somasundaram R., Wagner C., et al. Targeting CD20 in Melanoma Patients at High Risk of Disease Recurrence. *Mol Ther.* 2012, 20(5), 1056–1062.
80. Schlaak M., Schmidt P., Bangard C., et al. Regression of metastatic melanoma in a patient by antibody targeting of cancer stem cells. *Oncotarget.* 2012, 3(1), 22–30
81. Neuzil J., Stantic M., Zobalova R., et al. Tumour-initiating cells vs. cancer «stem» cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, 355(4), 855–859.
82. Irollo E., Pirozzi G. “CD133: to be or not to be, is this the real question?”. *Am J Transl Res*, 2013, 5 (6), 563–581.
83. Grichnik J.M., Burch J.A., et al. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol.* 2006, 126(1), 142–153.
84. Fusi A., Reichelt U., Busse A., et al. Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2011, 131(2), 487–94.
85. Al Dhaybi R., Sartelet H., Powell J. and Kokta V. Expression of CD133+ cancer stem cells in childhood malignant melanoma and its correlation with metastasis. *Mod Pathol.* 2010, 23(3), 376–380.

86. Frank N.Y., Pendse S.S., Lapchak P.H., et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem.* 2003, 278, 47156–47165.
87. Aptsiauri N., Cabrera T., Mendez R., et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 601, 123–131.
88. Carretero R., Romero J.M., Ruiz-Cabello F., et al. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics*, 2008, 60, 439–447.
89. Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.*, 2005, 23, 515–548.
90. Rothstein D.M., Sayegh M.H. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev.*, 2003, 196, 85–108.
91. Roncarolo M.G., Gregori S., Battaglia M., et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*, 2006, 212, 28–50.
92. Kupas V., Weishaupt C., Siepmann D., et al. RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells. *J Invest Dermatol*, 2011, 131, 944–955.
93. Gray E.S., Reid A.L., Bowyer S., et al. Circulating melanoma cell subpopulations: their heterogeneity and differential responses to treatment. *J Invest Dermatol.* 2015, 135(8), 2040–2048.
94. Boonyaratankornkit J.B., Yue L., Strachan L.R., et al. Selection of tumorigenic melanoma cells using ALDH. *J Invest Dermatol*, 2010, 130, 2799–2808.
95. Yue L., Huang Z.M., Fong S., et al. Targeting ALDH1 to decrease tumorigenicity, growth and metastasis of human melanoma. *Melanoma Res.*, 2015, 25(2), 138–48.
96. Luo Y., Dallaglio K., Chen Y., et al. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells.*, 2012, 30 (10), 2100–2113.
97. Erfani E., Roudi R., Rakhshan A., et al. Comparative expression analysis of putative cancer stem cell markers CD44 and ALDH1A1 in various skin cancer subtypes. *Int J Biol Markers*, 2016, 31(1), 53–61.
98. Roesch A., Vultur A., Bogeski I., et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell*, 2013, 23, 811–825.
99. Ostyn P., El Machhour R., Begard S., et al. Transient TNF regulates the self-renewing capacity of stem-like label-retaining cells in sphere and skin equivalent models of melanoma. *Cell Commun Signal*, 2014, 12, 52–64.
100. Sharma S.V., Lee D.Y., Li B., et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 2010, 141(1), 69–80.

ГЕМАТОГЕННОЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ

Т.В. Горбунова

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им Н.Н.Блохина Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Признаки отдаленных метастазов при солидных опухолях у детей выявляются у 10–30 % пациентов во время первичной диагностики. Дополнительно у 15–20% детей гематогенное метастазирование развивается в различные сроки от начала лечения. Показатели общей и безрецидивной выживаемости среди пациентов с диссеминированными стадиями солидных опухолей, существенно ниже по сравнению с этими данными при локализованных стадиях. Общая 5-летняя выживаемость в зависимости от гистологического типа опухоли составляет 20–70%. При гематогенном метастазировании поражаются различные органы, но в большинстве случаев, метастазы обнаруживают в легких.

Саркомы наиболее распространенные злокачественные опухоли детского возраста. Заболеваемость остеосаркомой составляет 400 новых случаев в год. Отдаленные метастазы выявляются у 20% во время диагностики первичного процесса и еще у 22% в различные сроки от начала лечения. Поражение легких диагностируют в 85% случаев. Общая 5-летняя выживаемость детей с метастазами остеосаркомы в легкие значительно ниже (17–34%) по сравнению с теми, у кого установлены локализованные стадии (75%). Метастазы в кости, костный мозг коррелируют с низким ответом первичной опухоли на химиотерапию (Bassi G. et al., 1993, Ferguson W. et al., 2001). «Микрометастазы» в костном мозге при диссеминированной остеосаркомке составляют 93% (Bruland O. et al., 2005). Появление экстра-пульмональных метастазов при этой опухоли ассоциировано с развитием рецидива и неудовлетворительным прогнозом, а общая выживаемость у таких пациентов не превышает 10%.

Европейские исследования ММТ4-89 и ММ4-91 сообщают о развитии отдаленных метастазов в 10–20% случаев у детей с рабдомиосаркомой (РМС). Риск развития диссеминации опухоли у детей зависит от локализации первичной опухоли, деструкции костей или поражения косного мозга и возраста. К неблагоприятным факторам относится локализация опухоли в параменингеальном регионе, простате и мочевом пузыре. При локальной инвазии первичной опухоли также возрастает частота обнаружения метастазов в костном мозге до 23%. Повыше риск развития прогрессии опухоли у детей до 1 года или старше 10 лет. Общая 5-летняя выживаемость у детей до года составляет 47%. В тех случаях, когда выявляется два и более факторов ри-

ска этот показатель снижается до 9%. По данным анализа Children oncology group метастазы в легких обнаруживаются у 16% пациентов. Исследователи установили, что у пациентов с метастазами в легких при параинтраабдоминальной локализацией РМС, не альвеолярным вариантом опухоли и не пораженных лимфатических узлах прогноз более благоприятный по сравнению с теми, у кого обнаруживаются гематогенные метастазы в других анатомических зонах. Метастазирование в костный мозг диагностируется в 3,2% случаев [Kumar L., 1990, Swerts K., 2004, Madhumathi D.S., 2007, Bozzi F. 2008]. Сочетание метастазов в регионарных лимфоузлах и костном мозге обнаруживается у 18%, а в легких и костном мозге — у 41% пациентов (Weiss A., 2013). При наличии 2 или более факторов риска 3-летняя бессобытийная выживаемость не превышает 20% [Weigel I., Lyden E., Anderson J. et al. Intensive multiagent therapy, including dose compressed cycles of ifosfamide/etoposide and vincristine/doxorubicine/ cyclophosphamide, irinotecan, and radiation, in patients with high-risk rhabdomyosarcoma: a report from the Children's oncologist Group/ Journal of clinical oncology — 2016–34: 117–122].

Саркомы мягких тканей, имеющие иное гистологическое строение, чем рабдомиосаркома, представлены широким разнообразием морфологических вариантов. Эта группа сарком отличаются умеренной или низкой чувствительностью к химиолучевой терапии. Основной анатомический регион гематогенного метастазирования — легкие. Несмотря на проводимое интенсивное химиолучевое лечение у пациентов с саркомами мягких тканей, отличными от рабдомиосаркомы, имеющие гематогенные метастазы, 5-летняя общая выживаемость крайне низкая — 15% [Williams R., Fernandez-Pineda I., Gosan A. Pediatric sarcomas /Surg.Clin N. Am — 2016–96: 1107–1125].

При альвеолярной саркоме мягких тканей в 87,5% случаев поражаются легкие, причем общая 5-летняя выживаемость у этих пациентов ниже (64%) по сравнению с теми, у кого отсутствуют признаки диссеминации (95%). У 40% больных с синовиальной саркомой развиваются гематогенные метастазы. Синхронное выявление первичной опухоли и отдаленных метастазов у 16% и метасинхронное у 50% пациентов. В 80% случаев поражаются легкие [Andrassy A., Okcu M., Despa S., Ranney R. Synovial sarcoma in children: surgical lessons from a single institution and review of the literature/j. of American Col. of Surg. — 2001–192: 305–313. Spillane A., a'Hern R., Judson I., Fisher C., Thomas J. Synovial sarcoma: a clinicopathologic, staging, and prognostic assessment / J. of clinical oncology — 2000–18: 3794–3803]. По мнению Spillane A. et al., 2000, наблюдавшего 150 пациентов, общая 5-летняя выживаемость после обнаружения метастазов составила 6%.

Саркома Юнга относится к опухолям чувствительным к химиолучевой терапии. Однако, гематогенные метастазы обнаруживаются у 25% пациентов

при первичной диагностики, из них у 10% выявляется поражение легких. Несмотря на чувствительность опухоли к химиолучевому воздействию, общая 5-летняя выживаемость пациентов с метастазами в легких при отказе от проведения хирургического лечения — 0%, по сравнению с теми, кому выполнялась метастазэктомия — 80% [Paulussen M., Ahrens S., Craft A., et al. Ewing's tumors with primary lung metastases: survival analysis of 114 (European Intergroup) Cooperative Ewing's sarcoma studies patients/ *J. of clinical oncology* — 1998–16: 3044–3052]. Поражение костного мозга выявляется у 8,6% больных [Kumar L., 1990, Swerts K., 2004, Madhumathi D.S., 2007, Bozzi F. 2008]. Общая и безрецидивная выживаемость при метастазах в легкие — 40% и 29% vs легкие + кости/костный мозг — < 20% и 8%, $p = 0,0001$ (Cotterill S. et al., 2000; Apraci E. et al., 2013). Результаты лечения хуже при диффузном поражении костного мозга $p = 0,05$ (Koscielniak E. et al., 2002). Рецидивы при диссеминированной ОССЮ развиваются в первые 2 года после установления диагноза у 80% пациентов [Cotterill S. et al., 2000; Apraci E. et al., 2013, Koscielniak E. et al., 2002, Owens C., Abbott L., Gupta., 2013].

Признаки гематогенного метастазирования у детей с нейробластомой чаще выявляется в костном мозге — 70,5%, костях — 55,7%, печени — 29,6%, интракраниальное распространение и орбиты — 18,2% и ЦНС — 0,6% [DuBios S., Kalika Y., Lukens J., Brodeur G. Et al. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival/ *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* — 1999–21: 181–189]. Поражение легких выявляется у 3,3–3,6% пациентов. Риск развития поражения легких, печени, орбит и интракраниальное распространение выше при обнаружении амплификации гена N-MYC у детей до 1 года [DuBios S., London W., Zhang Y et al. Lung metastases in neuroblastoma at initial diagnosis: a report from International Neuroblastoma Risk group (INRG) project/ *Pediatric blood and cancer* — 2008; 51: 589–592]. При поражении костного мозга сохранение нейробластов после проведения индукционной химиотерапии у пациентов с низкодифференцированными вариантами составляет 47%, и при этом летальность достигает 60% [Bae G. et al., 2013]. Напротив, санация костного мозга и нормализация уровня катехоламинов улучшает прогноз заболевания [Boubaker A. et al., 2003]. По мнению Moss T. et al., 1991, диффузное поражение костного мозга — снижает 5-общую выживаемость, $p = 0,03$.

Признаки гематогенного метастазирования при гепатобластоме обнаруживаются у 24% детей. Метастатическое поражение легких у детей с гепатобластомой выявляется в 17% случаях. Уровень общей 5-летней выживаемости у этих детей составляет 20–50%. Маркером, указывающим на развитие рецидива гепатобластомы, является уровень АФП [Black C., Luck S., Musemeche C., Andrassy R. Aggressive excision of pulmonary metastases is warranted in

management of childhood hepatic tumor / J. of pediatric surgery — 1991; V. 26: 1082–1085].

Отдаленные метастазы при нефробластоме диагностируются у 15% пациентов. Из них метастазы в легких наблюдаются в 13% случаев. Основным методом лечения для этих пациентов является лучевая терапия. Общая 5-летняя выживаемость при этом остается высокой. Однако, Green D., 1989, 2013 и Lange J., 2014, сообщили о 15% риске развития второй опухоли (рак молочных желез) у женщин старше 40 лет, которым в детстве проводилось крупнопольное облучение легких.

Адренокартикальный рак почек относится к химиорезистентным опухолям. Отдаленные метастазы обнаруживаются у 21% пациентов, при этом поражение легких выявляется в 10% случаях. Анализ показателей выживаемости среди детей с этой опухолью, показал крайне низкий уровень 5-летней общей выживаемости среди детей с метастатическим поражением легких, всего 10% [Gulack B., Rialon K., Englum B. Et al. Factors associated with survival in pediatric adrenocortical carcinoma: an analysis of the National Cancer data base (NCDB)./J. of pediatric surgery — 2016–51: 172–177].

Ретинобластома частая опухоль глаз у детей. При сочетанном двустороннем поражении глаз возрастает частота метастазирования в костный мозг до 15%. Случаи поздней диагностики, у детей старше 3 лет, также ассоциированы с диссеминацией опухоли в костный мозг. Поражение зрительного нерва и выход опухоли за пределы глаза — повышают риск отдаленных метастазов в костном мозге до 18% [Karcioglu Z, et al. 1997, Bakhshi S. et al., 2011]. При стадировании по системе ТНМ поражение костного мозга выделено в отдельную категорию М1а. Показатель безрецидивной выживаемости при М1а составляет 45% vs 90% — при локализованных стадиях (J. Dunkel et al., 2000).

Рак щитовидной железы самая частая эпителиальная опухоль у детей. В целом прогноз при этой опухоли у детей благоприятный, за исключением тех, у которых верифицируется синдром МЭН2Б ассоциированный с медулярным раком щитовидной железы. Основной регион метастазирования — легкие. Метастазы в легкие были выявлены изначально у 4,7%, а в процессе динамического наблюдения еще у 28,1% больных (среди больных с метастазами в легкие — 44,4 % составили с монофокусными опухолями и 55,6 % — с многофокусными). Наиболее агрессивное клиническое течение присуще солидному и диффузно-склерозирующему варианту папиллярного рака. При чем, отдаленные метастазы выявляются в 3,5 раза чаще, чем при других вариантах рака щитовидной железы [Шишков Р.В. Совершенствование диагностики и лечения рака щитовидной железы у детей и подростков. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва — 2006г.].

Выраженная агрессивность течения рака носоглотки у детей проявляется признаками раннего регионарного двустороннего метастазирования. Нередко, первой жалобой пациентов становятся быстро увеличивающиеся лимфатические узлы шеи. (Choi J.,2014) Потенцией к метастазированию обладают около 90% недифференцированных раков, причем в 70–75% случаев вовлекаются регионарные шейные лимфатические узлы, а в 20–25% — имеется обширное сочетанное метастазирование с поражением регионарных лимфатических узлов, легких, печени, костей и мягких тканей (РЛС, Исмаил-Заде). Поражение лимфатических узлов шеи при раке носоглотки отрицательно влияет на показатели выживаемости. Риск развития отдаленных метастазов достоверно, $p \leq 0,001$, выше у пациентов с N1-стадией по сравнению с теми, у кого N0 — 10,8% vs 0,1% [Pan Xin-Bin]. Изучение корреляции между обнаружением ДНК ЭБВ в плазме крови до начала лечения и исходом заболевания показало, что обнаружение ДНК ВЭБ достоверно влияет на риск развития отдаленных и регионарных метастазов, $p = 0,00001$. Сохранение ДНК вируса в плазме крови после окончания лечения ассоциировано с высоким уровнем смертности в результате прогрессии опухоли, $p = 0,00001$. (Regaud C.)

ГУМОРАЛЬНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ

Н.Н. Тупицын

Зав. лабораторией иммунологии гемопоэза Централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

**ДОКЛАД Н.Н. ТУПИЦЫНА НА УЧЕНОМ СОВЕТЕ НИИ
КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ 11 МАРТА 2019Г. ПРЕДСЕДАТЕЛЬ —
ПРОФЕССОР С.А. ТЮЛЯНДИН**

1. Глубокоуважаемые Сергей Алексеевич и Иван Сократович, члены ученого совета и все присутствующие.

Иммунология рака будоражит умы онкологов и не только онкологов. Последние годы ознаменовались бурным внедрением целого ряда иммунологических методов диагностики и лечения рака, нобелевскими премиями, и всё это позволило существенно улучшить результаты лечения даже в ранее казалось бы безнадежных, запущенных случаях. Однако на вопрос, а какова же роль собственно иммунной системы организма в противораковой борьбе, ответа ещё не получено. Какими бы ни были показатели иммунного статуса, уровней иммуноглобулинов и так далее, оставить человека наедине с раком представляется кошмарным — он обязательно погибнет.

А может быть прав Михаил Иванович Давыдов, сказавший «Единой пропустив рак, организм уже никогда его не догонит»?

Какова же роль иммунной системы организма в противораковой защите?

Гуморальный противоопухолевый иммунитет

Н.Н. Тупицын

2. Цель данного доклада попытаться в какой-то степени, так как представляет себе автор, ответить на этот вопрос. Не претендуя на полноту изложения предмета, остановиться на тех механизмах иммунной противораковой защиты, которые неоспоримы.

Речь пойдет о гуморальном противоопухолевом иммунитете, то есть об иммунитете, обусловленном антителами, а не Т-клетками. Причем, мы будем говорить только о той составляющей гуморального иммунитета, которая имеет прямое отношение к защите организма от злокачественных опухолей.

Это врожденный гуморальный иммунитет, и в своей противоопухолевой составляющей он обусловлен, в основном, а, может быть, и исключительно пентамерными иммуноглобулинами М, которые продуцируются В1-лимфоцитами. Одной из главных функций пентамерных IgM является надзор за трансформированными клетками.

Что такое естественные антитела?

- Часть врожденного иммунитета
- Без предварительной иммунизации
- Уровень практически не меняется в течение жизни

IgG, IgM, IgA, и IgD

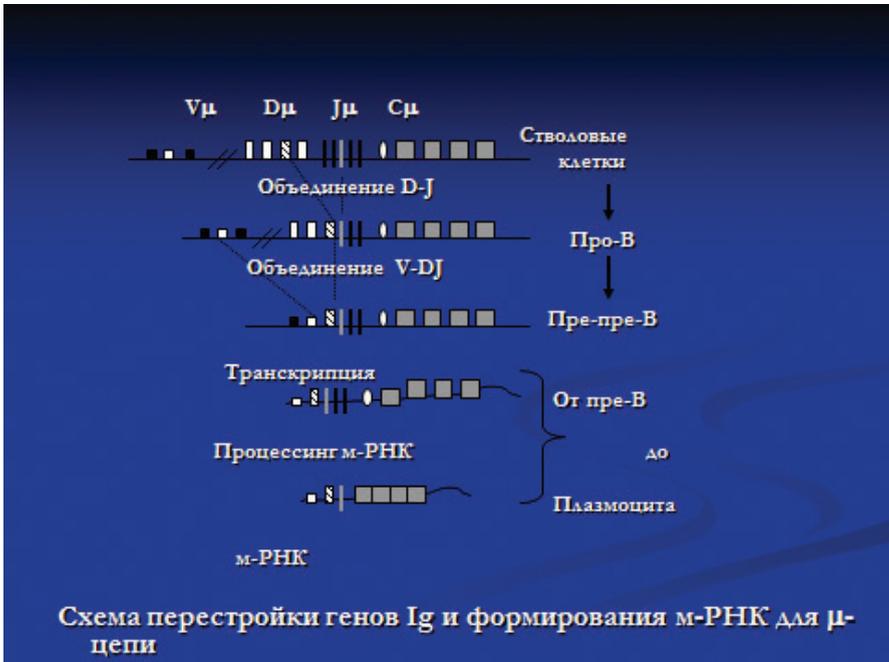
Функции естественных антител:

- *Надзор за трансформированными клетками*
- Первая линия обороны против бактерий и вирусов

3. Субпопуляция лимфоцитов В1, продуцирующих естественные пентамерные IgM, занимает промежуточное положение между клетками врожденного иммунитета и клетками истинного иммунитета.

Клетки иммунной системы (по Р.М. Хайтову, 2018)		
Клетки врожденного иммунитета	Промежуточные клетки	Клетки адаптивного иммунитета
<ul style="list-style-type: none"> • Эндотелиоциты • Эпителиоциты • Нейтрофилы • Тучные клетки • Эозинофилы • Базофилы • моноциты/макрофаги • Дендритные клетки • NK-клетки (CD3-CD16+CD56+) • ПС-клетки 	<ul style="list-style-type: none"> □ NKT-клетки □ $\gamma\delta$ Т-клетки □ В1-клетки (CD19+CD5+) □ В-клетки маргинальной зоны 	<ul style="list-style-type: none"> ✧ CD3+CD4+ Т-клетки ✧ CD3+CD8+ Т-клетки ✧ В-клетки (CD19+CD5-)

4. С истинным иммунитетом ее сближает наличие В-клеточных рецепторов — молекул мембранных иммуноглобулинов, которые синтезируются как и у всех В-лимфоцитов путем реаранжировки (объединения) трех генных сегментов. Однако переменные области этих иммуноглобулинов весьма ограничены. Это, пожалуй, всё, что сближает В1-лимфоциты с иммунной системой приобретенного (адаптивного) иммунитета.



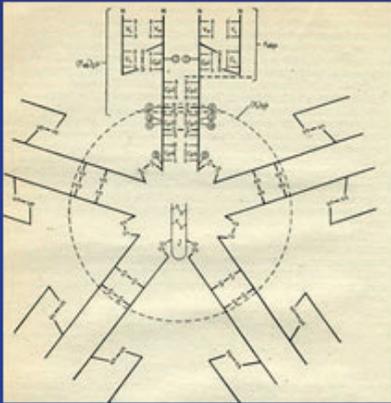
5. Сходства с неспецифическим врожденным иммунитетом значительно больше. Эти клетки (В1-лимфоциты) продуцируют антитела без предварительной иммунизации, у них отсутствует иммунологическая память.



6. Естественные или врожденные пентамерные иммуноглобулины М осуществляют удаление трансформированных клеток и являются первой линией защиты от инфекций. Кодированы наследуемыми генами ограниченных генных семейств, отсутствуют соматические гипермутации и переключение классов.

Они распознают углеводные антигены.

Естественные антитела



- IgM-изотип, нет соматических гипермутаций, переключения классов
- Эволюционная иммунологическая память
- Кодированы наследуемыми (germ-line) генами и принадлежат к ограниченным генным семействам
- IgM-антитела синтезируются В-1а лимфоцитами (CD5+) ~ 10% В-клеток
- В большинстве случаев связываются с углеводами

7. Естественные антитела к углеводным антигенам хорошо известны: помимо опухоли-ассоциированных антигенов, они распознают антигены групп крови, ксеноантигены, опухолиассоциированные антигены.

Наиболее известные антиуглеводные антитела человека:

К антигенам групп крови АВ0

А-антиген

GalNAc α 1-3
Gal β -
Fuc α 1-2

В-антиген

Gal α 1-3
Gal β -
Fuc α 1-2



Ксеноантигенам

Gal α 1-3Gal β -4Glc β -

Галляги

GalNAc α 1-3GalNAc β -

Форссмана

Опухолеассоциированным антигенам

Gal β 1-3GalNAc α -

Томсена-Фриденрайха

GalNAc α -

T₂

Neu5Ac α 2-6GalNAc α -

SiaT₂

8. Доказательства того, что пентамерные иммуноглобулины М, специфически (не затрагивая нормальные ткани) реагируют только с опухолевыми клетками и продуцируются В1-лимфоцитами, получены 20 лет назад командой ученых и патологов из Вюрцбурга.

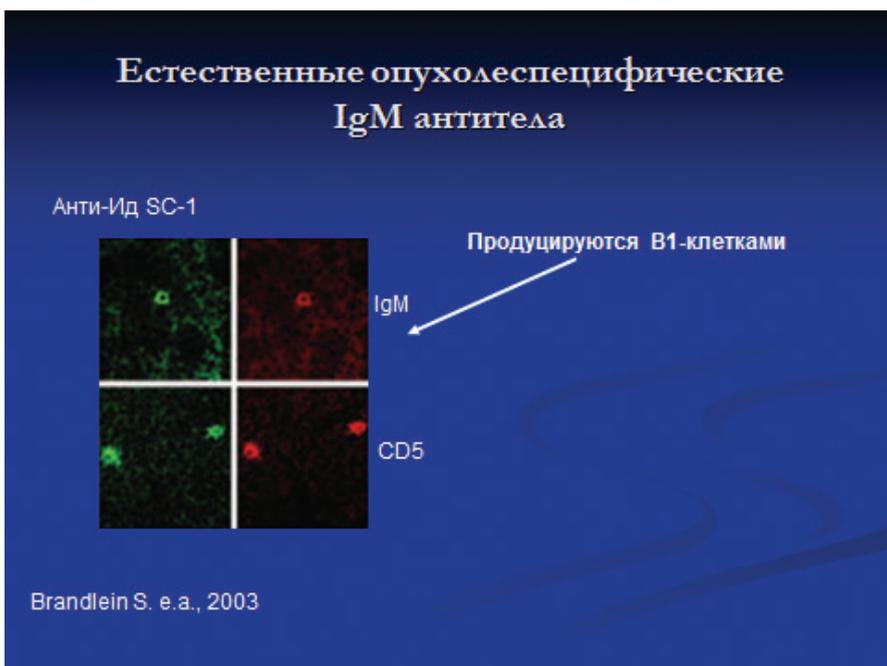
Доказательства роли естественных антител в противоопухолевом иммунитете







9. Получение антиидиотипических реагентов позволило установить, что это CD5-позитивные В-клетки, экспрессирующие на мембране IgM. Такие В-лимфоциты присутствуют в селезенке и лимфатических узлах здоровых лиц и больных раком. При слиянии с человеческой миеломой и переведении в экспрессионную систему они способны безудержно продуцировать противоопухолевые иммуноглобулины, не реагирующие с нормальными тканями. Именно команда из Вюрцбурга провела первые клинические испытания подобных антител и смогла установить новый механизм гибели опухолевых клеток под действием этих антител.



10. Данный механизм уникален, это первый пример возможности специфически, селективно, не повреждая нормальные ткани убивать раковые клетки. Он носит название липоаптоза или липоптоза.

Учитывая то, что данный механизм специфичен для рака, мы неоднократно рассматривали его на наших международных конференциях «Иммунология гемопоэза» в присутствии авторитетных зарубежных ученых. Первоначально, я обратился с этим вопросом к Александру Штилю — руководителю лаборатории механизмов клеточной смерти, в последующем это направление плавно переключалось к научному сотруднику лаборатории Штиля Виктору Татарскому, который не только сделал доклад, но и написал статью на 2 языках.



11. Явление оказалось не новым — клетки гибнут от накопления липидов и при неалкогольном стеатогепатите. Это всё неспецифичные явления, связанные с токсическим влиянием накопления липидов в печени. Подобный механизм может приводить к гибели клеток не только в печени, но и в поджелудочной железе, сердце.

Липоапоптоз – известное явление

Неалкогольный стеатогепатит, синонимы:

- Жировой гепатоз
- Стеатоз печени
- Жировая дистрофия печени
- Жировая печень

Это всё неспецифичные явления, связанные с токсическим влиянием накопления липидов в печени. Подобный механизм может приводить к гибели клеток не только в печени, но и в поджелудочной железе, сердце.

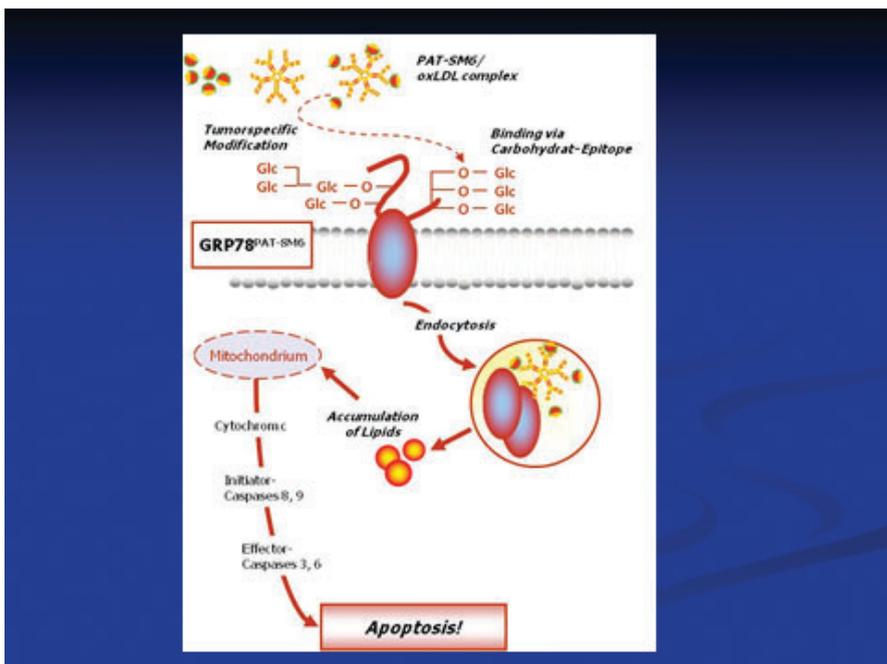
12. Виктор Татарский в своем обзоре справедливо отмечает, что потенциально ряд препаратов, увеличивающих концентрацию липидов в клетке, мог бы быть использован в лечении рака: это полиненасыщенные жирные кислоты — арахидоновая, докозагексаеновая, гамма-линоленовая, эйкозагексаеновая, JA вещество (из *J. Mandshurica*, маннозилэритритолы *Pseudozyma aphidis*), препараты увеличивающие чувствительность к высокой концентрации липидов в опухолях (препараты, активирующие аутофагию, ресвератрол), но только одно вещество способно делать это селективно, не повреждая нормальные клетки.

Возможности использования липоаптоза в терапии рака:

Увеличение внутриклеточной концентрации свободных жирных кислот:

- Липиды и их производные (полиненасыщенные жирные кислоты — арахидоновая, докозагексаеновая, гамма-линоленовая, эйкозагексаеновая, JA вещество из *J. Mandshurica*, маннозилэритритолы *Pseudozyma aphidis*).
- Препараты, увеличивающие внутриклеточное накопление липидов (селективно — SAM-6, PAT-SM6).
- Препараты увеличивающие чувствительность к высокой концентрации липидов в опухолях (препараты, активирующие аутофагию, ресвератрол)

13. Это антитело SAM-6 или PAT-SM6. Это пентамерные моноклональные антитела IgM класса, полученные теми же исследователями из Вюрцбурга. Антитела направлены против углеводной детерминанты белка теплового шока GRP78. Однако, данная детерминанта отсутствует на белковой молекуле в норме и является опухолеассоциированной. Антиген-специфичным участком антитела связываются с мембраной клетки, на которой экспрессирован рецептор, а другим концом — с липидами. Весь комплекс пиноцитируется, в цитоплазме липидный фрагмент диссоциирует, и накопление липидов ведет к гибели клетки ЭПР-индуцируемым стрессом. Участвуют как митохондриальный, так и рецепторный пути апоптоза. Это совершенно новое явление, и его значимость еще предстоит оценить. Но то, что изучать механизм связи и транспорта липидов внутрь опухолевой клетки необходимо — спору нет.



14. Липиды, накапливающиеся в клетке, могут выявляться как обычными на световом уровне методами окрашивания, так и люминисцентно.

SAM-6 индуцирует накопление липидов в раковых клетках

A **B**

+IgM

C **D**

+IgM +SAM-6

D **E**

+SAM-6

Нейтральные
липиды

Полярные
липиды

(окраска Nile Red)

Накопление нейтральных липидов
(окраска Суданом III)

Pohle T. et al., 2004

15. Интересно отметить, что немецкие ученые настолько увлеклись идеей использования врожденных пентамерных IgM к опухоли-ассоциированным гликанам, что создали специальную фирму в Австралии, фирму Патрис, целью которой является создание лечебных препаратов на основе данных антител. Продвигается и антитело PAT-SM6. По данным отчета фирмы в начале 2018 года PAT-SM6 продемонстрировали эффективность в отношении клеток ММ *in vitro*. Продemonстрировали противоопухолевую активность как на мышах так и в отношении опухолей человека (исследования при меланоме), имеют отличный профиль безопасности у человека — к настоящему времени показано, что PAT-SM6 являются безопасными. Получены первые доказательства того, что PAT-SM6 имеют противоопухолевую активность у больных ММ и являются перспективными для лечения этой опухоли.

Резюме по PAT-SM6

- PAT-SM6 продемонстрировали эффективность в отношении клеток ММ *in vitro* (апоптоз и CDC)
- Продemonстрировали противоопухолевую активность как на мышах (ММ) так и в отношении опухолей человека (меланома)
- Имеют отличный профиль безопасности у человека — к настоящему времени показано, что PAT-SM6 являются безопасными
- Получены первые доказательства того, что PAT-SM6 имеют противоопухолевую активность у больных ММ и являются перспективными для лечения этой опухоли

16. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России мы также пошли по пути изучения опухолеассоциированных гликанов и антител к ним.



Собственные результаты

17. Толчком послужили антитела G7, полученные Филом Раем, природу которых уточнили в лаборатории профессора Бовина, крупнейшего специалиста в области химии углеводов, институт биоорганической химии. Эти антитела распознают дисахарид Льюис С в составе высокомолекулярного MUC1.

Антитела LU-BCRU-G7 (P. Rye)



MUC-1

Антиген:

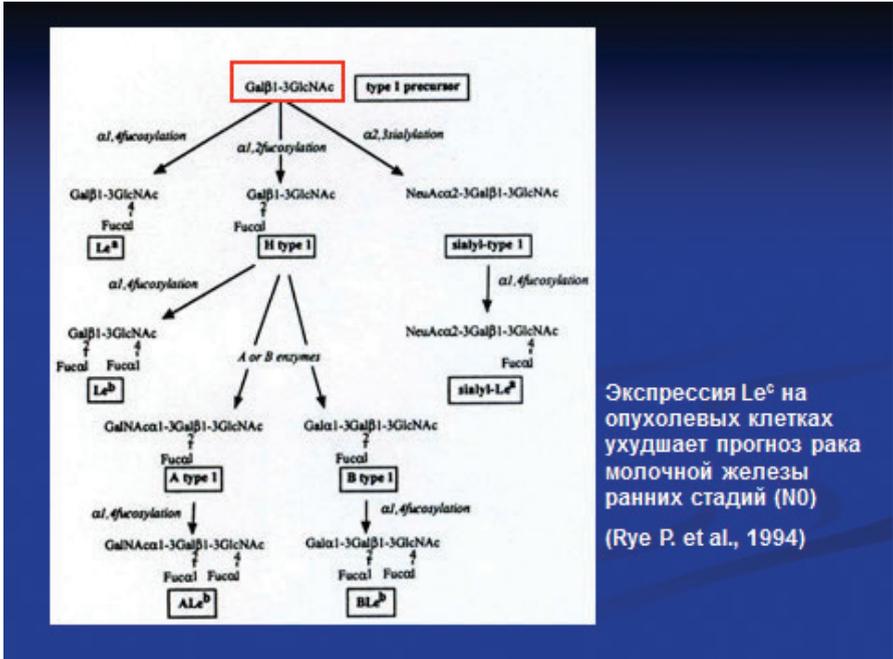
Gal β 1-3 Glc NAc,

Lewis C (Le^C),

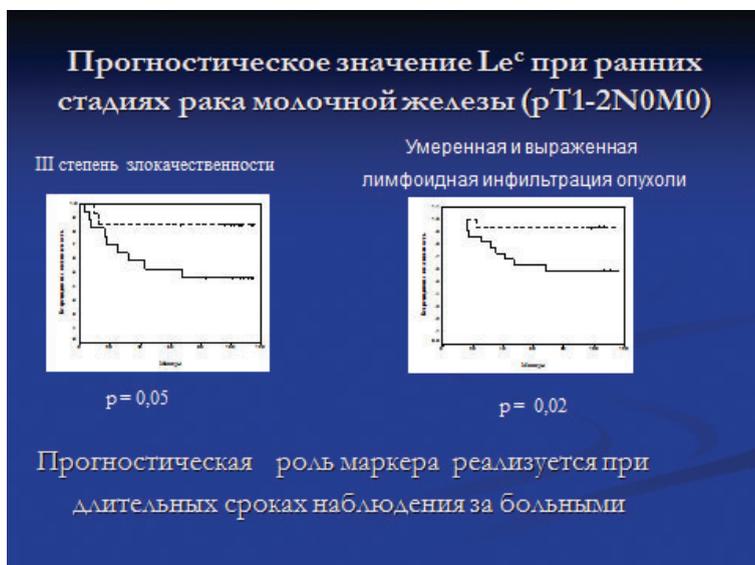
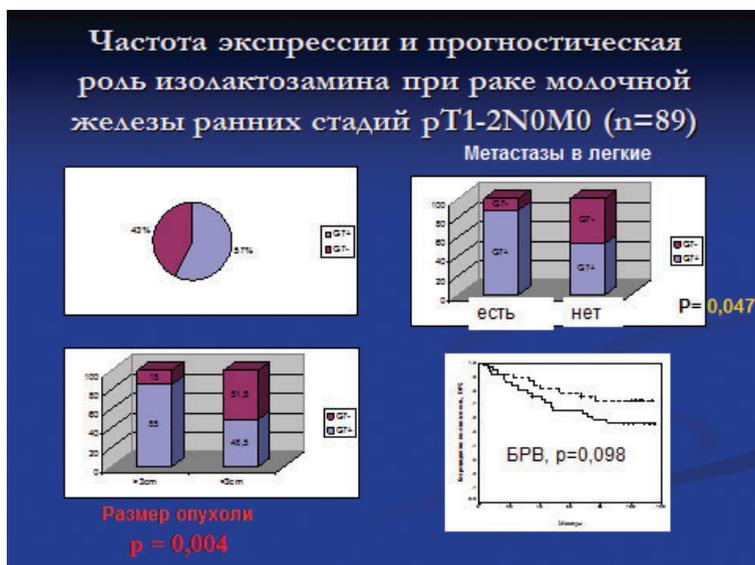
Изолактозамин,

Предшественник H1

18. Он является предшественником антигена H1 групп крови Льюис. Характерной особенностью является отсутствие экспрессии на нормальных тканях и наличие в 75% случаев при раке молочной железы (N0), причем с неблагоприятным течением.

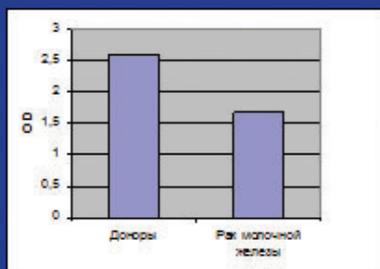


19–20. Проведенные нами исследования с этими антителами подтвердили неблагоприятную роль экспрессии антигена при раке молочной железы ранних стадий T1-2N0M0. Данные С.А. Шинкарева и соавторов.



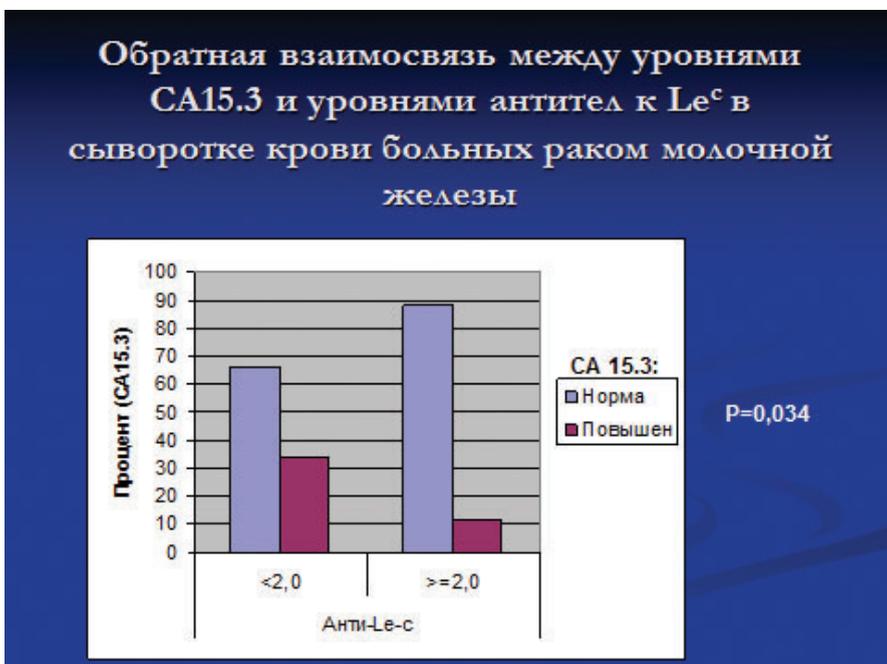
21. Было установлено, что уровни антител к LeC у больных раком молочной железы достоверно ниже, чем у здоровых женщин.

Уровни антител к Le^c у больных раком молочной железы достоверно ниже, чем у здоровых женщин



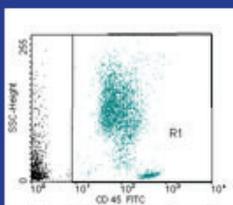
$p = 0,001$

22. И имелась достоверная реципрокная взаимосвязь между анти-LeC и уровнями маркера СА15.3 (все эти разделы работы были проведены совместно с лабораторией Николая Владимировича Бовина, ИБХ).

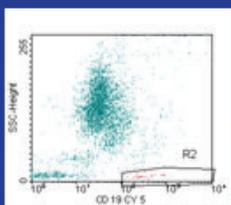


23–25. Использование меченого флуоресцеином лиганда Le^c позволило установить минорную популяцию В-лимфоцитов, экспрессирующих на мембране рецептор для этого гликана. Эти лимфоциты относились в популяции B1, так как коэкспрессировали на мембране CD5. Этапы данного анализа представлены на слайдах.

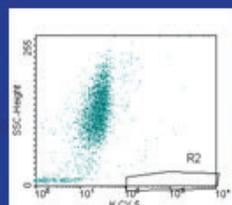
Этапы проточно-цитометрического выделения В-лимфоцитов для оценки субпопуляций (Le^c)



R1- гейт лейкоцитов
(CD45+)

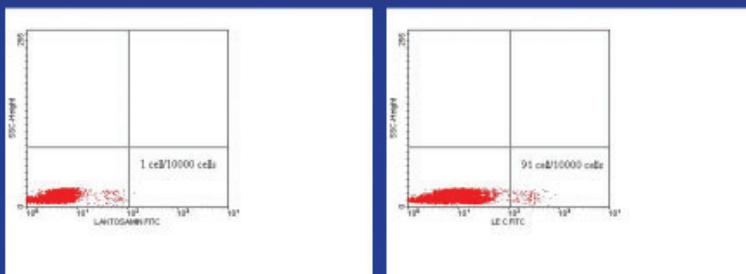


R2- гейт В-клеток
(CD19+)

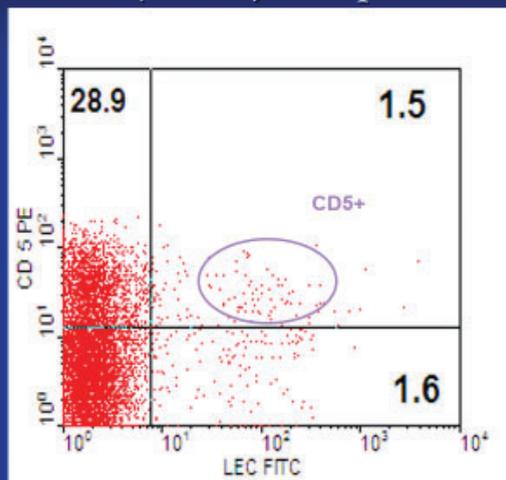


Контрольный образец

Высокие уровни связывания FITC- Le^c с В-лимфоцитами

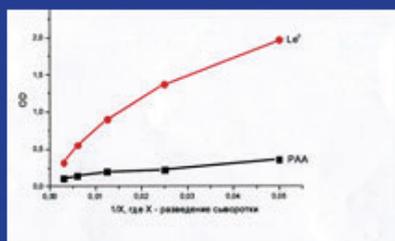


В-клеточный рецептор для Le^c представлен на В1 (CD5+) лимфоцитах



26. При дальнейшем анализе у доноров был отобран случай с высоким содержанием антител к LeC.

Получение естественных антител из донорской крови для исследования экспрессии Le^c

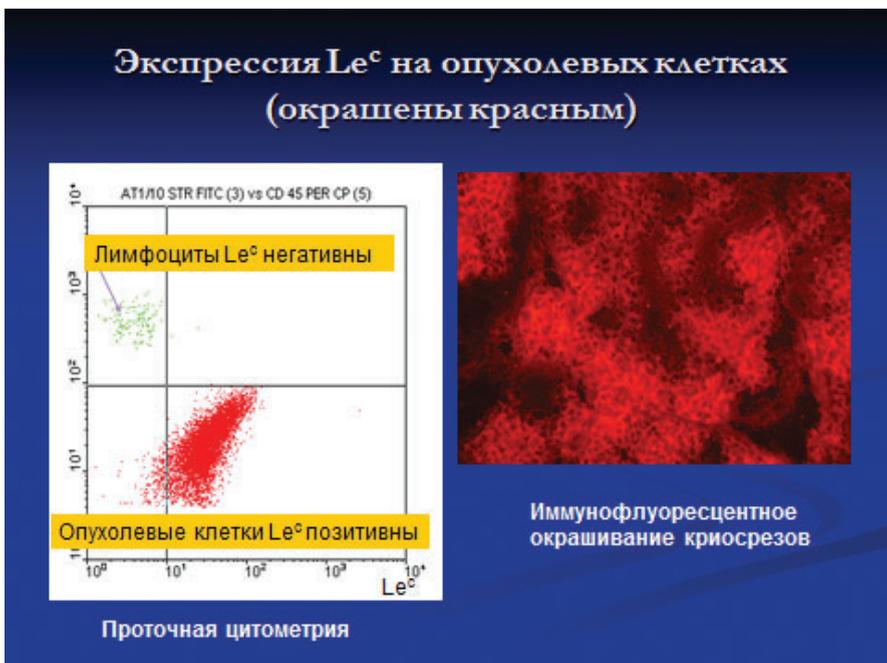


Выделение антител
иммуноаффинной
хроматографией на Le^c

Мечение биотином

Изучение экспрессии Le^c на
клетках рака молочной
железы

27. Антитела были аффинно выделены, помечены флуоресцеином и использованы в научной работе по анализу экспрессии антигена на опухоли в параллели с определением сывороточных антител к данному гликану.



28. Это позволило установить группу больных раком молочной железы с иммунодефицитом антител к LeC — 35% больных — потенциальных кандидатов на иммунозаместительную терапию.

Экспрессия Le^c на опухоли (рак молочной железы) и антитела к Le^c в сыворотке крови больных

Выделение 4 групп больных:

1. Le^c(+)/anti-Le^c(+)
2. Le^c(-)/anti-Le^c(+)
3. Le^c(-)/anti-Le^c(-)
4. **Le^c(+)/anti-Le^c(-) : потенциальные кандидаты на адоптивную терапию естественными антителами к Le^c (35% больных).**

29. А теперь вернемся к фирме Патрис, где наиболее целенаправленно осуществляется поиск специфических пентамерных IgM антител для терапии рака.

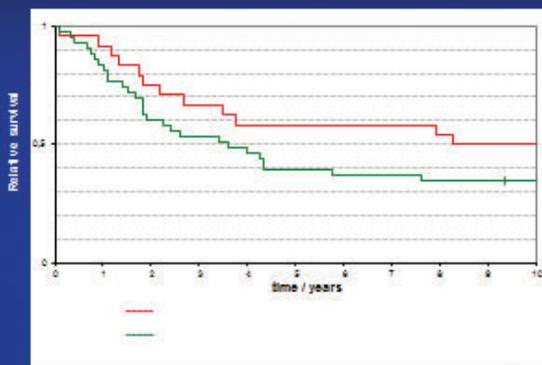
Самый известный кандидат — PAT-SC1. Именно эти антитела примерно 20 лет назад были испытаны в клинике Вюрцбурга у 51 больного. Эти результаты докладывал вице-президент компании д-р Хенцель здесь в этом зале на конференции «Иммунология гемопоэза». Антитела распознают особую углеводную детерминанту рецептора фактора, ускоряющего свертывание. И, если сам рецептор, представлен как на слизистой желудка, так и на некоторых нормальных тканях. То гликан, распознаваемый SC-1, экспрессирован только на раке желудка, примерно в 70% случаев.

Антитела SC-1

Характеристики CD55 ^{SC-1}
GPI (гликозил-фосфатидилинозитол) – заякоренный мембранный белок
мол.масса 82kDa
Запатентованный вариант CD55 (DAF, рецептора фактора, ускоряющего свертывание), экспрессирован только на раковых клетках
Дикий тип CD55 (CD55WT), экспрессирован как на раковых клетках, так и на нормальных тканях

30. Экспрессия рецептора ассоциирована с неблагоприятным прогнозом,

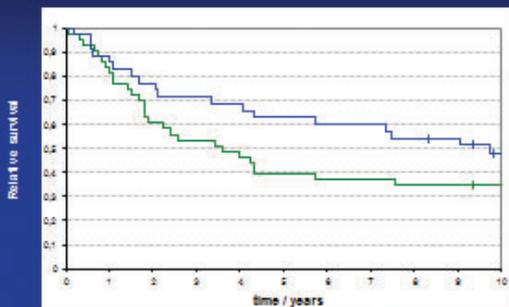
10 летняя выживаемость больных раком желудка в зависимости от экспрессии антигена PAT-SC1



Экспрессия антигена PAT-SC1 явилась отрицательным фактором прогноза

31. а использование антител с лечебной целью позволяет существенно улучшить результаты лечения в прогностически неблагоприятной группе.

Сравнение 10-летней выживаемости у РАТ-SC1- позитивных больных



Применение антител (20 мг за 48 час до операции) у CD55^{SC1}-
позитивных больных раком желудка улучшает показатели
выживаемости.

32. Подводя итог по PAT-SC1, фирма Патрис отмечает, что антитела PAT-SC1 были выделены от больных раком желудка, они реагируют примерно у 70% больных раком желудка, антиген является изоформой CD55, эти IgM антитела индуцируют апоптоз опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*; экспрессия PAT-SC1 является фактором неблагоприятного прогноза, 20mg антител могут быть введены безопасно и не вызывают побочных эффектов, адьювантное лечение PAT-SC1 позитивных больных 20mg антител увеличивает 10-летнюю выживаемость у больных.

Итог, PAT-SC1

- Антитела PAT-SC1 были выделены от больных раком желудка
- Они реагируют примерно у 70% больных раком желудка
- Антиген является изоформой CD55
- Эти IgM антитела индуцируют апоптоз опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*
- Экспрессия PAT-SC1 является фактором неблагоприятного прогноза
- 20mg антител могут быть введены безопасно и не вызывают побочных эффектов
- Адьювантное лечение PAT-SC1 позитивных больных 20mg антител увеличивает 10-летнюю выживаемость у больных раком желудка

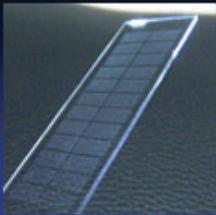
33. Особенно важно то, что введение человеческих естественных моноклональных IgM антител SC-1 (к углеводному антигену клеток рака желудка) достоверно снижает частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге ($p = 0,0011$). Это приобретает в настоящее время особую актуальность, так как именно эрадикация этих клеток может определять прогноз у радикально пролеченных больных. В настоящее время лицензию на производство антител приобрела китайская фирма Hefei. Фирма уже произвела антитела на основе купленного сиквенса, в настоящее время проводятся доклинические испытания. По условиям контракта фирма может распространять антитела только на территории Китая, там 40% всего рака желудка.

Естественные IgM антитела уничтожают диссеминированные опухолевые клетки

- Мыши nude с метастазирующей человеческой аденокарциномой желудка
- Определение диссеминированных опухолевых клеток методом RT-PCR (СК-20)
- Введение человеческих естественных моноклональных IgM антител SC-1 (к углеводному антигену клеток рака желудка) достоверно снижает частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток ($p=0,0011$)

Illert B. et al., 2005

34. Но, давайте вернемся к диагностике на основе антигликанов. В этой области достигнут колоссальный прогресс. Он связан с разработкой метода гликочипирования. На пластик размером с предметное стекло в небольшие лунки прикрепляют химически чистые гликаны (до 600 на стекло). Это делается с помощью робота, печатающего микрочипы.



Микрочип

Микрочип

Микрочипы
производятся
компанией



CELLULAR BIOCHEMISTRY
SEMIOTIK



Робот для печати микрочипа

> 600 лигандов

Гликановые лиганды на чипе

- ❖ Терминальные и коровые фрагменты углеводных цепей гликопротеинов
- ❖ Олигосахариды гликолипидов
- ❖ Антигены групп крови систем АВ0, Ё, Р и др.
- ❖ Углеводы, не типичные для млекопитающих
- ❖ Полисахариды условно патогенных и патогенных бактерий

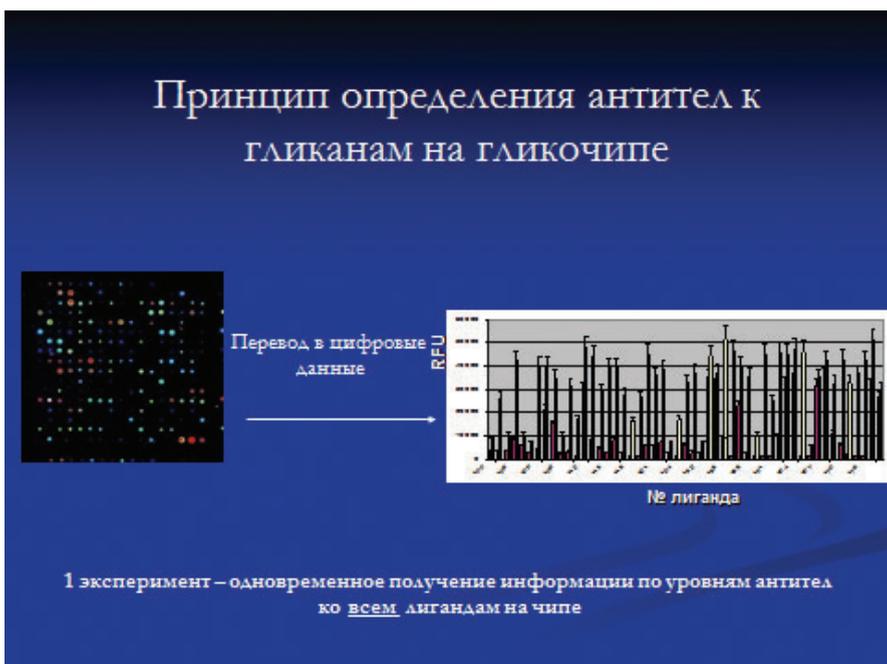
Другие лиганды на чипе

- ❖ Гликопептиды
- ❖ Пептиды

Плавивируется:

- ❖ Гликолипиды
- ❖ Белки
- ❖ Целые клетки

35. Далее микрочип обрабатывается изучаемой сывороткой, а затем проявляется люминисцентной сывороткой. Данные переводятся в цифровой формат и анализируются. Анализ сложен, необходимо участие биоинформатиков, и первые результаты были получены при участии центров биоинформатики в Сан-Диего (США).



36. Устанавливается своего рода сигнатура, позволяющая классифицировать случай-контроль. И механизм анализа носит название иммунорулер.

Таким образом удалось определить диагностические сигнатуры для рака молочной железы, толстой кишки,

Математический анализ данных чипа.

Иммунорулер.

Yuskovic MI, Xu H, Bowin NV, Pass HI, Hufstajt ME. Int J Bioinf Res App. 2011; 7: 402-426

Иммунорулер — математический аппарат для поиска сигнатуры, а также для того, чтобы на основании выбранной сигнатуры классифицировать и дискриминировать иммунопрофили групп «случай-контроль» (степень риска наличия заболевания или другого фактора).

«Случай» (голубой) - «Контроли» (розовый)

Степень риска

Пациенты

3D-представление результата (метод главных компонент)

пациенты

Контрольная группа

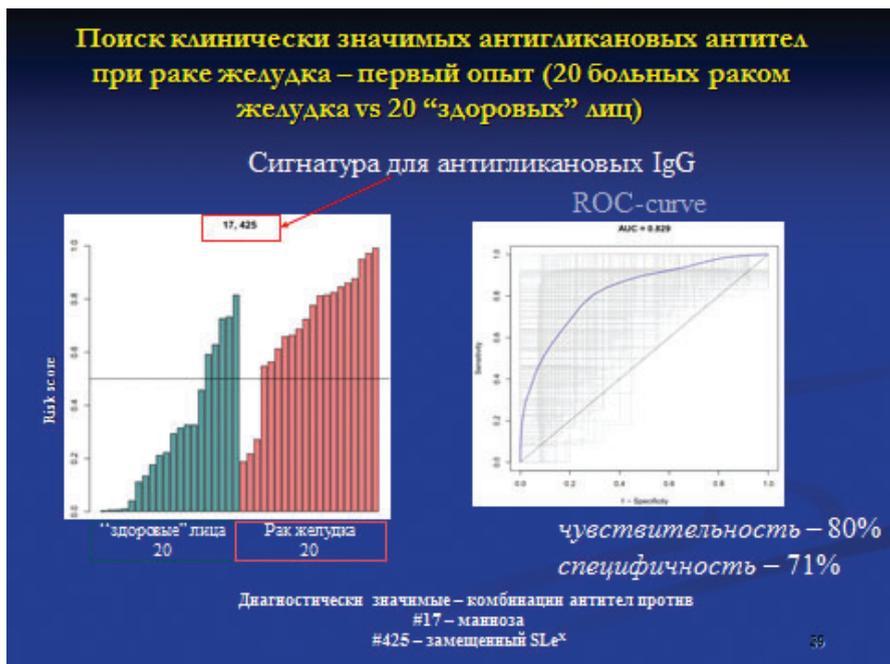
37

37. и яичников — приведен пример информативных гликанов.

Углеводные структуры, позволяющие разграничивать рак яичников и здоровых лиц (Jacob F. et al., 2012)

	Carbohydrate Structure	Common abbreviation	p value
1	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	P1	0,0008
2	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Asn	Chitobiose-Asn	0,0019
3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β		0,0025
4	GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β		0,0041
5	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β	P ^k	0,0077
6	Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β		0,0081
7	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β		0,0089
8	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β		0,0095
9	GlcNAc β 1-3Man β		0,0106
10	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β		0,0120

38. В настоящее время исследования ведутся при раке желудка. Максим Петрович Никулин доложил их на международной конференции в Будапеште. В предварительном анализе на 20 больных в сравнении с донорской группой получены надежные диагностические доказательства.



39. Достоверные различия касались антител к сиалил Льюис X и маннозе.

Это чрезвычайно интересно, однако, анализ временно приостановлен из-за отсутствия микрочипов, для приобретения которых требуются средства.

Внедрение данного высокоточного диагностического подхода в настоящее время мы проводим с институтом ЭДиГО, состоялись встречи с директором, выработана рабочая группа, специалисты из ИБХ приезжали смотреть наши возможности, а группа наших коллег под руководством Вячеслава Станиславовича ознакомились с тем, как все делается в ИБХ, и каковы перспективы продолжения работы, в которой оба института чрезвычайно заинтересованы.

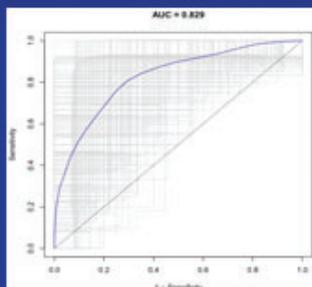
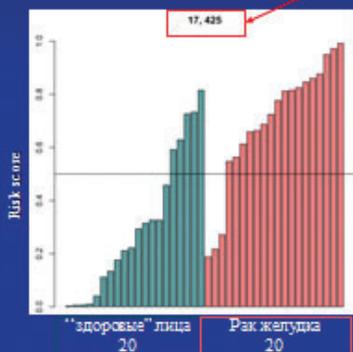
Внедрение метода гликоципирования имеет на данном этапе, в первую очередь, диагностическую цель — установление иммунодефицитов по врожденным антигликановым антителам. Дальнейший ход работы у онкологических больных может заключаться в адоптивной иммунотерапии с использованием антител выделенных из плазмы доноров крови или полученных биотехнологически.

Отдельным разделом является исследование здоровых лиц и людей из групп различного риска заболевания раком. Установление соответствующих иммунодефицитов у этих больных может явиться основанием для применения антител с заместительной целью. А это уже иммунопрофилактика рака. Причем, направленная на отдельные гликаны и антитела к ним, то есть научно обоснованная. Это направление работ мне представляется наиболее перспективным, так как я согласен с положением, что «единожды пропустив рак, организм уже никогда его не догонит». Бороться с раком по-видимому значительно сложнее, чем его предупреждать.

Поиск клинически значимых антигликановых антител при раке желудка – первый опыт (20 больных раком желудка vs 20 “здоровых” лиц)

Сигнатура для антигликановых IgG

ROC-curve



чувствительность – 80%
специфичность – 71%

Диагностически значимые – комбинации антител против
#17 – манноза
#425 – замещенный SLe^x

40. А есть ли способы повысить антигликаны? Это вопрос не изучен. В экспериментальных работах было показано, что уровни врожденных антител могут быть повышены с помощью полиоксидония. Они могут быть повышены в 3–7 раз, но у человека таких работ не проводилось. Вероятно, необходима целая программа по скринингу иммуноадапвантов, повышающих уровни естественных антигликанов.

Влияние полиоксидония на гуморальный иммунный ответ мышей с возрастным иммунодефицитом

Влияние полиоксидония на гуморальный иммунный ответ мышей с возрастным иммунодефицитом

Мыши	Возраст, мес.	Пол	Доза ЭБ	Доза ПО, мкг/мышь	Число АОК в селезенке	Индекс стимуляции	Кол-во животных
СВА	3	Самцы	2×10^7	—	18240 ± 544	—	18
СВА	16	Самцы	2×10^7	—	1360 ± 30	1	20
СВА	16	Самцы	2×10^7	1000	5130 ± 128	3,77	17
(СВА × С57В1) F ₁	3	Самцы	2×10^6	—	318 ± 90	—	9
(СВА × С57В1) F ₁	20	Самцы	2×10^6	—	98 ± 20	1	13
(СВА × С57В1) F ₁	20	Самцы	2×10^6	1000	760 ± 190	7,75	11
(СВА × С57В1) F ₁	3	Самки	2×10^6	—	264 ± 51	—	20
(СВА × С57В1) F ₁	20	Самки	2×10^6	—	108 ± 20	1	12
(СВА × С57В1) F ₁	20	Самки	2×10^6	1000	311 ± 56	2,88	11

Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В. И др., 2015

40. Существуют ли иные пути специфического воздействия на опухолеассоциированные гликаны, кроме антител. Да, такой путь есть, он может показаться даже более реализуемым, чем с антителами. Речь идет о так называемых аптамерах, то есть небольших фрагментах нуклеиновых кислот, способных высокоспецифически связываться с тем или иным субстратом — белками, углеводами и т.д. Нам повезло, и мы сотрудничаем не только с высочайшего уровня химиками, специалистами в области углеводов, командой Николая Владимировича Бовина, но и с химиками из МГУ, института Белозерского, специалистами в области нуклеиновых кислот. Я имею в виду профессора Веру Алексеевну Спиридонову. Она является ведущим специалистом в России по получению аптамеров. Нами совместно с МГУ были получены аптамеры к интерлейкину-6. Эти вещества были способны специфически ингибировать функцию цитокина. Уже в ходе подготовки доклада зародилась мысль получить аптамеры к опухолеассоциированным гликанам. Это, по-видимому не более сложно, чем получить аптамеры к эпитопу белка, находящемуся в сайте функциональной активности. Тем более что чистые гликаны — ди-, три-, тетра сахараиды и их всевозможные комбинации доступны, они есть или могут быть получены в лаборатории профессора Бовина.

Структура РНК-аптамера к ИЛ-6

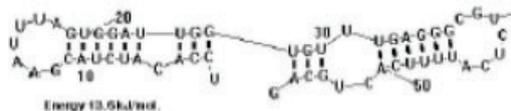


Рис. 5. Модель предполагаемой вторичной структуры аптамера RAhIL-6.9.
 Pic. 5. Model of presumptive secondary structure of RAhIL-6.9 aptamer

41. В заключении хотелось бы отметить следующее. Врожденные антитела осуществляют надзор за возникающими опухолевыми клетками и их элиминацию. Для специфического удаления опухолевых клеток используется особый механизм апоптоза. Коррекция уровней специфических антител возможна при условии их определения с помощью гликочипа. Актуален поиск иммуноадъвантов, способных повышать уровни антител к опухолеассоциированным гликанам (иммунопрофилактика рака).

Заключение

- Врожденные антитела осуществляют надзор за возникающими опухолевыми клетками и их элиминацию
- Для **специфического** удаления опухолевых клеток используется особый механизм апоптоза
- Коррекция уровней специфических антител возможна при условии их определения с помощью гликочипа
- Актуален поиск иммуноадъвантов, способных повышать уровни антител к опухолеассоциированным гликанам (иммунопрофилактика рака)

42. Благодарю за внимание.



Благодарю за внимание

**ФОТОРЕПОРТАЖ С 15-Й ЮБИЛЕЙНОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»**

5-7 июня 2018 г. Будапешт





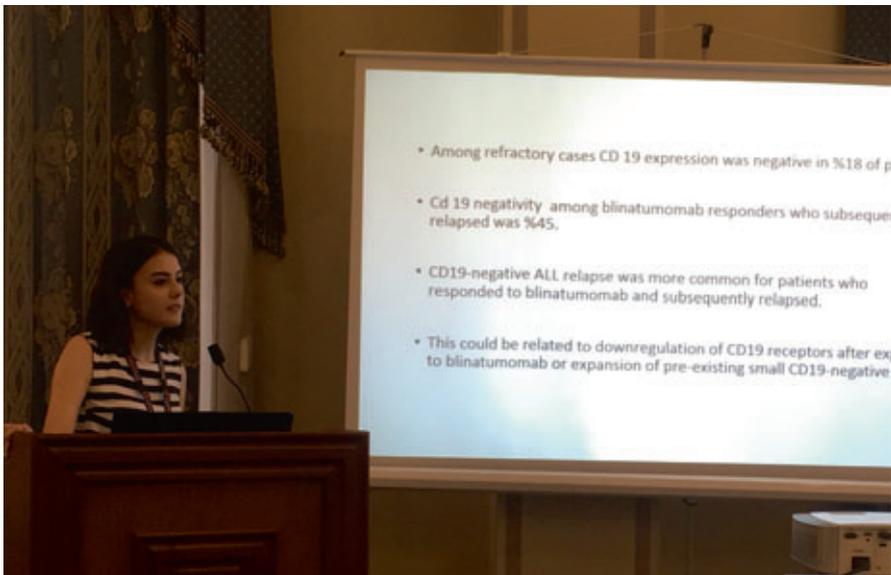






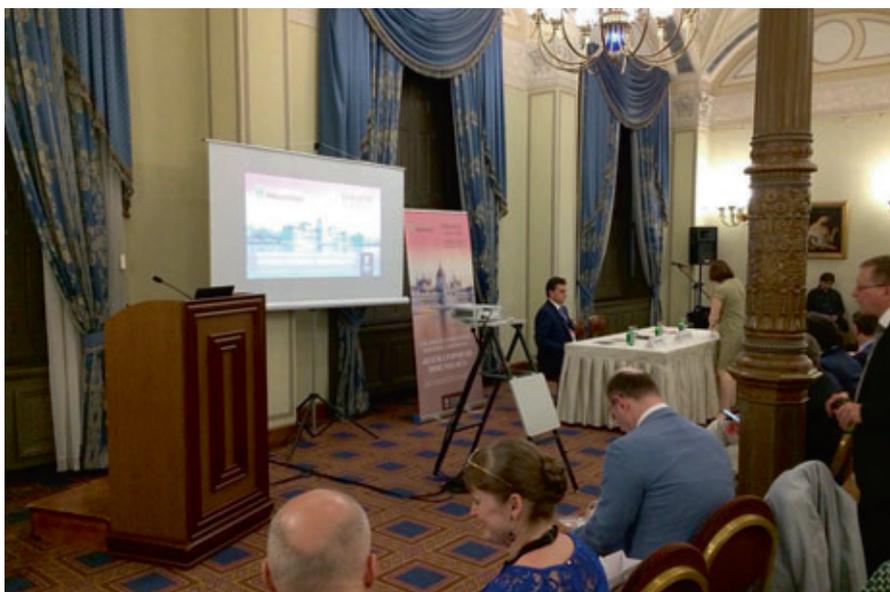














ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ 16-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ИНДЕКС У БОЛЬНЫХ С ДИСФУНКЦИЕЙ В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА

*В.А. Мисюрин¹, А.В. Пономарёв¹, А.А. Турба², А.Е. Мисюрина³, В.В. Тихонова¹,
Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лыжко¹, О.В. Солопова¹, А.В. Мисюрин²*

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

²ООО «ГеноТехнология» Россия, ³ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава
России

Введение. В норме значение иммунорегуляторного индекса (ИРИ, отношение числа CD4+ Т-хелперов к CD8+ Т-киллерам) колеблется в пределах от 1,5 до 2,6. При инфекциях, хронических и онкологических заболеваниях и стрессах значение ИРИ обычно снижается до 1 и менее. С другой стороны, аутоиммунные заболевания связаны с увеличением значения ИРИ до 3 и более. Согласно нашим наблюдениям, у отдельных больных, находящихся в ремиссии В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, значения ИРИ может быть близко к 1, а Т-киллеры и НК-клетки экспрессируют антиген CD38, свидетельствующий об их активации.

Цель работы. Сопоставить показатели ИРИ и уровень экспрессии CD38 на поверхности Т-киллеров и НК-клеток у больных В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями и у здоровых добровольцев.

Материалы и методы. Были изучены образцы периферической крови 19 больных В-ХЛЛ и 7 больных В-ОЛЛ, находящихся в ремиссии заболевания. У 8 больных В-ХЛЛ наблюдалась полная деплеция В-лимфоцитов. Для формирования группы контроля была собрана кровь 24 здоровых добровольцев. Иммунофенотипирование антигенов CD45, CD19, CD20, CD3, CD4, CD8, CD56 и CD38 проводилось на проточном цитометре ACEA NovoCyte. Анализ данных проводился при помощи критерия Манна-Уитни.

Результаты. Медиана ИРИ и экспрессия CD38 Т-киллерами и НК-клетками у здоровых добровольцев составили 1,91, 1,67 и 4,52, соответственно. Медиана ИРИ и экспрессия CD38 Т-киллерами и НК-клетками у В-ХЛЛ составили 0,83, 6,98 и 10,44, в то время как у больных В-ХЛЛ с деплецией В-клеток — 0,77,

9,45 и 12,41, соответственно. Медиана ИРИ и экспрессия CD38 Т-киллерами и НК-клетками у В-ОЛЛ в ремиссии составили 0,93, 6,34 и 13,97, соответственно, что было сопоставимо с результатами, наблюдаемыми у больных В-ХЛЛ. Значения ИРИ у больных были статистически значимо ниже, а количество CD38-экспрессирующих Т-киллеров и НК-клеток статистически значимо выше по сравнению со здоровыми донорами.

Заключение. Мы наблюдаем преобладание активированных Т-киллеров и НК-клеток в условиях сниженного числа или отсутствия В-лимфоцитов. При этом значение ИРИ также снижено, и находится на уровне около 1. Мы предполагаем, что данное явление вызвано компенсированием утраченных функций В-лимфоцитов при помощи киллерных клеток и прежде всего CD8+ Т-клеток.

СУБПОПУЛЯЦИИ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

О.А. Чернышева, И.Г. Маркина, Л.В. Демидов, А.С. Антипова, И.Н. Михайлова, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Введение: несмотря на значительные успехи современной онкологии, проблемы метастазирования и лекарственной устойчивости опухолевых клеток остаются не решенными. Одним из подходов в решении данных вопросов является поиск и характеристика так называемых стволовых опухолевых клеток — микрорной популяции, в которой происходит накопление молекулярно-генетических перестроек, придающих свойства наибольшей злокачественности и множественной лекарственной устойчивости. Нами предпринята попытка перенести концепцию анализа стволовых опухолевых клеток первичной опухоли на диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге при меланоме. По данным литературы стволовые опухолевые клетки характеризуются экспрессией CD133 — антигена из семейства 5-трансмембранных гликопротеинов, в норме выявляемого на ранних этапах дифференцировки гемопоэтических клеток.

Цель исследования: охарактеризовать ДОК при меланоме кожи с точки зрения маркеров стволовых опухолевых клеток. Дополнительно оценить экспрессию антигенов CD56 и CD57 на ДОК.

Материалы и методы: в исследование включено 47 больных (23 мужчины и 24 женщины) в возрасте от 20 до 72 лет (медиана 49,8 лет), находящихся под наблюдением по поводу меланомы кожи в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2018–2019 гг. У большинства больных диагностирована IV стадия заболевания. Больные с III стадией процесса составили 21,7%. По 4 пациента (17,4%) вошли в группы с I и II стадиями заболевания. Проведена оценка поражения костного мозга до начала лечения с морфологической и иммунологической точек зрения. Морфологическое исследование включало подсчет миелограммы и поиск микрометастазов на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Иммунологически ДОК выявлялись на основании CD45⁺HMB-45⁺ иммунофенотипа в пределах Syto41⁺ ядродержащих клеток образца. Оценивалось 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца). У 22 больных оценена экспрессия стволовклеточного антигена CD133, дополнительно ДОК охарактеризованы с точки зрения нали-

чия молекул CD56 и CD57 ($n = 23$), являющихся дополнительными критериями при первичной диагностике.

Результаты: иммунологически ДОК выявлены в 57,4% случаев (пороговый уровень ДОК-позитивности 1 клетка на 10 млн миелокариоцитов). В нашем исследовании экспрессия CD56 и CD57 оценена в 23 образцах костного мозга. ДОК в данной группе выявлено в 54,2% случаев ($n = 13$), однако экспрессии CD56 на этих клетках не обнаружена. Экспрессия CD57 на ДОК выявлена в 6 случаях (46,2%). Важно, что не все 100% ДОК в каждом образце КМ характеризовались экспрессией CD57. В среднем $87,4 \pm 5,8\%$ ДОК были CD57 — позитивны. Интересно, что 50% CD57⁺ больных имеют IV стадию заболевания. Экспрессия CD133 оценена в 22 образцах костного мозга. Половина образцов КМ этой группы характеризовалась ДОК — позитивностью. Только в 1 ДОК — позитивном пункте выявлена популяция CD133⁺-ДОК, их количество составило 1,58% от всех ДОК в данном случае.

Заключение: таким образом современная многоцветная проточная цитометрия дает возможность оценивать не только микрометастатическое поражение костного мозга, но и характеризовать субпопуляционный состав ДОК. Оценка прогностического значения экспрессии указанных маркеров на ДОК требует дальнейшего дополнительного изучения.

ДИССЕМИНИРОВАННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ МЕЛАНОМЕ. ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ

О.А. Чернышева, И.Г. Маркина, Л.В. Демидов, А.С. Антипова, И.Н. Михайлова, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Введение: Меланома кожи занимает лидирующее положение среди новообразований с непредсказуемым биологическим течением. У 40% больных развиваются отдаленные метастазы через 5 лет и более после радикального хирургического лечения. Более того, именно меланома кожи является одним из наиболее частых метастатических видов рака без выявленного первичного очага. Таким образом, биология меланомы диктует необходимость поиска очагов персистенции опухолевых клеток. С учетом анатомических и функциональных особенностей именно костный мозг является наиболее притягательной нишей, способной обеспечить условия для поддержания жизнеспособности опухолевых клеток. Значение диссеминированных опухолевых клеток (ДОК), как фактора неблагоприятного прогноза показано для опухолей различной локализации, однако работы, касающиеся ДОК при меланоме, являются скромными по масштабу и понимаю.

Цель: определить частоту поражения костного мозга при меланоме методом проточной цитометрии.

Материалы и методы: в исследование включено 47 больных (23 мужчины и 24 женщины) в возрасте от 20 до 72 лет (медиана 49,8 лет), находящихся под наблюдением по поводу меланомы кожи в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2018–2019 гг. Распределение больных по стадиям представлено в таблице 1. Проведена оценка поражения костного мозга до начала лечения с морфологической и иммунологической точек зрения. Морфологическое исследование включало подсчет миелограммы и поиск микрометастазов на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Иммунологически ДОК выявлялись на основании CD45-НМВ-45⁺ иммунофенотипа в пределах Syto41⁺ ядродержащих клеток образца. Оценивалось 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца).

Результаты: Морфологически ДОК выявлены только в 1 из 47 случаев. При иммунологической оценке наличия ДОК в КМ за пороговый уровень была

принята 1 опухолевая клетка (Syto41⁺CD45-HMB-45⁺) на 10 млн миелокари-
оцитов. С учетом заданного порогового значения ДОК выявлены в 57,4% об-
разцов КМ (n = 27). Статистически достоверных различий в количестве ДОК
в зависимости от пола, возраста и стадии заболевания не получено. Важно,
что среди больных с I стадией заболевания ДОК выявлены в 28,6% случаев.

Заключение: костный мозг играет ключевую роль в процессе гематогенно-
го метастазирования. Полученные данные демонстрируют, что диссеминация
начинается даже на начальных этапах развития опухоли и выявляется даже
у больных с I стадией заболевания. Прогностическое значение полученных
результатов требует дальнейшего изучения.

Таблица 1.

Распределение больных по стадиям заболевания

Стадия	Частота	Процент (%)
I	7	14,9
IIa	1	2,1
IIb	5	10,6
IIc	3	6,4
III	11	21,3
IV	20	42,6

IMMUNOMORPHOLOGICAL DIAGNOSIS OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN MULTIPLE MYELOMA

E.E. Tolstykh

Laboratory of haematopoiesis immunology of Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Centre of oncology» of the Health Ministry of Russia, Moscow

Immunophenotypic changes accompany every stage of the differentiation of B-cells towards the plasma cells (PC).

Minimal residual disease (MRD) means the state when after treatment there persists population of malignant cells in bone marrow, which can cause the development of disease relapse. MRD assessment serves as a criterion of remission determination and it is used for the forecast and identification of risk groups. The absence of phenotypically aberrant (clonal) PCs among at least 1mln. bone marrow cells analyzed with multi-color flow cytometry (MFC) is the criterion of remission. Sensitivity of this method is 10^{-4} . MRD in multiple myeloma (MM) is defined in the certain time points and it is performed on the basis of aberrant expression of antigens of plasma cells.

Nowadays in most cases the aberrant immunophenotype of plasma cells (expression of three markers CD45, CD56 and CD19 in gates CD38 and CD138) is defined for the diagnosis of multiple myeloma. The assessment of the combination of only these three markers allows to identify aberrant PC in more than 90% cases of MM. However it is necessary to broaden the range of the research and to characterize the importance of other markers in the primary diagnosis and minimal residual disease monitoring.

It is necessary to use two methods: morphological and immunophenotypic. Morphological method includes the calculation of myelogram and plasma cells description. The normal number of PC in bone marrow is 0,1–1,8%. Immunophenotypic method we are done using cytometer FACSCantoII. The panel of monoclonal antibodies and fluorochromes is used for both the primary diagnosis and the MRD assessment.

The primary immunophenotype of tumor is characterized by expression of CD45, CD56, β 2-microglobulin, CD28, CD27, CD117, CD81 and CD19 in gates CD138 and CD38 and also on the basis of the clonality of plasma cells by kappa (κ) or lambda (λ) types.

Now in the laboratory of immunology of haematopoiesis 100 samples of bone marrow, 46 of which were at primary diagnostics and (there were no strong data for 4 of them) were analyzed with panel Euroflow for the diagnosis of plasmacell tumors. The plasma cells in the myelogram of the examined patients were 2–10%.

Plasma cells of the primary patients had aberrant immunophenotype by expression of CD45, CD56 and CD19 and they were distributed as follows:

1. CD45-CD56+CD19- (22 patients);
2. CD45-CD56+CD19+ (2 patients);
3. CD45-CD56-CD19- (12 patients);
4. CD45+CD56+CD19- (6 patients).

The most common aberration of surface antigens in MM included negative expression of CD45 and CD19, high density of CD56 and reduced expression of CD38. According to our research 50% of patients had aberrant immunophenotype CD45-CD56+CD19-. Marker CD56 was positive in 30 observed MM patients. Plasma cells normally have immunophenotype CD27+/CD28-, aberrant cells in multiple myeloma had immunophenotype CD27-/CD28+. Ratio κ/λ can help to clarify cases when the analysis of surface markers causes difficulties; restriction of light chains was assessed in the chosen PC population. Kappa-type was defined in 28 patients and lambda-type in 14 patients.

The standardization of the method, the common protocol of diagnostics and the establishment of certain time points are necessary for the MRD assessment and monitoring during treatment and for the confirmation of the answer after therapy.

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Е.Э. Толстых

Лаборатория иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

Имунофенотипические изменения сопровождают каждую стадию дифференцирования активированных В-клеток в плазматические клетки (ПК).

Минимальной остаточной болезнью (МОБ) называют состояние, при котором в результате лечения в костном мозге остается популяция злокачественных клеток, которые могут стать причиной развития рецидива заболевания. Оценка МОБ является критерием установления ремиссии и используется для прогноза и выявления групп риска. Критерием строгой полной ремиссии является отсутствие фенотипически aberrантных (клональных) ПК среди не менее 1млн. проанализированных клеток костного мозга методом многоцветной проточной цитометрии (МПЦ) (≥ 4 маркеров). Чувствительность этого метода 10⁻⁴. МОБ при ММ определяется в заданных временных точках, и осуществляется на основе aberrантной экспрессии ряда антигенов плазматических клеток.

В настоящее время для диагностики множественной миеломы в большинстве случаев определяют aberrантный иммунофенотип плазматических клеток по экспрессии трех маркеров CD45, CD56 и CD19 в гейте CD38 и CD138. Оценка комбинации только этих маркеров позволяет идентифицировать aberrантные ПК более чем в 90% случаев ММ. Однако, необходимо расширить диапазон исследования и охарактеризовать значимость других маркеров в первичной диагностике и в мониторинге минимальной остаточной болезни.

Обязательным является использование двух методов: морфологического и иммунофенотипического. Морфологический метод включает в себя подсчет миелограммы и описание плазматических клеток. Норма ПК в костном мозге составляет 0,1–1,8%. Иммунофенотипический метод проводят на цитометре FACSCantoII. Используется панель моноклональных антител и флуорохромов как для первичной диагностики, так и для оценки МОБ.

Первичный иммунофенотип опухоли характеризуем по экспрессии CD45, CD56, β 2-microglobulin, CD28, CD27, CD117, CD81 и CD19 в гейте CD138 и CD38, а также на основании клональности плазматических клеток по каппа (κ) или лямбда (λ) типам.

В настоящее время в лаборатории иммунологии гемопоэза по панели Еврофлюо для диагностики плазмноклеточных опухолей, нами проанализированы

100 образцов костного мозга из них 46 первичных, у 4-х из которых убедительных данных за множественную миелому не получено. В миелограмме клетки плазматического ряда обследуемых составили 2–10%.

Плазматические клетки первичных пациентов имели aberrантный иммунофенотип по экспрессии CD45, CD56 и CD19 и распределились следующим образом:

1. CD45-CD56+CD19- (22 пациента);
2. CD45-CD56+CD19+ (2 пациента);
3. CD45-CD56-CD19- (12 пациентов);
4. CD45+CD56+CD19- (6 пациентов).

Наиболее часто встречаемые aberrации поверхностных антигенов при ММ включали отрицательную экспрессию CD45 и CD19, высокую плотность CD56 и сниженную экспрессию CD38. Исходя из нашего исследования, 50% пациентов имели aberrантный иммунофенотип CD45-CD56+CD19-. Маркер CD56 являлся позитивным у 30 исследуемых пациентов с ММ. Плазматические клетки костного мозга в норме имеют иммунофенотип CD27+/CD28-, aberrантные клетки при множественной миеломе имеют иммунофенотип CD27-/CD28+. Соотношение κ/λ может помочь в прояснении атипичных случаев, когда анализ только поверхностных маркеров вызывает затруднения в интерпретации данных, при этом рестрикция легких цепей оценивается в выбранной опухолевой популяции ПК. Из 42 первично обследованных пациентов установлен kappa-тип у 28, lambda-тип у 14. Aberrантные клетки могут иметь сниженную экспрессию CD81, CD27 и экспрессировать CD117, что не наблюдается на нормальных ПК.

Стандартизация метода, единый протокол обследования и установление определенных временных точек необходимы в оценке и мониторинге МОБ на фоне лечения и для подтверждения полного ответа после проведенной терапии.

РОЛЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ CD117 В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ.

А.Д. Палладина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Актуальность и цели. Экспрессия CD117 играет важную роль в развитии лейкоза. Высокий уровень экспрессии CD117 на бластных клетках довольно часто обнаруживают при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ). CD117 (c-kit) представляет собой трансмембранный тирозинкиназный рецептор, который кодируется протоонкогеном c-kit. Он экспрессируется во многих тканях, включая кроветворные стволовые клетки. Лигандом к этому рецептору является фактор стволовых клеток (также известный как лиганд kit, фактор Стила или фактор роста тучных клеток). В нормальном костном мозге примерно от 2% до 4% мононуклеарных клеток экспрессируют CD117. Приблизительно 25% нормальных CD34+ клеток костного мозга одновременно экспрессируют и CD117.

По данным литературы, об экспрессии CD117 сообщается в более чем 50% случаев острых миелоидных лейкозов, но данный антиген редко встречается при острых лимфобластных лейкозах. Целью работы было доказательство необходимости рутинного использования анти-CD117 в иммунофенотипическом анализе лейкозов с целью последующего использования антигена при оценке минимальной остаточной болезни и оценка корреляции, в случае её наличия, между экспрессией CD117 и FAB классификацией.

Цель работы — оценить роль наличия или отсутствия на бластных клетках CD117 на диагностическом этапе и его корреляцию с FAB-вариантом лейкоза.

Материалы и методы. Среди 31 больного острым миелоидным лейкозом de novo, диагноз которых был верифицирован морфологически и цитохимически в соответствии с FAB- классификацией, были определены следующие варианты ОМЛ: M0 (3 больных), M1 (6 больных), M2 (4 больных), M3 (3 больных), M4 (2 больных), M5a (3 больных), M6 (2 больных), M7 (8 больных). Возраст детей колебался от 0,5 до 18 лет, медиана составила 3 года. Экспрессию CD117 поверхности бластных клеток в костном мозге больных определяли методом проточной цитофлюориметрии.

Результаты. Наши результаты согласуются с крупнейшими исследованиями, которые нашли CD117 в 60%–90% случаев ОМЛ. В результате изучения им-

мунофенотипического профиля бластных клеток установлено, что экспрессия CD117+ наблюдалась у 22 (71%) больных. При этом CD117 экспрессирован в 37,5% случаев варианта М7, в 33% случаев М5а, в 75% случаев при М2 и в 83,3% случаев при М1; при остальных вариантах CD117 был экспрессирован на более чем 20% бластов в 100% случаев.

Выводы. Планируя мониторинг минимальной остаточной болезни, необходимо проводить детальный иммунофенотипический анализ бластных клеток. Учитывая высокую частоту экспрессии маркера CD117 при острых миелоидных лейкозах и высокую его специфичность при миелоидных бластных клетках, целесообразно включение его в панели выявления МОБ.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ II–III СТАДИЙ.

В.Е. Пономарев¹, О.А. Чернышева², С.Б. Поликарпова¹, Я.В. Вишневская², А.Ю. Суворов³, В.Ю. Кирсанов¹, Е.А. Бозуш², Д.А. Горяинов², А.А. Офосуах¹, Н.Н. Тупицын²

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, Каширское шоссе, 24.

³ГБУЗ ГКБ №4 Департамента здравоохранения города Москвы, Россия 115093 Москва, ул. Павловская, д. 25

Актуальность. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) — популяция опухолевых клеток, которая оказалась в периферической крови в результате отделения от первичной опухоли и ее интравазации в лимфатические или кровеносные сосуды. ЦОК могут быть обнаружены с помощью жидкостной биопсии на ранних стадиях заболевания рака молочной железы (РМЖ), и их наличие коррелирует с высоким риском рецидивирования заболевания. Многочисленные клинические исследования установили прогностическое значение ЦОК на ранних стадиях РМЖ.

Цель исследования: определить частоту ЦОК у больных РМЖ II–III стадий и их взаимосвязь с клинико-морфологическими факторами.

Материалы и методы. В исследование вошли 47 больных РМЖ в возрасте от 28 до 77 лет (медиана — 51 год), находившихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2015–2017 годах. Определение ЦОК проводилось всем больным до начала лечения в лаборатории иммунологии гемопоза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ЦОК выявлялись иммунологически методом проточной цитометрии в 7,5 мл периферической крови. Окрашивание проводилось методом прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами к панлейкоцитарному антигену CD45, молекуле адгезии эпителиальных клеток EpCam (CD326) и цитокератинам 7 и 8 типов — Cam5.2 (Becton Dickinson, США). Подсчет окрашенных образцов проводился на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Анализ полученных данных проводился с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis (Beckman Coulter, США).

Результаты. Общая частота выявления ЦОК у больных РМЖ II–III стадий составила 85,1% (40 из 47). У больных местно-распространенным и первично-операбельным раком молочной железы циркулирующие опухолевые клетки методом проточной цитофлуориметрии выявлялись приблизительно с одинаковой частотой: у 21 из 24 (87,5%) и 19 из 23 больных (82,6%) соответственно, различия статистически недостоверны ($p = 0,7$). Частота прогрессирования в группе больных с ЦОК составила 10% (4 из 40 больных). Все эти пациенты имели III стадию РМЖ. При люминальном В Her-2/neu негативном подтипе РМЖ (53,2%) ЦОК в периферической крови выявлялись достоверно чаще, чем у больных с другими молекулярно-генетическими подтипами РМЖ ($p = 0,05$). В группе больных с выявленными ЦОК отмечена тенденция к увеличению опухолей со степенью дифференцировки G2 — 77,5%. Частота опухолей со степенью дифференцировки G3 составило 22,5% ($p = 0,08$). С остальными клинико-морфологическими характеристиками достоверной статистической значимости не выявлено.

Вывод. Наличие ЦОК в периферической крови у больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ свидетельствует о возможном первично-диссеминированном процессе. Определение ЦОК имеют взаимосвязь с некоторыми морфологическими характеристиками опухолей РМЖ, что требует проведение дальнейших исследований с большей выборкой.

GENOMIC ALTERATIONS IN *CIITA* ARE FREQUENT IN PRIMARY MEDIASTINAL LARGE B-CELL LYMPHOMA AND UNCOMMON FOR MULTIPLE MYELOMA.

A. Sergeeva, S. Kuznetsova, Y. Mangasarova, T. Obukhova, V. Surin

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation (Russia).

Introduction: The MHC Class II transactivator (*CIITA*) is a non-DNA binding protein factor that is recruited to the enhancer complex of MHC II genes. MHC class II expression is mainly restricted to antigen-presenting cells and is indispensable for the display of foreign antigens to CD4⁺ T cells. Reduced level of MHC class II expression is supposed to be an oncogenic mechanism of tumor adaptive immune escape.

It was recently demonstrated that *CIITA* genetic alterations in primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBCL) result in reduced *CIITA* and MHC class II expression (Anja Mottok et al., 2015). Moreover, multiple myeloma (MM) cells generally express low levels of the *CIITA* (Ghosh et al., 2001).

To study the mechanism of *CIITA* attenuation in primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBCL) and MM at the genetic level we carried out the sequencing analysis of MM and PMBCL patients diagnosed in our center.

Methods: We purified CD138⁺ cells of 26 MM patients from mononuclear cells using anti-CD138 antibodies according to the Miltenyi Biotec protocol for OctoMacs magnetic separator. We evaluated the resulting fraction with flow cytometry and used it for the genomic DNA (gDNA) extraction. We purified gDNA from total tumor tissue of 15 patients with PMBCL. We analyzed exon 1, intron 1 and IV promoter *CIITA* gene using Sanger sequencing.

Results: We performed the sequence analysis of 26 MM and 15 PMBCL primary diagnosed patients. To analyze the genetic aberrations we chose two regions of *CIITA* gene: one of them consists of the first exon and 5'-part of intron 1, second — IV promoter of *CIITA*. According to the recently published paper (Anja Mottok et al., 2015), these regions are affected by oncogenic cellular processes and might be a hallmark of tumor pathogenesis. We found 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in intron 1 which are recurrent in our cohort (data not shown). Somatic mutations (SMs) have been presented in 3 MM cases in intron/exon1 region of *CIITA* gene, all of them were single nucleotide replacements (Figure 1B). Then, we identified 8 SMs in intron/exon1 region, and 11 SMs in *CIITA* IV promoter in patients

with PMBCL. PMBCL SMs contained 14 nucleotide replacements and 5 deletions. We showed that most SMs had to *CIITA* IV promoter in PMBCL (Figure 1A).

Discussion and conclusion: According to our data, *CIITA* IV promoter is frequently affected by somatic mutagenesis in PMBCL (63,6%, N = 11). The mutagenesis results in sequence disruptions of *CIITA* IV promoter by nucleotide changes and deletions. Exon 1 and 5'-end of intron 1 are mutated in PMBCL and rare in MM (58,3% vs. 11,5%). Probably we observe the same mechanism for both diseases here, however MM is less affected by AID-mediated aberrant somatic hypermutation (Anja Mottok et al., 2015).

CIITA IV promoter doesn't have any genetic changes in MM. B cells repress *CIITA* by the PRDI-BF1/Blimp-1 undergoing terminal differentiation into plasma cells (Ghosh N. et al., 2001). We think that *CIITA* natural repression is kept in MM to have lack of MHC II in tumor cells.

A digit into a cell indicates a number of mutations within the region either IV promoter or 1st exon and 5'-part of 1st intron. «N» means a normal genotype. «-» means that is not analyzed. A) 15 PMBCL cases are described in the table. Somatic mutations are divided into 2 categories: nucleotide replacement and deletion. B) 26 MM cases are described in the table.

FEATURES OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD B LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

Svetlana Vasilievna Chulkova^{1,2}, Lyudmila Yuryevna Grivtsova¹,
Elena Nikolaevna Sholokhova¹, Nikolay Nikolayevich Tupitsyn¹

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

²*N.I. Pirogov Russian National Research Institute, Ministry of Health of Russia, Moscow*

Purpose To study the B-cell humoral immunity in patients with gastric cancer.

Materials and methods The study included 50 patients with gastric cancer. The average age of the patients was 59 years, the study was dominated by women. Subpopulations of B lymphocytes were studied in a direct immunofluorescence reaction using a triple fluorescent label. Expression of the following antigens was analyzed: CD20, CD21, CD23, CD38, HLA-DR, CD71, CD10, CD95, CD25, CD5, CD56, IgG- λ and IgG- κ immunoglobulin light chains.

Keywords B-lymphocytes, cells of the margin, the pattern of antigens, humoral immunity, stomach cancer.

Results A study of subpopulations of peripheral blood B lymphocytes in patients with gastric cancer found that all B cells had the immunophenotype of naive, mature B2 cells: CD19+CD20+HLA-DR+CD10-CD21low/+. The histological unit, which is the site of B2-cell concentration, is the lymphoid follicle. These cells make up the vast majority of circulating B lymphocytes. B2 cells undergo selection in the bone marrow and are involved in the formation of an adaptive humoral immune response to thymus-dependent antigens. In some patients, transient T2B and T3B cells were noted. They are characterized by a pronounced expression of CD23, CD21. The number of CD23+ cells varied from 25 to 40% in different patients. At the same time, as a rule, CD23+ B cells had weaker antigen expression of mature CD20 cells. In 40% of cases, coexpression of CD23 was more than 25%, and in 22.4% of patients, the number of CD23+ B cells exceeded 40% of B cells. In some patients, a small amount of CD23+ B cells was observed. Under normal conditions, CD19+CD21lowCD23- B-cell (T1) undergoes a positive selection in the process of B-cell ontogenesis. Patients with gastric cancer revealed the presence of a significant number of B-cells with a weak level of expression of CD21+. This phenotype corre-

sponds to the T1 transient stage of B-cell development. The expression of CD21 antigen was characteristic of a larger number of B cells and averaged 82%.

Selection of transient T2B and T3B cells, characterized by a pronounced expression of CD23 and CD21 antigens, takes place in peripheral lymphoid organs (spleen, lymph nodes). Expressed expression of the CD23 antigen is characteristic of the B cells of the embryonic center of the follicle. Follicular B-cells, which constitute the majority and B-cells of the marginal zone, express high levels of IgM, IgD, CD23, lower levels of CD21. These cells lack CD1 or CD5, which distinguishes them from B1 cells and B cells of the marginal zone.

Conclusion Thus in patients with gastric cancer an interruption of the immunological repertoire of B2 cells was established: the presence of a pronounced proportion of CD21+ B cells with weak expression, a significant number of CD23+ cells, cases of clonal B cells. In most of the studied samples, B cells were polyclonal with a predominance of Ig- κ . When implementing the thymus-dependent pathway of the immune response in such patients, there will be an interruption of antibody production.

ВЛИЯНИЕ ГЕМАТОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ НА ПРОГНОЗ ПРИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ У ДЕТЕЙ.

*Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Н.Н. Тупицын, И.Н. Серебрякова,
В.В. Тимошенко, Т.В. Шведова*

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им
Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Российская Федерация*

По сходности морфологической картины до 50% солидных злокачественных новообразований детского возраста составляют мелкокруглоклеточные опухоли. В эту группу входят: нейробластома, ретинобластома, опухоли семейства саркомы Юинга, рабдомиосаркома, некоторые варианты остеосаркомы.

Признаки отдаленных метастазов при солидных опухолях у детей выявляется у 10–30 % пациентов во время первичной диагностики. Дополнительно у 15–20% детей гематогенное метастазирование развивается в различные сроки от начала лечения. Показатели общей и безрецидивной выживаемости среди пациентов с диссеминированными стадиями солидных опухолей, существенно ниже по сравнению с этими данными при локализованных стадиях. Общая 5-летняя выживаемость в зависимости от гистологического типа опухоли составляет 20–70%. При гематогенном метастазировании поражаются различные органы, но в большинстве случаев, метастазы обнаруживают в легких.

Обнаружение опухолевых клеток в костном мозге свидетельствует о системном характере солидных опухолей у детей. Цитологическое исследование костного мозга является рутинной практикой при первичной диагностике злокачественной опухоли у ребенка. При этом важность своевременной диагностики метастазов злокачественных опухолей в костный мозг у детей обуславливает следующие факторы: влияние на стадирование и выбор лечебной тактике — больные распределяются в группу высокого риска. При этом частота обнаружения метастазов при цитологическом исследовании костного мозга различна и зависит от нозологической формы. Наиболее часто костный мозг поражается при нейробластоме — до 49% и до 11% — при ретинобластоме, а при остеосаркоме — это крайне редкое событие.

Разработка эффективных программ лечения пациентов с диссеминированными опухолями является приоритетной задачей детской онкологии. Успешная реализация этой задачи тесно связана с ранней и комплексной диагностикой всех возможных регионов метастазирования.

АНАЛИЗ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ РАЗВИТИИ РАБДОМИОСАРКОМЫ У ДЕТЕЙ

О.П. Колбацкая¹, Т.В. Горбунова², И.Н. Серебрякова²,
С.В. Чулкова¹, Н.Н. Тупицын¹

¹НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
лаборатория иммунологии гемопоэза,

²НИИ ДОиГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Обоснование: Костный мозг (КМ) является центральным органом гемопоэза и иммунопоэза, и развитие злокачественных неоплазий находит свое отражение в изменении субпопуляционного состава цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) КМ (1). Среди современных литературных источников мало данных о количестве ЦТЛ КМ в норме и при развитии гемобластозов, солидных опухолей и мелкокруглоклеточных сарком, в частности, рабдомиосаркомы (РМС) (2).

Материалы и методы: в исследование были включены 16 больных РМС в возрасте от 1 года до 15 лет (средний возраст — 6,8 года), мальчиков и девочек было по 8 человек, диагноз был верифицирован морфологическим и иммуногистохимическим методами. Мы сравнили относительное и абсолютное содержание ЦТЛ у больных с благоприятной (орбита, поверхностные области головы и шеи, матка) и неблагоприятной (туловище, конечности, мочевого пузыря, простата, брюшная и грудная полости) в прогностическом плане локализацией первичной опухоли при диагностике.

Результаты: выявлено достоверное повышение абсолютных количеств CD3+ ($19,5 \pm 2,4$ тыс/мкл против $6,4 \pm 1,9$ тыс/мкл, $p = 0,006$), CD3+CD2+ ($29,5 \pm 3,0$ тыс/мкл против $9,5 \pm 3,8$ тыс/мкл, $p = 0,013$), CD3+CD8+ ($16,3 \pm 2,2$ тыс/мкл против $5,4 \pm 1,4$ тыс/мкл, $p = 0,003$), CD8+HLA-DR+ ($4,4 \pm 1,6$ против $1,7 \pm 0,3$ тыс/мкл, $p = 0,017$), CD5+ ($19,8 \pm 2,5$ тыс/мкл против $5,6 \pm 1,8$ тыс/мкл, $p = 0,002$), TCR $\alpha\beta$ ($24,9 \pm 1,6$ тыс/мкл против $8,2 \pm 3,5$ тыс/мкл, $p = 0,018$) и TCR $\gamma\delta$ ($4,1 \pm 0,8$ тыс/мкл против $1,3 \pm 0,4$ тыс/мкл, $p = 0,005$) лимфоцитарных субпопуляций у пациентов с благоприятной прогностической локализацией опухоли. Относительное содержание данных субпопуляций у сопоставляемых групп пациентов не различалось.

Заключение: каждая клинико-прогностическая группа пациентов характеризуется специфическими особенностями субпопуляционного состава

ЦТЛ, что может позволить лучше понимать механизмы взаимодействия РМС и иммунной системы пациента, совершенствовать методы противоопухолевой терапии и разработать протоколы иммунотерапии для улучшения общей и безрецидивной выживаемости больных РМС (3).

Ключевые слова: детская онкология, костный мозг, цитотоксические Т-лимфоциты, рабдомиосаркома

ЛИТЕРАТУРА

1. Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, Mahnke YD, Limmer A, Hommel M. et al. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat. Med.* – 2003 – Sep; 9(9) – P. 1151–7. doi: 10.1038/nm914.
2. Pappo AS, Dirksen U. Rhabdomyosarcoma, Ewing Sarcoma, and Other Round Cell Sarcomas. *J. Clin Oncol.* 2018 Jan 10; 36 (2) 168–179.
3. Focosi D, Bestagno M, Barrone O, Petrini M. CD57+ T-lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leucoc Biol* 2010; 87: 107–16 doi: 10.1189/jlb.0809566.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ VEGF И ИХ РЕЦЕПТОРОВ VEGFR У ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ: КОРРЕЛЯЦИЯ С ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ

Н.Н. Калитин¹, Н.С. Кострица², Г.А. Дудина³, А.Ф. Карамышева¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

²ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

³ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логанова» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных гематологических опухолей, объединяемых общим происхождением из стволовой гемопоэтической клетки и характеризующихся неэффективным гемопоэзом. Лечение пациентов с МДС пока еще остается нерешенной проблемой. Факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) — известные регуляторы нормального ангиогенеза и неоангиогенеза при злокачественной трансформации. Известно, что опухолевые клетки продуцируют факторы роста VEGF, а их рецепторы (VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3) могут быть экспрессированы также и в клетках злокачественных опухолей, в том числе в клетках гемобластозов. Роль связанных с VEGF сигнальных систем в патогенезе МДС практически не исследована.

Цель работы. Исследование возможной роли факторов роста VEGF и их рецепторов VEGFR в развитии миелодиспластических синдромов (МДС).

Материалы и методы. В работе были исследованы образцы периферической крови 55 больных МДС. В выделенной из образцов крови мононуклеарной фракции клеток методом полимеразной цепной реакции в реальной времени (Real-Time PCR) была исследована экспрессия генов VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D и их рецепторов VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3. Больные МДС были разделены на группы, различающиеся по содержанию бластных клеток. В каждой из групп сравнивали экспрессию VEGF и их рецепторов в подгруппах живых и умерших больных МДС.

Результаты. Больные МДС были разделены на 2 основные группы в зависимости от количества бластных клеток. Группа больных с количеством бластных клеток $> 5\%$ состояла из 26 человек (группа 1), из которых в настоящее время живы 5. Группа больных с количеством бластных клеток $< 5\%$ состояла из 29 человек (группа 2), из которых живы 11. В группе 1 статистически значимых различий в экспрессии факторов роста и их рецепторов между умершими и живыми пациентами с МДС найдено не было, хотя отмечалось снижение экспрессии VEGF-C, VEGF-D, VEGFR2 и VEGFR3 в подгруппе умерших. В группе 2 у умерших больных МДС по сравнению с живыми статистически достоверно ($p < 0,01$) была повышена экспрессия VEGF-A (21,43 и 9,63) и VEGFR1 (7,66 и 1,76).

Выводы. Повышенная экспрессия генов VEGF-A и VEGFR1 в группе больных МДС с количеством бластных клеток $< 5\%$ может указывать на неблагоприятный прогноз дальнейшего развития заболевания для пациентов этой группы.

«ПОТЕНЦИАЛ ОПУХОЛЕВЫХ НЕОАНТИГЕНОВ В ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ»

В.С. Косоруков

*НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
директор института ЭДИТО*

ТЕЗИСЫ К ДОКЛАДУ.

Достаточно часто развитие опухолевого процесса сопровождается нарастанием количества различных генетических мутаций в раковых клетках. Клетки в процессе развития опухоли накапливают много мутаций соматических генов, как правило, не имеющих прямого воздействия на опухолевый процесс. В результате таких генетических мутаций в опухолевых клетках образуются антигены, специфичные только для клеток опухоли и отсутствующие в нормальных тканях. Они получили название «неоантигены». Такие неоантигены могут быть высоко иммуногенными и рассматриваются в качестве молекул-мишеней, воздействие на которые может привести к отторжению опухоли. В свое время было обнаружено, что у ряда онкологических больных с опухолями, отличающимися высокой генетической нестабильностью, при лечении с помощью адоптивной иммунотерапии развивался сильный Т-клеточный иммунный ответ против неоантигенов. Эти мутации были в большинстве случаев уникальны для каждого конкретного пациента. С повышением доступности NGS секвенирования для детекции всех мутаций в опухолях и появлением специализированных биоинформационных алгоритмов стало возможным использование феномена неоантигенов в терапии опухолей с последующей активацией иммунного ответа.

В современном понимании проблемы неоантигены являются перспективными мишенями для персонализированных противоопухолевых вакцин, позволяющих целенаправленно контролировать опухоль, не задевая нормальные ткани. Пока на сегодняшний день недостаточно клинических испытаний для того, чтобы сделать объективный вывод об их эффективности, но работы активно ведутся как за рубежом, так и в России. Проведенные разными группами исследования имеют много общих черт, подтверждая, что для эффективного контроля опухоли одного метода терапии неоантигенными пептидными или РНК-вакцинами недостаточно. Использование в противоопухолевых неоантигенных вакцинах иммуностимулирующих или иммуномодулирующих адъювантов, которые преодолевают толерантность опухолевого микроокружения и

вызывают мощный противоопухолевый иммунный ответ, может обеспечить эффективность вакцинотерапии. Также требуют прояснения и оптимизации практические вопросы производства и применения персонализированных вакцин со стороны регулирующих нормативных актов.

Федеральное Государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский медицинский центр онкологии имени
Н.Н. Блохина» Минздрава России

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia

XVIth International Conference Haematopoiesis Immunology

Модератор: профессор Джордж Джаносси

Moderator: Professor George Janossy, United Kingdom

Тбилиси, 5–7 июня, 2019

Tbilisi, June 5–7, 2019

ПРОГРАММА/PROGRAM

ДАТА / DATE: 5 ИЮНЯ, 2019 / JUNE 5, 2019

Регистрация / Registration — весь день / all day

14.00–14.20 Открытие конференции/Opening Ceremony

Приветственное слово / Welcoming address

Профессор Джордж Джаносси, Великобритания / Professor George Janossi, United Kingdom

*Профессор Н.Н. Тупицын, д.м.н., заведующий лабораторией
иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
МЗ РФ / Professor N.N. Tupitsyn Head of Haematopoiesis Immunology
Lav. N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry
of Health of Russia*

**СЕКЦИЯ: «ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ» /
«GENERAL QUESTIONS OF IMMUNOLOGY»**

*Председатели / Chairpersons: Профессор З.Г. Кадагидзе, Профессор
В. Юрисич (Сербия) / Professor Z.G. Kadagidze (Russia), Professor Vladimir
Jurisic (Serbia)*

14.20–14.40 Профессор З.Г. Кадагидзе «Предикторы клинического использования ингибиторов контрольных точек иммунитета» (Россия) / Professor Z.G. Kadagidze «Predictors of the clinical use of check points inhibitors of immunity» (Russia)

14.40–14.55 К.Н. Мелкова, Ж.В. Шароян «Клиническая значимость репертуара NK-клеток у онкологических больных» (Россия) / K.N. Melkova, J.V. Sharoyan «The clinical significance of the repertoire of NK cells in cancer patients» (Russia)

14.55–15.15 Профессор Жан-Франсуа Росси «Тромбозы при гемобластозах: от теории к практике» (Франция)/Professor Jean-Francois Rossi «Thrombosis in hematological malignancies: from bench to bedside» (France)

15.15–15.35 В. Юрисич «Функции NK-клеток при миеломе» (Сербия) / Vladimir Jurisic «NK cell function in myeloma» (Serbia)

15.35–15.45 В.А. Мисюрин*, А.В. Пономарев, А.А. Турба, А.Е. Мисюрина, В.В. Тихонова, Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, О.В. Солопова, А.В. Мисюрин «Иммунорегуляторный индекс у больных с дисфункцией В-клеточного звена иммунитета» (Россия) / V.A. Misyurin*, A.V. Ponomarev, A.A. Turba, A.E. Misyurina, V.V. Tikhonov, Yu.P. Finashutin, N.A. Lyzhko, O.V. Solopova, A.V. Misyurin «Immunoregulatory index in patients with dysfunction of B-cell immunity» (Russia)

15.45–15.55 В.С. Косоруков «Потенциал опухолевых неоантигенов в иммунотерапии онкологических заболеваний» (Россия) / V.S. Kosorukov «The potential of tumor neoantigens in immunotherapy of oncological diseases» (Russia)

ДАТА/DATE: 6 ИЮНЯ, 2019/ JUNE 6, 2019

**СЕКЦИЯ /SECTION: / «СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ»/
«STEM CELLS»**

**Председатели / Chairpersons Профессор М.А. Френкель (Россия),
Профессор Б. Гувенч (Турция), Профессор О.А. Рукавицын (Россия) /
M.A. Frenkel (Russia), Professor B. Guvenc (Turkey), Professor
O.A. Rukavitsyn (Russia)**

9.00–9.20 Профессор М.А. Френкель «Стволовые клетки — мишени гемобластозов» (Россия) / Professor M.A. Frenkel «Stem cells — targets of hemoblastosis» (Russia)

9.20–9.40 Профессор Бирол Гювенч (Турция) / Professor Birol Guvench (Turkey) — report will be confirmed

9.40–10.00 Л.Ю. Гривцова «Субпопуляции мобилизованных аутологических и аллогенных гемопоэтических стволовых клеток: трансплантация в онкологической практике» (Россия) / L.Y. Grivtsova «Subpopulations of mobilized autologous and allogeneic hematopoietic stem cells: transplantation in oncological practice» (Russia)

10.00–10.20. С.В. Чулкова «Стволовые опухолевые клетки» (Россия) / S.V. Chulkova «Cancer stem cells» (Russia)

10.20–10.40 Кофе-брейк / COFFE BREAK

СЕКЦИЯ / SECTION: «ИММУНОДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ» / «IMMUNODIAGNOSTICS AND IMMUNOTHERAPY»

Председатели / Chairpersons Профессор Жан-Франсуа Росси (Франция), Профессор Н.Н. Тупицын (Россия) / Professor Jean-Francois Rossi (France), Professor N.N. Tupitsyn (Russia)

10.40–11.00 Профессор Роберт Гейл «Иммунотерапия сарком» Великобритания / Professor Robert Gale «Immunotherapy of sarcomas» (UK)

11.00–11.15 Профессор Н.Н. Тупицын (Россия) / Professor N.N. Tupitsyn (Russia) — report title will be confirmed

11.15–11.30 О.А. Чернышева «Диагностика острых лимфобластных лейкозов как основа мониторинга минимальной остаточной болезни» (Россия) / O.A. Chernysheva «Diagnosis of acute lymphoblastic leukemia as the basis for monitoring minimal residual disease» (Russia)

11.30–11.40 А.М. Сергеева* (Россия) «Альтерации СИТА при В крупно-клеточной лимфоме средостения и неспецифичные при множественной миело-

ме» / *A.M. Sergeyeva «Genomic alteration in CITA frequent in mediastinal large B-cell lymphoma and notspecified for multiple myeloma» (Russia)*

11.40–11.50 А.Д. Палладина* «Роль определения CD117 в диагностике острых миелоидных лейкозов у детей» (Россия) / *A.D. Palladina* «The role of determining CD117 in the diagnosis of acute myeloid leukemia in children» (Russia)*

11.50–12.05 В.Н. Двирнык «Принципы диагностики системного мастоцитоза. Разбор клинического случая» (Россия) / *V.N. Dvirnykh «Systemic mastocytosis diagnostics principals. Clinical case report» (Russia)*

12.05–12.15 Кофе-брейк / *COFFE BREAK*

СЕКЦИЯ /SECTION: «СОЛИДНЫЕ ОПУХОЛИ» / «SOLID TUMORS»

Председатели/ Chairpersons: Профессор Жан-Франсуа Росси (Франция), Профессор Н.Н. Тупицын (Россия) / Professor Jean-Francois Rossi (France), Professor N.N. Tupitsyn (Russia)

12.15–12.25 В.Е. Пономарев*, О.А. Чернышева, С.Б. Поликарпова, А.Ю. Суворов, В.Ю. Кирсанов, Е.А. Богуш, Д.А. Горяинов, А.А. Офосуах, Н.Н. Тупицын «Циркулирующие опухолевые клетки у больных раком молочной железы II–III стадий» (Россия) / *V.E. Ponomarev*, O.A. Chernysheva, S.B. Polikarпова, A.Yu. Suvorov, V.Yu. Kirсанov, E.A. Bogush, D.A. Goryainov, A.A. Ofosuakh, N.N. Tupitsyn «Circulating tumor cells in patients with stage II–III breast cancer» (Russia)*

12.25–12.45 Профессор Клаус Пантель (Гамбург) / *Professor Klaus Pantel (Hamburg) — report will be confirmed*

12.45–13.05 Профессор К. Аликс-Панабьер (Франция) / *Associate Professor K. Alix-Panabieres (France) — report will be confirmed*

13.05–13.15 Д.А. Рябчиков «Диссеминированные опухолевые клетки у больных люминальным раком молочной железы — перспективные маркеры прогноза» (Россия) / *D.A. Ryabchikov «Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer are promising markers of prognosis» (Russia)*

13.15–13.35 Профессор Сахин Берксой (Турция) / *Professor S. Berksoy (Turkey) «Immunotherapy in metastatic colorectal cancer».*

13.35–13.45 M. Vascellari*, A. Facchinetti, L. Marconato, C. Zanardello, E. Rossi, C. Podggiana, Kevin Leone, P. Laganga, R. Zamarchi (Italy) — report will be confirmed

13.45–14.00 Д.М. Белов, Н.Н. Тупицын, Н.В. Севян, В.Б. Карахан «Клиническое использование проточной цитометрии у больных с церебральными метастазами злокачественных опухолей» (Россия) / D.M. Belov, N.N. Tupitsyn, N.V. Sevyan, V.B. Karakhan «Clinical use of flow cytometry in patients with cerebral metastases of malignant tumors» (Russia)

14.00–14.10 ВОПРОСЫ, ДИСКУССИЯ / QUESTIONS, DISCUSSION

Обед / Lunch

Продолжение секции по иммунодиагностике /
Continuation, Immune diagnosis section

15.00–15.10 Е.Б. Рыбкина* «Диагностика ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы методом проточной цитометрии» (Россия) / E.B. Rybkina «Diagnosis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma using flow cytometry» (Russia)

15.10–15.20 К.А. Матохина* «Особенности диагностики ОМЛ с моноцитарной дифференцировкой» (Россия) / K.A. Matokhina «Features of AML diagnosis with monocytic differentiation» (Russia)

15.20–15.30 Д.Г. Дрокова* «Опухоль из бластных плазмацитоидных дендритных клеток. Представление клинических случаев» (Россия) / D.G. Drokova «Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. Presentation of clinical reports» (Russia)

15.30–15.45 О.П. Колбацкая «Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у детей с мелкокруглоклеточными опухолями» (Россия) / O.P. Kolbatskaia «Lymphocyte subpopulations of bone marrow in children with small-round cell sarcomas» (Russia)

15.45–16.00 Т.В. Горбунова «Гематогенное метастазирование солидных опухолей у детей». (Россия) / T.V. Gorbunova «Hematogenous metastasis of solid tumors in children». (Russia)

Свободное время. Экскурсия по Тбилиси / Free time, excursion in Tbilisi

ДАТА/DATE: 7 ИЮНЯ, 2019 / JUNE 7, 2019

**СЕКЦИЯ / SECTION: «ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ
ГЛИКАНЫ И АНТИГЛИКАНЫ»**

***Председатели / Chairmen: Профессор Н.В. Бовин (Россия),
Н.В. Шилова (Россия) / Professor N.V. Bovin (Russia), N.V. Shilova
(Russia)***

9.00–9.20 Профессор Н.В. Бовин «Истинная специфичность антител человека, известных как «анти-TN» (Россия) / Professor N.V. Bovin «The true specificity of human antibodies known as «anti-TN» (Russia)

9.20–9.40 Профессор У. Галили «Аутологичные противоопухолевые вакцины с применением альфа-гал гликолипидов» (США, Чикаго) / Professor U. Galili «Autologous antitumor vaccines using alpha-gal glycolipids» (USA, Chicago)

9.40–10.00 М. Хуфлейт (Польша) / M. Huflejt (Poland) — report will be confirmed

ВОПРОСЫ, ДИСКУССИЯ / QUESTIONS, DISCUSSION

*Общая дискуссия, выработка проекта решения конференции, подведение итогов конкурса молодых ученых (участники отмечены *) / General discussion*

Обед / LUNCH

Закрывание конференции / Closing the Conference