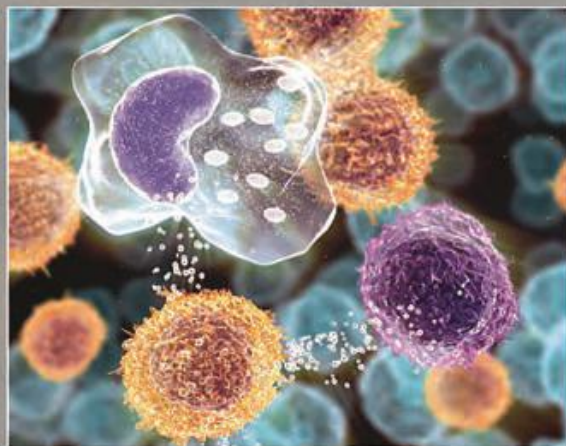


ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HAEMATOPOÏESIS
IMMUNOLOGY

И 1/2015



ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
1/2015 том 13

Учредитель: РОНЦ им. Н.Н. Блохина
(лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРА Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY
Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турнянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошь (Франция)
Дж. Вижденес (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)
А.А. Михайлова (Москва)
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)
А.А. Ярилин (Москва)

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 коммуникаций 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 28.05.2015. Формат 60×90/16.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Печать офсетная.
Уч.-изд. листов 7. Тираж 1000 экз.
Подписной индекс № 36915
Отпечатано в типографии «ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»
Тираж 1000 экз.

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

HEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
1/2015 vol. 13

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Russian Federation (Hematopoiesis Immunology Laboratory)

EDITORS-IN-CHIEF N.N. TUPITSYN, G. JANOSSY
Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.G. Turnianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtsova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
A.A. Mikhailova (Moscow)
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 (Lipetzck)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

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 «PRACTICAL MEDICINE»
Print run 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal
Hematopoiesis immunology
Coordinator: E.G. Turnyanskaya. Design: B.B. Krukov

ОГЛАВЛЕНИЕ

От редактора	4
<i>Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Гривцова, Н.А. Купрышина</i>	
ИММУНОДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕЙ КРОВИ НА ОСНОВАНИИ МНОГОЦВЕТНЫХ (8 ЦВЕТОВ ПАНЕЛЕЙ) ЕВРОПЕЙСКОГО КОНСОРЦИУМА ПО ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ (EURO-FLOW)	31
<i>И.С. Долгополов, Г.З. Чкадуа, Г.Л. Менткевич</i>	
РОЛЬ И МЕСТО ИММУНОТЕРАПИИ В ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ: НЕКОТОРЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ	63
<i>Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын</i>	
СУБПОПУЛЯЦИИ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК: ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОБИЛИЗАЦИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВЕТВОРЕНИЯ ПОСЛЕ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ	79
<i>Ф.А. Шамилов, Н.Н. Тупицын, И.К. Воротников, Я.А. Вишневская, Н.А. Козлов, В.Ю. Сельчук</i>	
ПОЛИОКСИДОНИЙ В ПРЕДОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. ПОЛНАЯ РЕГРЕССИЯ ОПУХОЛИ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ	101
<i>Е.С. Обаревич, В.А. Горбунова, Н.С. Бесова, М.М. Давыдов, Н.Н. Тупицын</i>	
КОСТНЫЙ МОЗГ БОЛЬНЫХ ДИССЕМНИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА. (КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ).....	113
[Тезисы]	
<i>И.В. Буравцова, М.Н. Костюкова, Н.Н. Калитин, А.К. Голенков, Н.Н. Тупицын, А.Ф. Карамышева</i>	
ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК CD138 И РЕЦЕПТОРА ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ VEGFR3 У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ: КОРРЕЛЯЦИЯ С ПРОГНОЗОМ	120

CONTENTS*Jean-François Rossi MD PhD*

HOW TO IMPROVE ACTIVITY OF EFFECTOR CELLS FOR IMMUNE THERAPY AGAINST CANCER?	8
-------------------------------------------------------------------------------------------	----------

N.N. Tupitsyn, L.Yu. Gritsova, N.A. Kupryshina

HAEMATOPOIETIC MALIGNANCIES IMMUNE DIAGNOSTICS BASED ON EUROFLOW CONSORTIUM PROPOSALS: 8-COLOR FLOW CYTOMETRY	31
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

I.S. Dolgoplov, G.Z. Chkadua, G.L. Mentkevich

DOES IMMUNOTHERAPY PLAY ROLE IN THE TREATMENT OF PEDIATRIC CANCER: SOME CLINICAL OBSERVATIONS.....	63
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

L.Yu .Gritsova, N.N. Tupitsyn

HAEMATOPOIETIC STEM CELL SUBPOPULATIONS: MOBILIZATION EFFICACY AND HEMATOPOIESIS RESTORATION AFTER HIGH DOSE CHEMOTHERAPY AND STEM CELL TRANSPLANTATION IN CANCER PATIENTS	79
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

F.A. Shamilov, N.N. Tupitsyn, I.K. Vorotnikov, Ya.A. Vyshnevskaya, V.Yu. Selchuk

IMMUNE MODULATOR POLYOXIDONIUM IN PREOPERATIVE TREATMENT OF BREAST CANCER. CASE REPORT OF COMPLETE TUMOR REGRESSION DURING NEO-ADJUVANT IMMUNOTHERAPY	101
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

E.S. Obarevich, V.A. Gorbunova, M.M. Davydov, N.N. Tupitsyn

BONE MARROW IN PATIENTS WITH DISSEMINATED GASTRIC CANCER	113
-----------------------------------------------------------------------	------------

ОТ РЕДАКТОРА

Настоящий номер журнала будет, несомненно, интересен для читателя.

Мы продолжаем публиковать материалы законченных диссертационных работ, выполненных в лаборатории. Это — докторская Л.Ю. Гривцовой, а также кандидатская Ф.А. Шамилова.

Серьезным прорывом в понимании особенностей мобилизации и трансплантации субпопуляций стволовых гемопоэтических клеток в онкологии явилась работа Л.Ю. Гривцовой, некоторые важные разделы которой опубликованы в журнале.

Традиционным направлением работы лаборатории является исследование интратуморальных лимфоцитов, ряд субпопуляций которых имеют важное влияние в прогнозе рака молочной железы. Впервые установленные в докторской диссертации Е.А. Артамоновой в 2003 г. (опубликованы на русском и английском языках в «Иммунологии гемопоэза/Haematopoiesis Immunology» [1]), эти положения в дальнейшем получили серьезное развитие. В настоящее время они общепризнаны и рассматривались на ASCO (США) в мае 2014 г. (заседание по раннему раку молочной железы) и специальной сессии ESMO в сентябре 2014 г. Приятно осознавать приоритет российских ученых в столь престижных направлениях научных исследований. Стремление повлиять на субпопуляционный состав интратуморальных лимфоцитов (усилить инфильтрацию CD8⁺ лимфоцитами) с помощью полиоксидония привело к неожиданным результатам – высокой частоте иммуно-опосредованного патоморфоза вплоть до полной регрессии опухоли (Ф.А. Шамилов).

Стремительный прогресс наблюдается в области иммунодиагностики гемобластозов. Создание 8-цветных панелей моноклональных антител явилось результатом 6-летней работы консорциума ЕвроФлоу. Эта концепция нашла широкое применение в странах Европы, а в России пока еще не получила распространения. С опытом зарубежных стран участников конференции ознакомит Дезире Маер (Германия). В журнале на конкретных примерах, охватывающих почти весь спектр онкогематологической патологии, рассмотрены 8-цветные панели Еврофлоу. Их применение, несомненно, повысит точность диагностики, а, следовательно, и результативность лечения лейкозов и лимфом в нашей стране.

На одноименной конференции в Рыбинске собираются ведущие эксперты в области проточной цитометрии из Москвы, Санкт-Петербурга, Екатеринбург, Ижевска, Иркутска и ряда других городов России с тем, чтобы критически рассмотреть и рекомендовать к использованию панели Еврофлоу.

Клетки врожденного иммунитета, присутствующие в костном мозге, их противоопухолевый потенциал давно привлекают внимание ученых онкоцентра. основополагающие работы Г.И. Дейчман, клинические протоколы по применению аллогенного костного мозга при остеогенной саркоме

(Н.Н. Трапезников), и, наконец, работа Т.В. Горбуновой, проведенная с целью оценки роли костного мозга при саркомах у детей, дают новые ориентиры к движению. Установленная роль особой субпопуляции TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов костного мозга ставит перед клиницистами со всей определенностью вопрос о необходимости создания протокола по предотвращению легочных метастазов ряда сарком на основе стимуляции популяции TCR $\gamma\delta$ -клеток. Эти проблемы детально освещены в статье и докладе профессора Jean-Francois Rossi (Франция). Возможности использования аллогенного костного мозга представит зав. отделением трансплантации РОНЦ К.Н. Мелкова. Статья И.С. Долгополова и соавт. демонстрирует возможности иммунотерапии в детской онкологии.

И, наконец, традиционный раздел конференции — поражение костного мозга при раке. Новые данные за истекший год получены при диссеминированном раке желудка, при раке предстательной железы и ряде других локализаций, что будет отражено в материалах конференции и журнале.

Хочется особенно поблагодарить английского редактора журнала профессора G. Janossy, который активно участвует и в работе журнала, и в конференции. Его присутствие на конференции в Рыбинске, советы по правильной организации и планированию повестки дня являются для нас бесценными.

Так что читателя ждет интересный журнал, а участников конференции — интересные доклады и дискуссии.

Главный редактор журнала
заслуженный деятель науки России
профессор, д.м.н.

Н.Н. Тутицын

1. *Artamonova E.V.* The role of tumor cell immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of breast cancer / *Haematopoiesis Immunology*. — 2009. — V. 6., № 1. — P. 8–51.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ — антиген
 аллоТГК — аллотрансплантация гематopoэтических клеток
 Ауто-, алло-ТКМ — аутологичная или аллогенная трансплантация клеток костного мозга или мобилизованных стволовых клеток периферической крови
 БРВ — безрецидивная выживаемость
 БСВ — бессобытийная выживаемость
 БК МПН — бластные кризы миелопролиферативных новообразований
 ДОК-КМ — диссеминированная опухоль клеток в костном мозге
 ИГ — иммуноглобулин
 ИФА — иммуноферментный анализ
 ИФТ — иммунофенотипирование
 ЛАФ — лейкоз-ассоциированные фенотипы
 ЛДГ — лактатдегидрогеназа
 ЛПЗ — лимфопролиферативные заболевания
 ЛСК — лейкозные стволовые клетки
 МДС — миелодиспластические синдромы
 МК — моноклональный компонент
 МКА(Т) — моноклональные антитела
 ММ — множественная миелома
 МНК — мононуклеарные клетки
 МОБ — минимальная остаточная болезнь
 МПО — миелопероксидаза
 МПЦ — мультипараметрическая проточная цитометрия
 МРБ — минимальная резидуальная болезнь
 НХЛ — неходжкинская лимфома
 НЭ — α -нафтил-ацетат-эстеразы эфир
 ОМЛ — острый миелолейкоз
 ПЦ — проточная цитометрия
 РА — рефрактерная анемия
 РБ — резидуальная болезнь
 РМЖ — рак молочной железы
 РЛ — разнице логарифмов
 СКПК — стволовые клетки периферической крови
 кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция
 КМ — костный мозг
 РИФ — реакция иммунофлуоресценции
 ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз
 ПГЭ — профиль генной экспрессии
 ПК — плазматические клетки
 ПМЭ — полиморфные элементы
 ПР — полная ремиссия
 ПЦ — проточная цитометрия
 ПЦР — полимеразная цепная реакция
 СОЭ — скорость оседания эритроцитов
 СРБ — С-реактивный белок
 ТПЛ — тумор-пенетрирующие лимфоциты
 ФТС — фетальная телячья сыворотка
 β -ХЛЛ — В-клеточный хронический лимфолейкоз
 ХММЛ — хронический миеломоноцитарный лейкоз
 ЦТЛ — цитотоксические Т-лимфоциты
 ЧР — частичная ремиссия

ABBREVIATIONS

- Ag — antigen
- AML — acute myeloid leukemia
- ALL — acute lymphoblastic leukemia
- Auto-/allo-BMT — autologous or allogeneic transplantation of bone marrow cells or mobilized peripheral stem cells
- B-CLL — B-cell lymphocytic leukemia
- BSA — bovine serum albumin
- BC — breast cancer
- BM — bone marrow
- CD — cluster of differentiation
- CR — complete remission
- CRP — C-reactive protein
- CML — chronic myeloid leukemia
- DTC — disseminated tumor cells
- EIA — enzyme immunoassay
- ESR — erythrocyte sedimentation rate
- ESFT — Ewing's sarcoma family of tumors
- FC — flow cytometry
- FISH — fluorescent hybridization in situ
- GEP — gene expression profiling
- HMW-MAA — high molecular weight —melanoma-associated antigen
- IG — immunoglobulin
- IFR — immunofluorescence reaction
- IPT — immunophenotyping
- ITC — isolated tumor cells
- LAPs — leukemia-associated phenotype
- LDH — lactate dehydrogenase
- LPD — lymphoproliferative disease
- LSC — leukemic stem cells
- MDS — myelodysplastic syndrome
- MC — monoclonal component
- Mab — monoclonal antibodies
- MFC — multiparameter flow cytometry
- MHC — major histocompatibility complex
- MNC — mononuclear cells
- MPN — myeloproliferatin
- MRD — minimal residual disease
- NK-cells — natural killer cells
- NHL — non-Hodgkin's lymphoma
- QPCR — quantitative polymerase chain reaction
- RFS — relapse-free survival
- PNAS — Proceedings of National Academy of Sciences of the USA
- RD — residual disease
- PBS — phosphate buffered saline
- PC — plasma cells
- PCR — polymerase chain reaction
- VCAM-1 — vascular cell adhesion molecule
- CRR-Complete response rate;
ORR Objective response rate.
FLIPI Follicular Lymphoma International Prognostic Index.
Interm. Intermediar
- Nbr (number), C1D1 (cycle 1 Day 1).
Treg regulatory T-lymphocytes.
NK (Natural Killer) lymphocytes.
- LDH lactate dehydrogenase;
FLIPI Follicular Lymphoma International Prognostic Index.
- dendritic cells (DC) from monocytes (MO)
- CTL CytotoxicT-lymphocytes;
Ag Antigen.
- fluorodeoxyglucose-positron emission tomography scanning (FDG pet-scan)

Jean-François Rossi MD PhD

HOW TO IMPROVE ACTIVITY OF EFFECTOR CELLS FOR IMMUNE THERAPY AGAINST CANCER?

Département d'Hématologie. CHU de Montpellier

80 avenue Augustin Fliche. 34295 Montpellier Cedex 05 France

and Université Montpellier I, UFR Médecine, Montpellier, F-34396 France.

Jean-François Rossi MD PhD

tel : +33 4 67 33 80 79

fax : +33 4 67 33 83 73

E-mail address: jeanfrancoisrossi@me.com

Key words: Immunotherapy, NK, T-cells, Dendritic cells, vaccination, cancer

Summary

Cancer cell growth is due to immune surveillance failure. One major tool for treating cancer is now represented by immune therapy, and immune therapy is becoming more and more efficient, due to a better knowledge of basic immunology. Immune effector cells, cytokines, chemokines and mediators of immune messages, were discovered : from inflammation to infection and cancer cell killing processes. Decor is made, for obtaining new efficient tools and understanding the best strategies for immune therapy. Monoclonal antibodies represented one of the most important clinical success story, particularly in B-cell lymphoproliferative disorders with rituximab directed against CD20, and more recently by reducing immune checkpoints within the tumor microenvironment, including anti-programmed death (PD)1, anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), anti-PDLigand (L)-1 or 2, or anti-V-domain Immunoglobulin-containing suppressor of T-cells activation (VISTA) that limit immune suppression. The aim is to control, meaning to eliminate the cancer cells, a situation that is measured by improving the response duration with no or low toxicity, resulting in prolongation of the overall survival, an effect that is supported by enhancing the number and the functions of the immune effector cells including mainly Natural Killer (NK), NKT and cytotoxic T-cells, and to lower the functions of the immune suppressive cells. In this review, we propose to discuss the role of the different immune effector cells, in order to improve their clinical benefit.

Introduction

In the early 20th century, Paul Ehrlich developed the concept that the immune system could protect the host from cancer [1]. From 1940 to early 1960, Burnet and others established the concept of « self » and « nonself » in immunology and

he refined the idea into immune surveillance of cancer [2–4]. In addition, German physicians in the 19th century observed dramatic regressions of cancer in occasional patients developing streptococcal infections. These case reports led to a systematic exploration of fever and infections as an immune therapy proposed by William Coley [5]. Immune therapy was born. The extraordinary development of the immunological research leads clinicians to directly use efficient immune cell-drugs that have been activated *ex vivo*, and tools that reinforce their activity or inhibit specific immune checkpoints. In the early eighties, clinicians used cytokines implicated in expansion of autologous immune cells, particularly T-lymphocytes [6;7]. It was the time of interleukin (IL) 2 and interferons (IFN) [8]. Autologous Lymphocyte-Activated Killer cells (LAK) from peripheral blood (PB) lymphocytes were used, *ex vivo* expanded, and then re-infused [9]. Adoptive cell transfer therapy was born, particularly with Steve Rosenberg, at the US National Cancer Institute in Bethesda, Maryland. The tissue surrounding cancer cells is likely to contain immune cells with anti-cancer activity. This conducts doctors to take a sample of the tissue and select T-Infiltrating-Lymphocytes (TIL), that have been primed to attack cancer cells. TIL were considered as antigen-specific T-lymphocytes, and were cultured and expanded in the lab before their re-infusion [9–11]. However, different immunosuppressive mechanisms result in limitation of clinical activity. Different additional treatments were used to deplete endogenous immune cells and allow the infused T-cells to specifically control the tumor, in order to improve efficacy and prolong the effect. Specific effect against cancer was produced because of the specific recognition of tumor antigens that trigger specific T-lymphocytes. Vaccination has been developed by amplifying tumor-antigen presentation by antigen presenting cells (APC) and efficacy of specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) [12]. Recent advances were performed by genetically modifying T-lymphocytes that enhance their efficacy through T-Cell Receptor (T-CR) or tumor cell linkage by using chimaeric antigen receptor (CAR) [13]. Beyond specific CTL, other cells may directly or indirectly participate to kill cancer cells, including $\gamma\delta$ T lymphocytes that use TCR and additional activating receptors to respond to stress-induced ligands and infection, NK cells, NKT cells, neutrophils, macrophages or mast cells. In this review, by considering the mechanisms of immune surveillance failure in cancers, we discuss the different tools to clinically improve the anti-cancer efficacy through the immune effector cells.

Immune surveillance failure in cancer

Immunosurveillance for cancer is a sort of « quality control » mechanism that refers to the capacity of the immune system to sense cellular dysregulation and respond by activating a stress response to restore homeostasis. This hypothesis was first formulated by Ehrlich in 1909 and grew over the twentieth century with the expansion of knowledge about the immune system, including tumor-associated

antigen (TAA) recognition and when pathological consequences of its failure was revealed, as summarized in Table. In a recent review Corthay proposed that evidence for the role of the immune system in cancer protection is based on different observations: 1/ the increased risk of cancer observed in patients with primary immunodeficiency, immunodepression following transplantation, or Human-Immunodeficiency Virus (HIV-1) infection, 2/ the immune cell infiltrate found in human primer tumors representing an independent prognostic factor for survival, 3/ the presence of mutations in protein-coding genes that are specifically recognized by the adaptative immune system, or to evade immune destruction, 4/ the elimination of stressed or pre-malignant cells by lymphocytes bearing NKG2D receptor and finally, 5/ the promising strategy for immune therapy by blocking the immune checkpoint molecules CTLA-4, PD-1, or PD-L1 or 2 [14–16].

Table

Mechanisms of immune surveillance failure in cancer patients

Cancer cell abnormalities	<p><i>Tumor-Associated Antigen expression</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Low or lack expression of antigens at the cancer cell surface (epigenetic control, proteasome abnormalities or mutations, metabolic changes) ▪ Abnormal HLA I complex expression (mutation, or abnormal antigen presentation process) <p><i>Cytokine production</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ TGF beta ▪ TH2 response <p><i>Immunoproteasome abnormalities</i></p> <p><i>Negative Immune checkpoint regulators</i></p> <p><i>Mutations in proteins controlling immune system</i></p>
Impaired immune cells	<p><i>Impaired efficacy ratio by quantity reduction by:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ chemotherapy ▪ associated diseases, <p><i>Impaired efficacy ratio by increased immune suppression due to:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tregs ▪ Impaired NK licencing ▪ Macrophages, mast cells ▪ Neutrophils (IL17-producing T) <p><i>Epigenetic control of immune response</i></p> <p><i>Polymorphisms</i></p> <p><i>Auto-immune associated diseases</i> (Gougerot-Sjogren syndrome,...)</p> <p><i>Infection-associated process</i> (EBV, CMV, others)</p> <p><i>Inflammation process</i> (IL6,...)</p> <p><i>Genetic and epigenetic conditions</i></p> <p><i>Immune senescence</i></p>
Host conditions	

In addition, immune system is depressed in quality and quantity by standard cytotoxic drugs. Immune evasion is a complex phenomenon that is supported by changes in cancer cells and their micro-environment that favor the lack of cancer cell recognition by the immune infiltrating cells. This includes several mechanisms, such as altered expression and presentation of TAA or secretion of different molecules that promote a regulatory/inhibitory milieu of APC and CTL. So, the presence of T regulatory cells (Treg) within the tumor, the decrease of HLA-I complex at the cell surface of cancer cells, or the secretion of different cytokines that modify cell activity are correlated with bad prognosis or metastasis [17–22]. These changes are driven by several factors, including altered epigenetic marks in tumor cells that control gene expression and epigenomic patterns may represent new biomarkers for both cancer progression or control. [23]. There are several drugs that modify epigenetic control, including hypomethylating agents or histone deacetylase inhibitors. They have been principally used in pre-leukemic diseases, but they are now also developed as immune response modifiers in cancers, particularly for antigen processing and presentation [23–25].

The number of effector cells is crucial for controlling or eradicating cancer cells. *In vitro*, ten CTL are needed to kill one cancer cell, but only one NK cell is necessary to kill ten cancer cells. In addition, the accessibility of the immune effector cells to the cancer cells and their micro-environment is one additional major parameter for efficacy.

Using $\gamma\delta$ T-cells for immunotherapy

$\gamma\delta$ T-cells represent a minor subset (10%) of PB lymphocytes (PBL), with a dominant V γ 9V δ 2 T cell receptor cell subpopulation that recognizes the endogenous pool of isopentenyl pyrophosphate (IPP). $\gamma\delta$ T-cells are implicated in anti-viral and anti-tumor response, and also in modulating immune response [26]. In a recent clinical trial with *in vivo* stimulation of $\gamma\delta$ T-cells for antitumor therapy, it has been observed an unexpected expansion of NK cells [27]. So, $\gamma\delta$ T-lymphocytes communicate with all the other immune cell types, including the $\alpha\beta$ T-lymphocytes that regulate IL-17 $\gamma\delta$ T-cells, B-lymphocytes for the Immunoglobulin (Ig) production, NK cell amplification and activation, monocyte/macrophages and dendritic cells (DC), granulocyte and mesenchymal/stromal cells [28]. Like NK lymphocytes, $\gamma\delta$ T-lymphocytes respond to stimulation by stress- and/or infection-induced ligands, such as the MHC class-I-related molecules MHC class I polypeptide-related sequence (MIC)A/B and ULBP family. Usually, these ligands are weakly or not expressed, and they are up-regulated in the presence of stress or infection and then activate $\gamma\delta$ T-cells by binding to the activating NKG2D receptor expressed on these cells or by direct recognition [29]. In addition, $\gamma\delta$ T-lymphocytes also expressed pattern recognition receptors (PPR), such as Toll-like receptors (TLR) that modulate their activation.

V γ 9V δ 2 T-lymphocytes exert their activity through a TCR-independent recognition of non-peptidic phosphorylated antigens, called phosphoantigens produced by many bacteria or derived from the mevalonate isoprenoid pathway [30]. These $\gamma\delta$ T-cells have the capacity to display cytotoxic activity against infected or transformed cells and to produce pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-17 or γ -IFN, thus promoting a TH1 response, particularly after phosphoantigen activation [31]. Similarly to NK cells, $\gamma\delta$ T cells also express CD16 (FC γ RIII) receptor, particularly upregulated after phosphoantigen recognition, leading to ADCC [32]. In addition to phosphoantigens, several other molecules may activate $\gamma\delta$ T-lymphocytes, including bromohydrin pyrophosphate (BrHPP), 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP), mono-ethyl pyrophosphate, additional ligands such as nitrogen containing biphosphonates (NBP), alkylamines, molecules that are secreted by commensal bacteria or molecules that are present in plant products such as tea, wine, apples and mushrooms [33]. The mechanism of activation has been recently more documented by identifying a membrane-associated molecules expressed on target cells, such as B7-related butyrophilin (BTN) molecules CD277/BTN3A [34]. The influx of TIL to the tumor site is associated with the potential of an anti-cancer response. The tumor cells and their micro-environment participate largely to this infiltrate by secreting chemokines. Interestingly, V δ 1 and V γ 9 δ 2 T-lymphocytes display distinct chemokine receptors, respectively CCR5 and, CCR5 and CXCR3 [35]. In addition, V γ 9 δ 2 T-lymphocytes express other receptors, such as NK receptor P1A, platelet endothelial cell-adhesion molecules (PECAM), LFA-1, L-selectin and CD44v6 [34; 36]. The accumulation of mevalonate metabolites in certain cancer cells activates V γ 9 δ 2 T-lymphocytes, a situation that is not observed in normal cells. In addition, mevalonate pathway modulation by different drugs including statins or biphosphonates may modulate immune response.

The anti-tumor effect of $\gamma\delta$ T-lymphocytes have been demonstrated in several cancers, particularly for lymphoid malignancies. Two strategies for amplifying the effect of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in cancer immunotherapy have been applied, including adoptive cell transfer after *in vitro* expansion and *in vivo* therapeutic activation of $\gamma\delta$ T-lymphocytes by phosphoantigens or aminobiphosphonates with low dose IL2. Nowadays, thirteen clinical studies involving patients with metastatic cancer have been selected for a recent meta-analysis [37]. Patients with solid cancers mostly have been treated with adoptive cell therapy and patients with hematological malignancies preferentially received drug expanding $\gamma\delta$ T-lymphocytes. The majority of the patients received chemotherapy or IL2 prior to *in vivo* drug-expansion therapy. Additional variables were also observed in adoptive therapy, concerning the cell source, the type of expansion and the type of clinical trial, i.e., Phase I or I/II with different cell doses. In solid tumors, by comparing to the efficacy with standard therapy, a clinical benefit was observed in patients with advanced disease in

both renal cell carcinoma and prostatic cancer [38]. In hematological malignancies, large inter-individual variations in expansion capacity has been observed among the different patients having Multiple Myeloma (MM), Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). It has been suggested different explanations, including the number of Treg, the ability of $\gamma\delta$ T-lymphocytes to respond to phosphoantigens, the role of TGF- β , known to decrease NKG2D expression on lymphocytes [38], and also the role of expanded regulatory $\gamma\delta$ T-lymphocytes [39]. One of the first clinical studies in hematological malignancies was published by Wilhelm M et al., who observed good tolerance and high response rate, by using pamidronate and low-dose of IL2 [40]. Our group demonstrated that it was possible to obtain and to amplify *ex vivo* $\gamma\delta$ T-lymphocytes, by using biphosphonates and IL2, and we demonstrated that these cells were able to kill *in vitro* human myeloma cell lines and fresh cells from patients having MM [41]. In addition, we conducted a multicenter Phase II clinical study including forty-five patients having relapsed or refractory/relapsed FL (42 and personal data). Patients received combined therapy that associates bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, named IPH1101, from Innate Pharma Inc. Marseille, France), at 750mg/m², 3 times every 3 weeks, low dose IL2 (8MIU, daily for 5 days, every 3 weeks) and rituximab (375mg/m², 4 times weekly). Clinical characteristics of the patients were standard, with a median age of 59 (39–74), 47% having a low FLIPI index (47%), 27% poor or high FLIPI index, and the median time since last therapy was 19.1 months. The majority of the patients tested for Fc γ RIIIa polymorphism were F/F carriers. At a biological level, a majority of the patients exhibited a selective amplification of targeted CD16+ $\gamma\delta$ T-lymphocytes, with a certain heterogeneity, but peaking after the first cycle of therapy (figure 1). No amplification of the Treg were observed, with a tendency to a slight increase after the third cycle of the treatment. Objective response rate (ORR) was around 50% (local investigator: 52.6%, and independent medical review: 47.4%) with 26.3% of complete response rate (CRR) (figure 2).

As observed with rituximab alone, time to the best response was sometimes delayed, till 12 months after the end of therapy (figure 3). The highest ORR and CRR were observed in patients with low FLIPI index (respectively 57.1% and 33.3%). Tolerance was excellent, with a majority of grades 1 and 2 adverse events, in the majority of cases due to IL2 therapy associated.

No biological activity was correlated with the clinical efficacy, including the maximal fold-increase in $\gamma\delta$ T-lymphocytes, the pre-therapeutic number of $\gamma\delta$ T-lymphocytes, the activation marker of those targeted cells, the Treg, the profile or the quantity of circulating cytokines, except the maximal concentration of rituximab at Day 86 as previously reported [43]. In addition, synergism of $\gamma\delta$ T-lymphocytes and rituximab was also observed with other new generation of anti-CD20 monoclonal antibodies (mAb) [44].

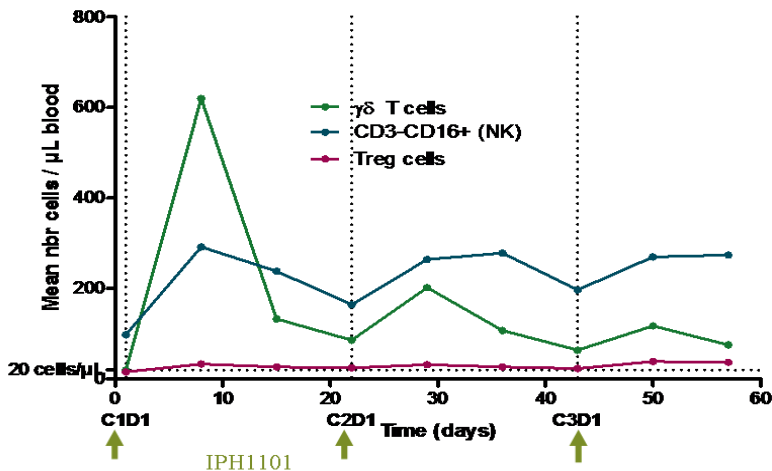


Fig. 1. Pharmacodynamics of immune cells for Follicular Lymphoma patients included in a clinical Phase II study with *in vivo* amplification of T-lymphocytes. Patients were treated with bromohydrin pyrophosphate (BrHPP or IPH1101, from Innate Pharma Inc. Marseille, France), at 750 mg/m², 3 times every 3 weeks, low dose IL-2 (8MIU, daily for 5 days, every 3 weeks) and rituximab (375 mg/m², 4 times weekly).

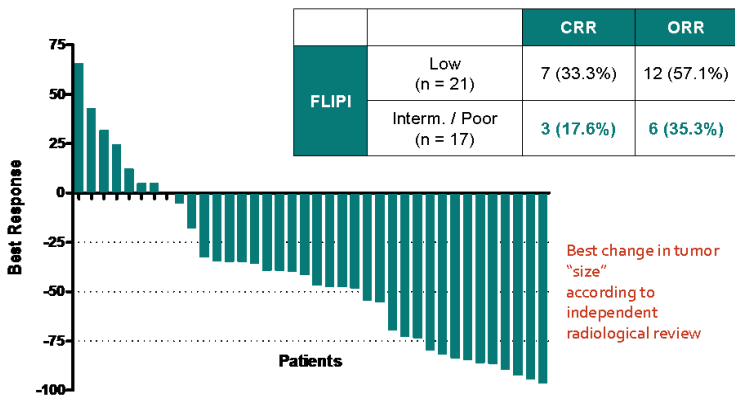
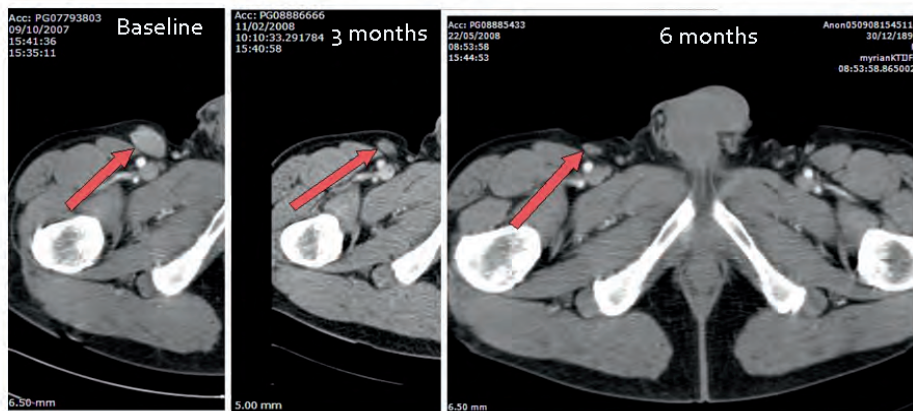


Fig. 2. Response rate by FLIPI index and representation of quantitative efficacy in a clinical Phase II study with *in vivo* amplification of T-lymphocytes.



Age 55, High LDH, Low FLIPI,
treated with R 20 months before (best response PR).

Fig. 3. Delayed complete response observed in a patient included in a clinical Phase II study with *in vivo* amplification of T-lymphocytes.

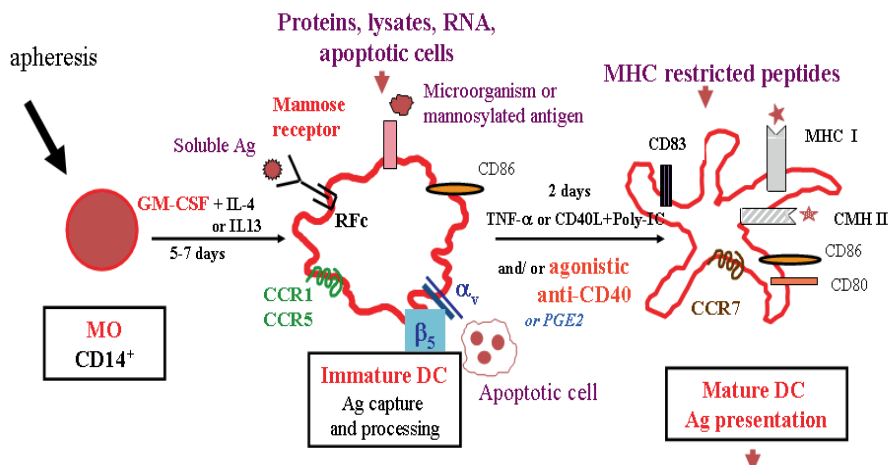


Fig. 4. *Ex vivo* maturation and differentiation of DC from MO.

Rituximab administered alone was given a lower CRR and shorter duration of response than that observed with combined immune therapy, particularly when associated with $\gamma\delta$ T-lymphocytes amplification for patients with advanced disease [45].

$\gamma\delta$ T-lymphocytes represent essential cells to control and eliminate and tumor cells. In addition to their plasticity, they are able to cooperate with other immune cells, particularly NK cells and DC, having common systems of response such as TLR, NKG2D, CD16, and other receptors. At a clinical level, this means that, beyond the association with mAb, it may interesting to combine other targeted molecules such as TLR agonists, or to imagine culture system for mixing these effector cells [29; 38; 45–47].

Using NK lymphocytes for immune therapy

NK lymphocytes was first identified in 1975 as unique lymphocyte subset, morphologically and functionally distinct from both T and B lymphocytes. Understanding their biology and functions takes a long period of time. NK lymphocytes are defined as $CD3^- CD56^+$ lymphocytes, with different circulating subsets, particularly, including $CD56^{\text{bright}}$ and $CD56^{\text{dim}}$ cell subpopulations. Approximately 90% of circulating and spleen NK cells belong to the $CD56^{\text{dim}} CD16^+$ subset and it displays cytotoxic functions upon interacting with target cells [48]. On the contrary, lymph nodes and tonsils predominantly contain $CD56^{\text{bright}} CD16^-$ subset that produced cytokines such as γ IFN in response to IL12, IL15 and IL18 stimuli [48]. NK lymphocytes kill rapidly target cells independently to prior immunization or MHC restriction, rendering these cells attractive for immune therapy. This activation process is regulated by a balanced mechanism between inhibitory and activating signals from different receptors, including NK cytotoxicity receptors (NCRs), C-type lectin receptors (NKG2A/B, NKG2C, NKG2D, NKG2F) and killer Ig-like receptors (KIR) [48]. Complexity was due to the fact that both inhibitory and activating molecules may belong to the same family. In fact, these sets of activating and stochastically expressed inhibitory receptors (IR) control different steps in cytotoxic lymphocyte-mediated killing of target cells, including the linkage of NK lymphocytes to the target cells, polarization of lytic granules towards target cells, and degranulation [49; 50]. There is a certain hierarchy to deliver the messages to NK cells, including the prior engagement of NK cells with MHC class I molecules by IR, a situation calibrated by the number of IR engaged and the strength of MHC binding, then leading to greater responsiveness to subsequent activation stimuli through a process called NK cell licensing [51–52]. Despite the fact that NK cells functions as innate immune cells, accumulating evidence demonstrated that these cells are educated and selected during the development and expanded during certain stress situation and could generate long-lived memory cells [53].

As, NK cells play an essential role in the defense against infections and cancer,

therapeutic strategies with specific immune modulators, *ex vivo* amplification of autologous NK cells or injection of allogenic amplified and activated NK cells have been developed. The first clinical trials were based on amplifying autologous NK cells by using *in vivo* cytokines, such as IL2, IL12, IL15, IL18, IL21 and type I IFN [54; 55]. By using such stimulations, cells became LAK or Cytokine-activated Killer cells (CIK) if γ IFN is added to the culture conditions 24h before stimulation by anti-CD3 plus IL2 [56; 57]. So, CIK exhibit more than 70-fold increase of cytotoxic activity when compared to conventional LAK [57; 58]. The number of cytotoxic cells needed for lysing tumor cells is 2×10^{11} LAK and only 0.5 to 5×10^{10} for CIK [57]. CIK is a mixture of T-cells, NKT cells and NK cells, all expressing also CD16, CD45RA, CR7, CD27, CD28 and different other markers.

For obtaining a majority of NK cells, elimination of T-cells is needed. As allogenic T-cell administration is associated with graft-versus host disease (GVHD), maximal of T-cell contamination allowed to limit this complication, is lower than $1 \times 10^3/\text{kg}$ [59; 60]. The aim of the early studies was to amplify and activate anti-tumor activity from autologous NK cells. In order to limit expansion of Treg observed in LAK, adoptive transfer of *ex vivo* amplified pure NK cells was necessary. Alternative therapeutic approach was used in Acute Myeloid Leukemia (AML) and MM, by using anti-KIR mAb that block NK cells that expressed inhibitory receptors specific for MHC-I [61]. KIR-mismatch was first analyzed in patients having allogenic transplantation, demonstrating a better survival with less infections, less GVHD and less relapse in patients having such mismatch independently to other factors [62; 63].

Allogenic NK cells with KIR mismatch demonstrate better anti-tumor activity particularly in patients with AML [60; 64]. Tolerance was excellent if T and B-cell contamination was limited. Clinical efficacy was observed in different hematological malignancies and solid tumors [54].

NK cell lines have been developed in order to simplify the process. Among the established malignant NK cell lines, NKG2 received FDA approval after demonstrating potential benefit for its anti-tumor effect and its safety. As a consequence, NKG2 cell line served as a platform for studying NK cell-based tumor immunotherapy [54].

Questions concern the origin of NK cells used as cell-drugs, from PB or umbilical cord blood (UCB), the mode of amplification and activation, the accessibility to the tumor site and the number of cells needed for tumor cell killing, all of these parameters representing the biological efficacy of the therapeutic strategy. Recently, it has been shown that NK cells from UCB contain different subpopulations including progenitor cells that could be stimulated and amplified for clinical trials [65; 66]. KIR-ligand mismatch is largely dictated by the ligands of the four KIR, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, and KIR3DL2 [67].

NK adoptive infusion has been made in patients with AML, NHL, or solid tumors such as breast, ovarian, lung or colon cancers [68]. Several ongoing programs are now developed worldwide.

Selection of NK could be made by using clinical-grade selecting systems such as purification columns. Amplification is generally obtained by different cytokines including IL2 and/or IL15, IL18 and IFN. Activation of NK cells could be obtained by different ways, particularly using K562 cell line, or EBV lymphoblastoid cell lines [69; 70 and personal data].

Using direct or indirect activation of cytotoxic t-cells for immune therapy

Tumor-specific CD8+ CTL are generated by repetitive stimulation of PB mononuclear cells (PBMC) with TAA expressing APC such as DC and some cytokines including IL2, IL7, IL12, IL15 and IL21 [71]. TAA have been identified and some of them have been used in vaccination programs [72]. DC are a highly heterogeneous population of cells with a remarkable plasticity but common morphological features. Several mechanisms, including cytokines allowed monocytes to mature into DC, a process associated with the antigen presentation and different molecules that are central for cell communication, particularly with T-cells [73]. Autologous mature DC pulsed with TAA or cell lysates have been obtained *ex vivo*. Briefly, PBMC were obtained by apheresis and then cultured, first in the presence of GM-CSF and IL4 or IL13 for 5 to 7 days, followed by a second step of culture combining proteins or tumor cell lysates, RNA, apoptotic cells or TAA, and the addition of TNF- α , CD40L or agonist anti-CD40 mAb plus Poly-IC for 2 additional days of culture, as shown on figure 4 [74].

Activation of DC increases their cell-surface expression of MHC class I and II, CD63, CD80, CD86, CCR7, decreases CD14 molecules, in association with the secretion of a myriad of cytokines and chemokines, including IFN, TNF- α , IL1, IL4, IL6, IL10, IL12, and IL23, that can guide immune response. Alternative method was used in the Sipuleucel-T process, an FDA approved cell-drug based therapy vaccine, by incubating autologous PBMC with a prostatic acid phosphatase GM-CSF fusion protein that drives the maturation of monocytes to DC. This therapeutic approach was associated with 4.1 month improvement in median survival for patients having a castrate resistant prostate cancer as compared to control arm in a randomized trial [75]. Extensive studies were made in FL by Levy R et al., starting with idotype vaccination, in association with immune adjuvants as Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) and GM-CSF, or with DC pulsed with idotype [76; 77]. Several phase III studies were conducted, including with rituximab, demonstrating a prolonged control of the minimal residual disease [78]. We used DC-based therapy pulsed with tumor cell lysates in a phase II study for patients having FL in relapse. Eleven patients were treated, with 2 CR before vaccination and 2 CR after vaccination program (figure 5). In addition, we observed that early

[¹⁸F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (15 days following vaccination) could be used as an indicator for immune response [79]. After more than 30 years of clinical trials with DC, as mediators for vaccination therapy in cancer, clinical responses have been disappointing, with an ORR around 15% [80]. Beyond the limited clinical efficacy, the major inconvenience for DC-based therapy is represented by the fact that this therapy is a personalized medicine with difficulties for industrialization. So, *in vivo* DC activation or amplification of their activity represents a new interesting approach and may combine the benefits of a physiological environment. This includes the use of immune adjuvants that improve the Ag delivery as mineral salts, emulsions and liposomes, or immunostimulants such as TLR-ligands (particularly TLR7/8 agonists such as the imidazoquinoline family, [81]), cytokines, saponins, bacterial exotoxins, and the use of exosomes [82–86]. In addition, the injection site remains a matter of debate, but targeting the skin with *ex vivo*-loaded DCs or using *in vivo* DC-based strategies has improved immune responses [84]. The efficiency of DC migration to the lymph nodes has been studied and is linked to the maturation status and the CCR7 expression of the DC [87].

A new therapeutic is born with all these molecules that modify the host micro-environment. Lymphodepletion represents the first therapy that was used in this context. Such an induction of lymphodepletion was achieved by the use of total body irradiation (TBI), non myeloablative chemotherapy as conditioning regimen for allogenic transplantation, or in another context, low dose of chemotherapy such as cyclophosphamide, 5-fluorouracil, fludarabine, gemcitabine, bortezomib, sorafenib and sunitinib. Recently, idelalisib, an inhibitor of phosphoinositide 3 kinase δ (PI3K δ) has been mentioned also to deplete Treg [88]. This has an advantage to favor depletion of Treg and myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Tumor-associated myeloid cell subpopulations include MDSC at different stages of differentiation, such as neutrophils, immature DC, macrophages and mast cells, all of these cells producing mediators that may limit the immune control [89]. Other therapeutic strategies have been developed, including molecules that targets Treg, such as anti-CD25 molecules, anti-Foxp3 or anti-CTLA4, inhibitors of STAT3 that regulates the expression of TGF- β and IL10 cytokines or inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [71; 90]. Similarly to DC generation, the use of specific CTL is a personalized therapy that presents major inconveniences and needs to improve the cancer cell targeting. For that reason, many groups are currently investigating the therapeutic efficacy of genetically modified T-lymphocytes from PB, against cancer cells. The aim of such procedures was to improve recognition and/or avidity for tumor antigens. Two types of modifications were developed, i.e., Chimeric-Antigen Receptor T-cells (CAR-T) and TcR-engineered T cells.

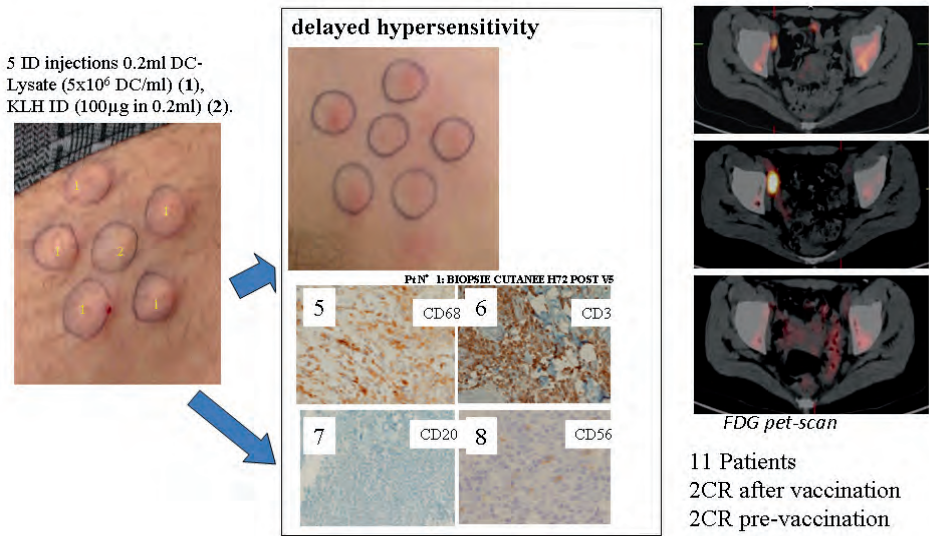


Fig. 5. Hypersensitivity response with cell lysate plus dendritic cells with histological data and [18 F] FDG pet-scan for monitoring the immune response.

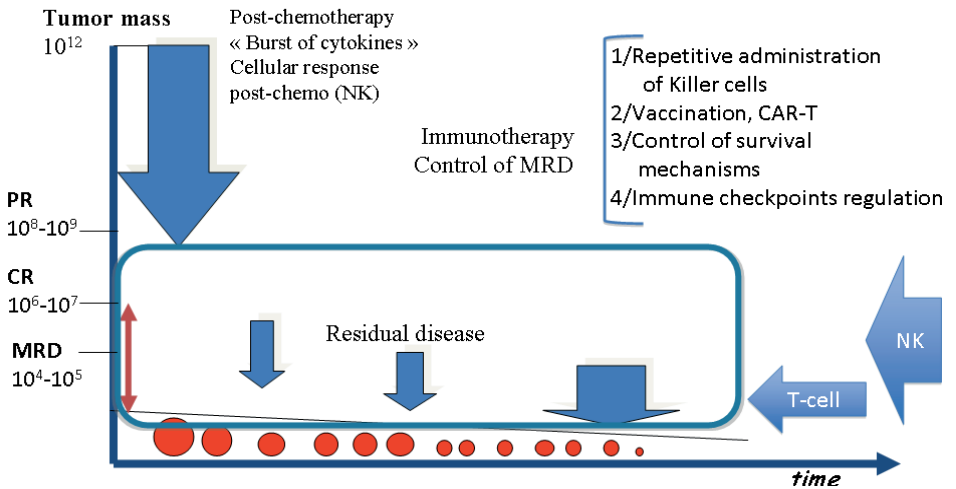


Fig. 6. Windows of opportunity in immune therapy for cancers.

CAR-T were developed to target antigens expressed on the cell surface of the cancer cells independently on HLA processing and presentation [91]. In addition, this strategy also bypasses all the obstacles to T-cell responses, particularly in the context of a failure of immune surveillance.

CAR-T cells function by creating a genetic construct encoding the antigen-binding region of a mAb and intracellular components of the TCR that activates the signal upon binding to target cell surface antigens.

First generation consists of antigen-binding domains of the heavy and light chains of antibodies that are fused to the CD3- ζ intracellular signaling domain. Second generation adds an intrasignaling domain of a co-stimulatory molecule, and third generation combines multiple signaling domains of CD3- ζ and co-stimulatory molecules to enhance the avidity of T-cells for antigens [92]. Interestingly, CAR-T strategy has been associated with preliminary clinical success in hematological malignancies including AML by targeting CD123, the IL3-R α chain [93], CLL and pre-B acute lymphoblastic leukemia with CD19 [94; 95]. One of the patient treated relapsed early with downregulation of the CD19 expression on tumor cells. This observation leads scientists to elaborate multiple tumor antigen constructs in order to limit the emergence of relapse with antigen-negative variants [92]. In solid tumors, CAR-T cell therapy is just beginning, with initially the use of CAR-T induced with co-stimulatory molecules, combining CD28 and 4-1BB molecules, to target ERBB2 in a patient with colon cancer. Unfortunately, the patient died, with multi-organ failure due to a major cytokine release syndrome [96], a dramatic event that could be prevented by the use of transduced signal for inducing T-cell apoptosis, such as caspase-9. In addition, CAR-T may be suppressed by the accumulation of immunosuppressive cells accumulated in the tumor micro-environment, needing combined approaches.

TcR engineering is based on the ability to genetically modify PB lymphocytes to express TcR with specificity against a choosen antigen, that allows these chimeric TcR-T cells to target tumor cells in a context of MHC class I-restricted antigen peptide presentation. This methodology was first used with MART-1 antigen in the context of melanoma, but exhibiting a lower response rate (13%) than that observed with TIL (51–72%) [92]. Several pharmaceutical companies have invested in CAR-T strategies, particularly active in CD19 positive hematological malignancies [9].

Similarly, CAR-NK cells have been developed in pre-clinical and early clinical studies, with redirected human NK cells and NK-92 cell line, against CD19, CD20, CD38, CD138, CD244, HER2, GD2, EPCAM, CS1, LMAN1 [97–99].

Using other immune effector cells and multi-approach therapy

Immune therapy is now entering new era associated with significant clinical efficacy, but it necessitates a multi-approach strategy.

This includes the use of alternative immune effector cells, to trigger cells that may influence other effector cells or the use of additional molecules that amplify their efficacy or lower immunosuppressive cells.

NKT cells are a subpopulation of lymphocytes with phenotypic properties of both T and NK cells and supply different functions that render these cells attractive for immune therapy. Among these NKT, one subset of cells, referred to as invariant NKT (iNKT) are activated by glycolipid antigens presented by CD1d, a molecule present at the cell surface. In addition, these cells are active effector cells with killing activity and secrete cytokines, such as Th1-, Th2- and Th17-type responses, particularly the γ -chain cytokine or CD132 (i.e., IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 and IL21-R). Several drugs have been generated for triggering these cells through CD1d molecules, including α -galactosylceramides synthetic analogs [100; 101].

Immune system possesses a certain redundancy and major interactions. The addition of large amounts of effector cells may greatly interact with other members of this complex system. The aim of such combined strategies is to amplify specific recognition, to reinforce the killing activity or to lower immune suppressive effect. TAA or MHC class I expression at the cell surface of cancer cells could be reinforced by epigenetic modulation or by interfering on metabolism pathways [23; 102]. Cancer recognition by immune cells are potentially reinforced by genetic modification on cell-drug, such as CAR-T or CAR-NK. Amplification of the immune activity is mediated by cooperation between immune cells. So, subsets of CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK cells present in lymph nodes possess a helper role in the production of γ IFN that may improve the effect of other cells. Cell crosstalk is essential for immune therapy [103]. By combining mAb and certain cytokines that activate DC, one could suspect an *in vivo* vaccination process, as suggested by the delayed response observed in some clinical trials. As an example, we observed a progressive reduction of tumor mass during one year in a patient who received the association of GM-CSF and rituximab despite the fact this patient had a previous short duration of response after administering rituximab alone [104, personal data]. This observation suggests that rituximab possibly enhances apoptosis of tumor cells and GM-CSF participates to *in vivo* generation of mature DC that may prolong the immune control of the disease.

Immune response could be enhanced by blocking immune checkpoints such as CTLA-4, PD-1 molecules and its ligands PD-L1 or PD-L2, T-cell Ig and mucin domain containing protein 3 (Tim-3), lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) and recently V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation (VISTA) or carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-6 in melanoma or MM [12; 105; 106]. Expression of these markers by TIL, and particularly Treg, results in low responsiveness of the immune control of cancer cells. These molecules are very attractive as targets for reversing immune tolerance, particularly in cancer therapy. The anti-CTLA-4 mAb ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) received FDA approval in March 2011 for the treatment

of metastatic melanoma [107] and further development are ongoing in both solid tumors and hematological malignancies [108; 109] with different molecules (MDX-1106 and CT-011 or pidilizumab as anti-PD-1; MDX-1105 as anti-PD-L1, and other molecules directed against Tim-3, LAG-3 and VISTA).

We are now entering a new era for immunotherapy, not only for cancer but also for dysimmune diseases (figure 6).

Two many drugs, two many tools, two many therapeutic strategies need to go back to the fundamentals of the immune system. What are the immune effector cells? How to improve their function with less or low toxicity? What are the accessibility of the targets and what is the optimal bio-clinical ratio of efficacy? Now, new thinking is necessary.

References

1. Ehrlich P. Uber den jetzigen stand der Karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneekd 1909, 5:273-90.
2. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The process of control. Br Med J 1957, 1 :779-86.
3. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res 1970, 13:1-27.
4. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. Yale J Biol Med 1982, 55:329-33.
5. Cooley W. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the streptococcus erysepelas and the bacillus prodigiosus). Proc R Soc Med 1910, 3(Surg Sect):1-48.
6. Yoshimoto T, Morishima N, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Mizuguchi, J. Interleukins and cancer immunotherapy. Immunotherapy 2009, 5:825–844.
7. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. J Allergy Clin Immunol 2011, 127, 701–721.
8. Anastakis D, Petanidis S, Kalyvas S, Nday CM, Tsave O, Kioseoglou E, Sali-foglou A. Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. Int J Mol Sci 2015, 16:1691-1710.
9. Humphries C. Adoptive cell therapy. Honing that killer instinct. Nature 2013, 504:S13-15.
10. Stavrou D, Bilzer T, Anzil AP, Hulthen M, Kaldrymidou E. Reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes against syngeneic glioma target cells. Anticancer Res 1981, 1:125-34.
11. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer-what clinicians need to know. Nature Rev Clin Oncol 2011, 8:577-85.

12. *Makkouk A, Weiner G.* Cancer Immunotherapy and breaking immune tolerance : new approaches to an old challenge. *Cancer Res* 2015, 75:5-10.
13. *Figueroa JA, Reidy A, Mirandola L, Trotter K, Suvorova N, Figueroa A, Konala V, Aulakh A, Littlefield L, Grizzi F, Rahman RL, Jenkins M, Musgrove B, Radhi S, D’Cunha N, D’Cunha LN, Hemomath PL, Cobos E, Chiriva-Internati M.* Chimeric antigen receptor engineering: a right step in the evolution of adoptive cellular immunotherapy. *Int Rev Immunol* 2015, 34:154-87.
14. *Corthay A.* Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol* 2014, 5:1-8.
15. *Freeman-Keller M, Weber J.* Anti-programmed death receptor 1 immunotherapy in melanoma: rationale, evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2015, 7:12-21.
16. *Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N.* Involvement of PD-L1 on tumor cells escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 12293-97.
17. *Campbell DJ, Koch MA.* Phenotypic and functional specialization of FOXP3 regulatory T cells. *Natur Rev Immunol* 2011, 11:119-30.
18. *Saifi M, Maran A, Raynaud P, Picot MC, Quittet P, Cartron G, Rossi JF, Costes V.* High ratio of interfollicular CD8/FOXP3-positive regulatory T cells is associated with a high FLIPI index and poor overall survival in follicular lymphoma. *Exp Ther Med* 2010, 1:933-38.
19. *Yu X, Li H, Ren X.* Interaction between regulatory T cells and cancer stem cells. *Int J Cancer* 2012, 131: 1491-8.
20. *Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, Garcia-Lora A, Ruiz-Cabello F, Garrido F.* Role of altered of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 2007, 601:123-31.
21. *Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V.* MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105:1172-87.
22. *Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C, Verstegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels LJAC, Jonkers J, de Visser KE.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015, Mar 30. doi:10.1038/nature14282.
23. *Heninger E, Krueger TEG, Lang JM.* Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents. *Front Immunol* 2015, 6:29.
24. *Kortenhorst MS, Wissing MD, Rodriguez R, Katchap SK, Jans JJ, Van der Groep P, Verheul HM, Gupta A, Aiyetan PO, van der Wall E, Carducci MA, Diest PJ, Marchionni L.* Analysis of the genomic response of human prostate cancer cells to histone deacetylase inhibitors. *Epigenetics* 2013, 8:907-20.
25. *Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozacco L, Keler T, Schesinger SJ, Steinman RM.* Dendritic cell-targeted protein vaccines : a novel approach to induce T-cell immunity. *J Intern Med* 2012, 271:183-92.

26. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Human $\gamma\delta$ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* 1999, 11:57-65.
27. Kunzmann V, Smetak M, Kimmel B, Weigang-koehler K, Goebeler M, Birkman J, Becker J, Schmidt-Wolf IG, Einsele H, Wilhem M. Tumor-promoting versus tumor-antagonizing rôles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial. *J Immunother* 2012, 35:205-13.
28. He Y, Wu K, Hu Y, Sheng L, Tie R, Wang B, Huang H. $\gamma\delta$ T cell and other immune cells crosstalk in cellular immunity. *J Immunol Res* 2014, 2014:960252
29. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud HA, Gros L, Eliaou JF, Bonnefoy N. Plasticity of $\gamma\delta$ T-cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol* 2014, 5:622.
30. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003, 197:163-8.
31. Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Estebas I, Doherty DG. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators Inflamm* 2010, 2010:704941.
32. Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J. Production of TNF-alpha by human V gammaV delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIII, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* 2001, 166:7190-9.
33. Gogoi D, Chiplunkar SV. Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy : bench to bedside. *Indian J Med Res* 2013, 138: 755-61.
34. Harly C, Peigné CM, Scotet E. Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human V γ 9V δ 2 T cells. *Front Immunol* 2015, 5:657.
35. Kabelitz D, Wesch D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol* 2003, 23:339-70.
36. Thomas ML, Badwe RA, Deshpande RK, Samant UC, Chiplunkar SV. Role of adhesion molecules in recruitment of Vdelta 1 cells from the peripheral blood to the tumor tissue of oesophageal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 50: 218-25.
37. Buccheri S, Guggino G, Caccamo N, Li Donni P, Dieli F. Efficacy and safety of $\gamma\delta$ cell-based tumor immunotherapy: a meta-analysis. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014, 28:81-90.
38. Poggi A, Zocchi MR. $\gamma\delta$ lymphocytes as a first line of immune defense: old and new ways of antigen recognition and implication for cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2014, 5:575.
39. Wesch D, Peters C, Siegers GM. Human gamma delta T regulatory cells in cancer: fact or fiction. *Front Immunol* 2014, 5: 598.
40. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony HP. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid ma-

- lignancies. *Blood* 2003, 102:200-6.
41. *Burjandzé M, Condomines M, Reme T, Quittet P, Latry P, Lugagne C, Romagne F, Morel Y, Rossi JF, Klein B, Lu ZY.* In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007, 139:206-16.
 42. *Rossi JF.* A phase I/II study of IPH1101, gamma delta T cell agonist in combination with rituximab re-treatment in patients with low-grade follicular lymphoma. *EHA* 2010.
 43. *Golay J, Semenzato G, Rambaldi A, Foa R, Gaidano G, Gamba E, Pane F, Pinto A, Specchia G, Zaja F, Regazzi M.* Lessons for the clinic from rituximab pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mabs* 2013, 5:826-37.
 44. *Braza M, Klein B, Fiol G, Rossi JF.* $\gamma\delta$ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* 2011, 96:400-7.
 45. *Davis TA, White CA, Grillo-Lopez AJ, Velasquez WS, Link B, Maloney DG, Williams ME, Mohrbacher A, Weaver R, Dowden S, Levy R.* Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol* 1999, 17:1851-7.
 46. *Deniger DC, Moyes JS, Cooper LJM.* Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Front Immunol* 2014, 5:636.
 47. *Braza MS, Klein B.* Antitumor immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol* 2013, 160:123-32.
 48. *Cooper MA, Fehninger TA, Caligiuri MA.* The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001, 22:633-40.
 49. *Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresso V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E.* Human NK education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006, 25:331-42.
 50. *Long EO, Sik Kim H, Peterson ME, Rajagopalan S.* Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013, 31: 227-58.
 51. *Thomas LM, Peterson ME, Long EO.* Cutting edge: NK licensing modulates adhesion to target cells. *J Immunol* 2013, 191:3981-85.
 52. *Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C.* Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol* 2014, 5:184.
 53. *Rölle A, Pollmann J, Cerwenka A.* Memory of infections: an emerging role for Natural Killer cells. *Plos* 2013, 9: Issue 9, e1003548.
 54. *Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tsian Z.* NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 2013, 10:230-52.
 55. *Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y.* Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004, 202:275-93.
 56. *Ochoa AC, Gromo G, Alter BJ, Sondel PM, Bach FH.* Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, beta-IL 1, interferon-gamma and -beta. *J Immunol* 1987, 138:2728-2733.
 57. *Jiang J, Wu C, Lu B.* Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *J Transl Med* 2013, 11:83.

58. *Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL.* Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med* 1991, 174:139-49.
59. *Müller S, Schulz A, Reiss U, Schwartz K, Schreiner T, Wiesneth M, Debatin KM, Friedrich W.* Definition of a critical T cell threshold for prevention of GVHD after HLA non-identical PBPC transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1999, 24:575-81.
60. *Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH, Leung W.* NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010, 28: 955-59.
61. *Korde N, Carlsen M, Lee MJ, Minster A, Tan E, Kwok M, Manasanch E, Bhutani M, Tajeja N, Roschewski M, Zingone A, Costello R, Mulquin M, Zuchlinski D, Maric I, Calvo KR, Braylan R, Tembhare P, Yuan C, Stetler-Stevenson M, Trepel J, Childs R, Landgren O.* A phase II trial of pan-KIR2D blockade with IPH2101 in smoledering multiple myeloma. *Haematologica* 2014, 99:e81.
62. *Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
63. *Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A.* Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation. *Cytotherapy* 2006, 8:554-8.
64. *Ruggeri L, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli E, Martelli MF, Velardi A.* Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother* 2005; 28: 175-182.
65. *Verneris MR, Miller J.* The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood Natural Killer cells. *Br J Haematol* 2009, 147:185-91.
66. *Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyns H.* Complementary and contrasting rôles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leuk Biol* 2011, 90:49-60.
67. *Davies JOJ, Stringaris K, Barrett JA, Revzani K.* Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy* 2014, 0:1-14.
68. *Liu Y, Wu HW, Shread M, Sposto R, Somanchi SS, Cooper LJM, Lee DA, Seeger RC.* Growth and activation of Natural Killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res* 2013, 19:2132-43.
69. *Koepsll SA, Miller JS, McKenna DH.* Natural cells: a review of manufacturing and clinical utility. *Transfusion* 2013, 53:404-10.
70. *Park KU, Jin P, Sabatino M, Feng J, Civini S, Khuu H, Berg M, Childs R, Stroncek D.* Gene expression analysis of ex-vivo expanded and freshly isolated NK cells from cancer patients. *J Immunother* 2010, 33:945-55.

71. *Chung DS, Shin HJ, Hong YK.* A new hope in immunotherapy for malignant gliomas: adoptive T cell transfer therapy. *J Immunol Res* 2014, 2014:326545.
72. *Tagliamonte M, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L.* Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Human Vaccin Immunother* 2014, 10:3332-46.
73. *Banchereau J, Steinman RM.* Dendritic cells and the control of the immunity. *Nature* 1998, 392:245-52.
74. *Tarte K, Fiol G, Rossi JF, Klein B.* Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro. *Leukemia* 2000, 14:2182-92.
75. *Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010, 363:411–22.
76. *Maloney DG.* Follicular NHL: from antibodies and vaccines to graft-versus-lymphoma effects. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007, 226-32.
77. *Bendandi M.* Anti-idiotype vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* 2000, 14: 1333-9.
78. *Thomas SK, Kwak LW.* Lymphoma vaccine therapy: next steps after a positive, controlled phase III clinical trial. *Semin Oncol* 2012, 39:253-62.
79. *Baudard M, Comte F, Conge AM, Mariano-Goulart D, Klein B, Rossi JF.* Importance of [18F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography scanning for the monitoring of responses to immunotherapy in follicular lymphoma. *Leuk Lymph* 2007, 43:381-8.
80. *Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN.* Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014, 15:e257-67.
81. *Schön MP, Schön M.* TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 2008, 27:190-99.
82. *Wimmers F, Schreibelt G, Sköld AE, Figdor CG, De Vries IJ.* Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: from in vitro generated monocyte-derived DCs to naturally circulating DC subsets. *Front Immunol* 2014, 5:165.
83. *Dubensky TW Jr, Reed SG.* Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* 2010, 22:155–61.
84. *Ciocca DR, Frayssinet P, Cuello-Carrion FD.* A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patients. *Cell Stress & Chaperones* 2007, 12:33-43.
85. *Pizzurro GA, Barrio MM.* Dendritic cell-based vaccine efficacy: aiming for hot spots. *Front Immunol* 2015, 6:91.
86. *Romagnoli GG, Zelante BB, Toniolo PA, Migliori IK, Barbuti JAM.* Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenetics targets. *Front Immunol* 2015, 5: 692.

87. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006, 176 :5153–9.
88. Ali K, Soond DR, Pineiro R, Hagemann T, Pearce W, Lim EL, Bouabe H, Scudamore CL, Hancox T, Maecker H, Friedman L, Turner M, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature* 2014, 510:407-13.
89. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, Leffet L, Hansbury MJ, Thomas B, Rupar M, Waeltz P, Bowman KJ, Polam P, Sparks RB, Yue EW, Li Y, Wynn R, Fridman JS, Bum TC, Combs AP, Newton RC, Scherle PA. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* 2010, 115:3520-30.
90. Medina-Echeverez J, Aranda F, Berraondo P. Myeloid-derived cells are key targets of immunotherapy. *Oncolimmunol* 2014, 3:e28398.
91. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:10024-28.
92. Payne KK, Bear H, Manjili M. Adoptive cellular therapy of cancer: exploring innate and adaptive cellular crosstalk to improve anti-tumor efficacy. *Future Oncol* 2014, 10:1779-94.
93. Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, Brown CE, Wang X, Budde LE, Hoffman L, Aguilar B, Chang WC, Bretziaff W, Chang B, Jonalaggada M, Starr R, Ostberg JR, Jensen MC, Bhatia R, Forman SJ. T cell expressing CD123-specific chimeric antigen receptor exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 2013, 122:3138-48.
94. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Transl Med* 2011, 3:95ra73.
95. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013, 368:1509-1518.
96. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurence CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010, 18:843-51.
97. Glienke W, Esser R, Priesner C, Suerth JD, Schambach A, Wels WS, Grez M, Kloess S, Arseniev L, Koehl U. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Immunol* 2015, 6:21.
98. Klingemann H. Are natural killer cells Superior CAR drivers? *Oncolimmunol* 2014, 3:e28147.
99. Jiang H, Zhang W, Shang P, Zhang H, Fu W, Ye F, Zeng T, Huang H, Zhang X, Sun W, Man-Yuen Sze D, Yi Q, Hou J. Transfection of chimeric anti-CD138

- natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol Oncol* 2014, 8:297-310.
100. *Carreno LJ, Kharkwal SS, Porcelli SA*. Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants. *Immunotherapy* 2014, 6:309-20.
 101. *Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M*. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front Immunol* 2013, 4:409.
 102. *Charni S, de Bettignies G, Rathore MG, Aguilo JI, van den Elsen PJ, Haouzi D, Hipskind RA, Enriquez JA, Sanchez-Beato M, Pardo J, Anel A, Villalba M*. Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J Immunol* 2010, 185:3498-503.
 103. *Pampena MB, Levy EM*. Natural killer cells as helper cells in dendritic cell cancer. *Front Immunol* 2015, 6:13.
 104. *Cartron G, Lu ZY, Baudard M, Kanouni T, Rouillé V, Quittet P, Klein B, Rossi JF*. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008, 26:2725-31.
 105. *Lines JL, Sempere LF, Broughton T, Wang L, Noelle R*. VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2014, 2:510-17.
 106. *Witzens-Harig M, Hose D, Junger S, Pffirschke C, Khandelwai, Umansky L, Seckinger A, Conrad H, Brackertz B, Reme T, Gueckel B, Meibner T, Hundemer M, Ho AD, Rossi JF, Neben K, Bernhard H, Goldschmidt H, Klein B, Beckhove P*. *Blood* 2013, 121:4493-503.
 107. *Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ*. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010, 363:711-23.
 108. *Armand P, Nagler A, Weller EA, Devine SM, Avigan DE, Chen YB, Kaminski MS, Holland HK, Winter JN, Mason JR, Fay JW, Rizzieri DA, Hosing CM, Ball ED, Uberti JP, Lazarus HM, Maspara MY, Gregory SA, Timmerman JM, Andorsky D, Or R, Waller EK, Roten-Yehudar R, Gordon LL*. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J Clin Oncol* 2013, 31:4199-206
 109. *Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, Romaguera J, Hagemeister F, Fanale M, Samaniego F, Feng L, Baladandayuthapani V, Wang Z, Ma W, Gao Y, Wallace M, Vence LM, Ravanyi L, Muzzafar T, Roten-Yehudar R, Davis RE, Neelapu SS*. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014, 15:69-77.

Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Гривцова, Н.А. Купрышина

**ИММУНОДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕЙ КРОВИ
НА ОСНОВАНИИ МНОГОЦВЕТНЫХ (8 ЦВЕТОВ ПАНЕЛЕЙ)
ЕВРОПЕЙСКОГО КОНСОРЦИУМА
ПО ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ (EURO-FLOW)**

ФГБНУ «РОИЦ имени Н.Н. Блохина», Москва

Резюме

В 2012 г. в журнале "Leukemia" были опубликованы протоколы консорциума Euro-Flow по 8 цветной проточно-цитометрической диагностике гемобластозов. В статье на конкретных примерах анализируется возможность использования концепции Euro-Flow при острых лимфобластных лейкозах (В- и Т-линейных), острых миелоидных лейкозах, периферических В-клеточных лимфомах, НК-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях, плазмоклеточных опухолях. Предложенные панели моноклональных антител и флуорохромов информативны как для первичной диагностики, так и для мониторинга остаточной болезни в процессе терапии. Кроме того, диагностикумы Euro-Flow включают маркеры, ассоциированные с повторяющимися хромосомными аберрациями при лейкозах и лимфомах, что также важно для первичной диагностики и оценки остаточной болезни. Сделано заключение о высокой информативности концепции Euro-Flow, необходимости более широкого внедрения соответствующих панелей в рутинную практику иммуноцитофлуориметрической диагностики гемобластозов с целью дальнейшей стандартизации иммунофенотипирования в онкогематологии.

Ключевые слова: консорциум Euro-Flow, 8-цветные панели моноклональных антител, онкогематология.

N.N. Tupitsyn, L.Yu. Grivtsova, N.A. Kupryshina

**HAEMATOPOIETIC MALIGNANCIES
IMMUNE DIAGNOSTICS BASED
ON EUROFLOW CONSORTIUM PROPOSALS:
8-COLOR FLOW CYTOMETRY**

FSBSI "N.N. Blokhin Cancer Research Center", Moscow

Summary

EuroFlow protocols on 8-color flow cytometry immune diagnostics of acute leukemia and malignant lymphoma were published. We present the analysis of Euroflow diagnostic concept in acute lymphoblastic leukemias (T-, B-lineage), acute myeloid leukemias, peripheral B-cell lymphomas, NK-cell lymphoproliferation

pherative disorders, and plasma cell tumors based on diagnostic samples from corresponding patients. The EuroFlow panels of monoclonal antibodies and fluorochromes are informative both for primary diagnostics and for monitoring of residual disease during treatment. As well EuroFlow diagnosticums include markers associated with repetitive chromosomal aberrations in leukemias and lymphomas, which are important for primary diagnosis and estimation of residual disease. It is concluded that EuroFlow concept is highly informative, the corresponding antibody panels should be wider introduced in routine practice of immune Flow cytometry diagnostics of haematopoietic malignancies aimed at further standardization of immunophenotyping in oncohaematology.

Key words: EuroFlow Consortium, 8-color monoclonal antibody panels, oncohaematology.

Введение

В ходе многолетней работы Европейского консорциума по проточной цитометрии (Euro-Flow) предложен новый стандарт иммунологической диагностики любых опухолей крови в соответствии с вариантами ВОЗ. Основой стратегии является высокотехнологичный подход – 8-цветная проточная цитометрия с использованием наиболее информативных комбинаций моноклональных антител и флуорохромных конъюгатов.

В лаборатории иммунологии гемопоэза в течении года проходили внедрение и апробация новых стратегических подходов. В данной статье приводится поэтапный разбор особенностей диагностики опухолей крови в соответствии с концепцией Euro-Flow.

Идентификация острых лейкозов

Первый этап диагностики – постановка и идентификация новых проб – проба ALOT (acute leukemia orientation tube) или идентификация острых лейкозов (СОЛ; рис. 1). Это всего лишь одна проба с 8 антителами различной специфичности. Их сочетание и/или взаимоисключение позволяет в более чем 98% случаев диагностировать и дифференцировать линейно острый лейкоз. Уже на данном этапе возможно определиться с типом бластных клеток – лимфоидные Т- или В-, либо миелоидные. Для идентификации бластной популяции стандартно на всех этапах диагностики, включая идентификация, используется CD45 антиген. В пробе оценивают 3 цитоплазматических маркера линейной принадлежности – CD3 (Т-клетки), МРО (миелоидная линия). В качестве наиболее специфичного цитоплазматического маркера В-клеток принят CD79a, а не традиционный CD22 – ввиду того, что цитоплазматическая экспрессия CD22 не является специфичной для В-клеток, экспрессию его демонстрируют также и нормальные базофилы, тучные и плазмоцитонидные дендритные клетки.

В качестве маркера клеток-предшественников справедливо выбран CD34, а не TdT, именно CD34 антиген экспрессирован на предшественниках всех линий без исключения.

Точно выверенная комбинация антигенов с успехом себя оправдала. На рис. 2 приведен пример идентификация. Бластная популяция четко выявлялась по экспрессии CD45 антигена (рис. 2А). Бластные клетки мономорфно экспрессировали в цитоплазме CD79 α и CD19 на мембране (рис. 2Б), но были отрицательны в отношении маркера клеток-предшественников, антигена CD34 (рис. 2Г). Экспрессия маркеров Т-клеток как цитоплазматических, так и мембранных, выявлялась только на остаточных лимфоцитах (обозначены синим цветом, рис. 2В). Необходимо отметить наличие фоновой реакции цитоплазматических CD3 на клетках гранулоцитарного ряда (обозначены фиолетовым рис. 2В). Также среди лимфоцитов выявлялись В-клетки. Миелопероксидаза расценена как отрицательная в сопоставлении с остаточными клетками гранулоцитарного роста (рис. 2Г). Таким образом, уже на этапе первичного идентификация становится понятно, что в данном случае это острый лимфобластный лейкоз В-клеточной природы.

В следующем случае на этапе идентификация выявлен острый лимфобластный лейкоз из Т-линейных предшественников. Бластные клетки достаточно отчетливо выявлялись по CD45 (рис. 3А). Экспрессия CD19 и CD79 α на бластах отсутствовала, выявлялась лишь небольшая пропорция CD19⁺CD79 α ⁺ В-клеток, не относящихся к опухоли (рис. 3Б), Данная популяция может служить в этом случае внутренним позитивным контролем в отношении экспрессии CD79 α . В тоже время, бластные клетки демонстрировали яркую экспрессию CD3 в цитоплазме и отсутствие данного антигена на мембране (рис. 3В бластные клетки обозначены красным цветом), при наличии внутреннего позитивного контроля по лимфоцитам (обозначены на рисунке синим). Незначительная часть бластов была слабо-позитивна в отношении CD34. Экспрессия миелопероксидазы была сомнительной, однако слабее чем на остаточных гранулоцитах, поэтому признана отрицательной (рис. 3Г, гранулоциты обозначены фиолетовым цветом).

Последний пример идентификация острого лейкоза – острый лейкоз миелоидной природы. В данном случае бластная популяция была достаточно выраженной и сложностей с разделением бластов от других клеток гранулоцитарного роста не возникло (рис. 4А, бластные клетки обозначены красным), также, что достаточно важно и полезно, присутствовала и отчетливая популяция лимфоцитов (выделено синим).

В-клеточная (рис. 4Б) и Т-клеточная природа бластных клеток отвергнуты (рис. 4В). Яркая экспрессия миелопероксидазы, сопоставимая с экспрессией маркера на гранулоцитах, подтвердила миелоидную природу бластных клеток (рис. 4Г), интересно отметить в данном случае гетерогенную экспрессию CD34.



Рис. 1. ALOT (СОЛ). Скрининг острых лейкозов.

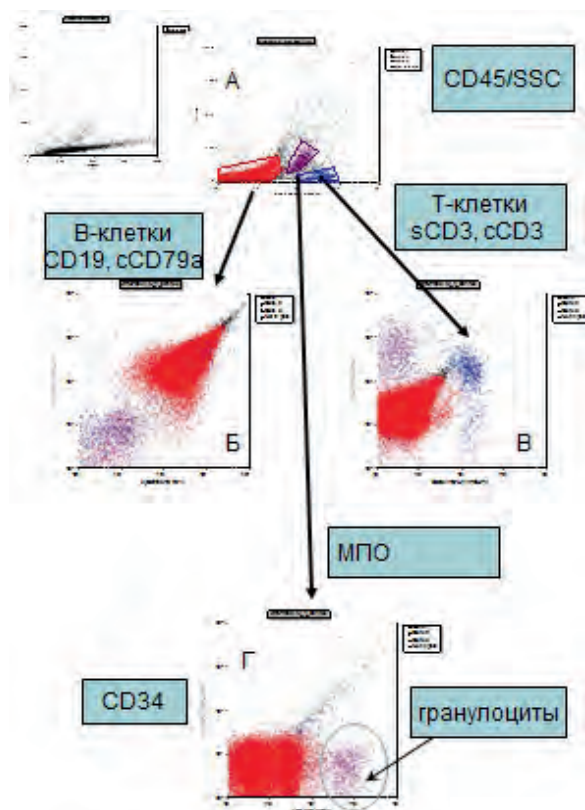


Рис. 2. ALOT: BCP-ALL CD34⁻.

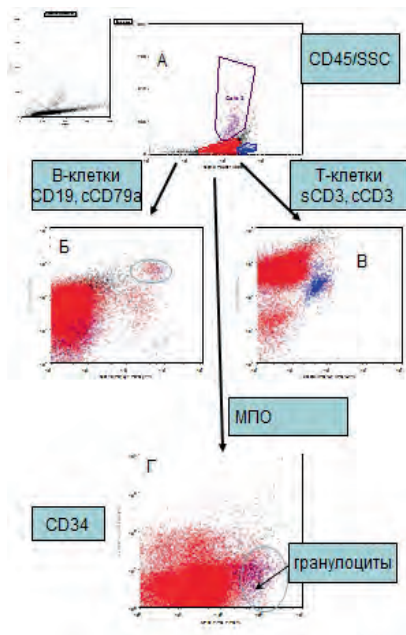


Рис. 3. ALOT: T-ALL.

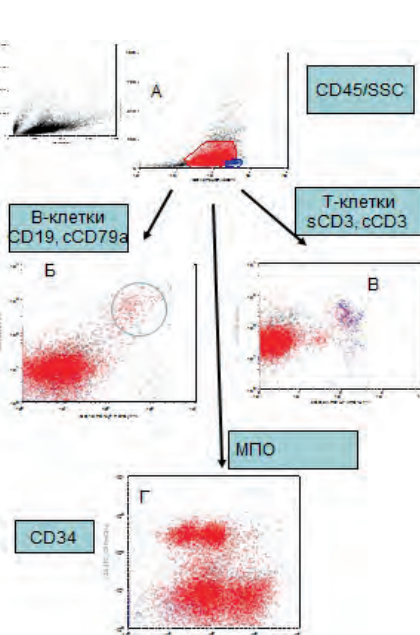


Рис. 4. ALOPT: AML

РасBlue V450	РасOr V500	FITC	PE	PE-сy5	Pe-сy7	APC	APC-H7
CD20	CD45	CD58	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38
1мкл	5мкл	7 мкл	10 мкл	7мкл	5мкл	5 мкл	3 мкл
sIg-k	CD45	cγIgμ	CD33	CD34	CD19	sIgM+CD117	sIg-λ
4 мкл	5мкл	10 мкл	5 мкл	7мкл	5мкл	10+5 мкл	4 мкл
CD9	CD45	nuTdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24
4 мкл	5мкл	10 мкл	7 мкл	7мкл	5мкл	5 мкл	5 мкл
CD21	CD45	CD15+CD65	NG-2	CD34	CD19	CD123	CD81
4 мкл	5мкл	10+7 мкл	10 мкл	7мкл	5мкл	7 мкл	5 мкл

Рис. 5. BCP-ALL (B-ОЛЛ). B-линейные острые лимфобластные лейкозы.

Острые лейкозы из в-линейных предшественников

За этапом идентификация следует этап уточняющей диагностики иммуноподварианта острого лейкоза, выявление возможных нетипичных профилей экспрессии антигенов, то есть лейкоз-ассоциированных иммунофенотипов (ЛАИ), связанных с аномалиями кариотипа. Выявление ЛАИ важно в отношении прогноза, и абсолютно необходимо для дальнейшего мониторинга МРБ. С этой целью при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников (В-ОЛЛ) предложена панель из 4 проб, включающих 8–10 антигенов, каждая (рис. 5). Каркасными в данном случае кроме CD45 являются также пан-В клеточный антиген CD19 и антиген клеток-предшественников CD34. Причем CD34 отражает внутриклональную гетерогенность злокачественных В-линейных предшественников и используется скорее в качестве антигена прогноза, а также для подтверждения опухолевой природы анализируемых клеток в случае асинхронной экспрессии, например антигена CD20. Другое подтверждение опухолевой природы В-клеток – нарушение нормальной кинетики иммунофенотипического созревания В-линейных предшественников может быть оценено по совокупности экспрессии CD10 и антигенов, ассоциированных с В-клеткой – CD20, CD24, CD22, Cy IgM, smIgM. Кроме того, может присутствовать aberrантная или эктопическая экспрессия антигенов других линий – CD33, CD13 – что также подтверждает опухолевую природу бластов.

Миелодные антигены CD13, CD33, CD117, (CD15⁺CD65) включены в панель диагностики В-ОЛЛ с целью выявления CD19⁺ ОМЛ, которые могли быть пропущены на этапе идентификации. Использование данной диагностической панели в полной мере позволяет разграничивать нормальные незрелые костномозговые В-линейные предшественники и злокачественные В-лимфобласты, выявить большинство изученных на настоящий момент ЛАИ.

Приводим пример уточняющей диагностики варианта острого лимфобластного лейкоза, идентификация которого приведен на рис. 2.

Проба 1 (рис. 6) сразу может дать представление об уровне злокачественной трансформации В-лимфобластов (про-В, пре-пре-В варианты) на основании сочетания экспрессии CD34, CD10, CD20, а также позволяет выявить aberrантность бластов в отношении экспрессии антигенов CD38 и CD58. Кроме того, можно предположить наличие гена BCR-ABL в случае гиперэкспрессии CD34, слабой экспрессии CD38 и наличию экспрессии KOR-Sa Sa3544 (CD66c). Бластные клетки демонстрируемого случая являлись CD10⁺CD34⁻ (рис. 6А, Б), поэтому однозначно дифференцировать менее зрелый и более зрелые В-линейный лейкоз на этапе первой пробы затруднительно. В отношении ЛАИ. Бластные клетки не экспрессировали CD34 (рис 6А), CD66c (рис. 6Б) и CD38 (рис. 6В), в то время как экспрессия CD58 была выраженной (рис. 6В).

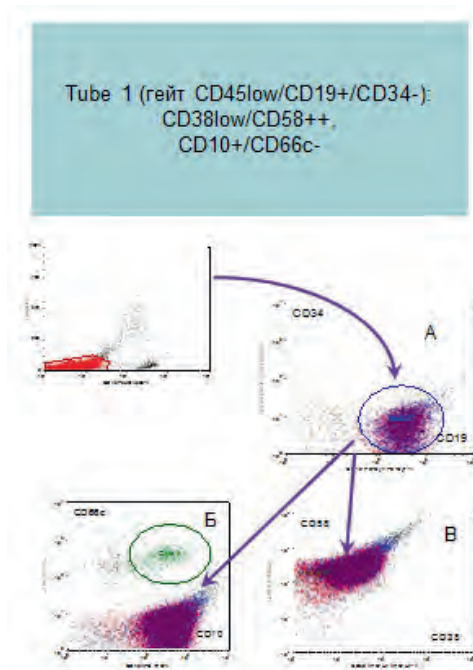


Рис. 6. BCP-ALL CD34-neg

Таким образом, в данном случае сочетание CD58⁺⁺/CD38^{+/-} может быть использовано для мониторинга МОБ в процессе терапии.

Проба 2 подтверждает наиболее ранний пре-пре-В иммуноподвариант острого лейкоза – отсутствие экспрессии легких цепей Ig (рис. 7А), отсутствие мембранной экспрессии μ-цепей иммуноглобулинов (рис. 7Б), в то время как цитоплазматическая их экспрессия выявлялась лишь в единичных клетках (рис. 7В). В данной пробе использован интересный прием взаимоисключения – объединены антиген CD117 и мембранная μ-цепь иммуноглобулинов. С-kit рецептор CD117 практически никогда не обнаруживается при В-ОЛЛ, а μ-цепь не экспрессируется в отсутствии цитоплазматических IgM. В нашем примере экспрессия CD117 на бластах отсутствовала, также как и экспрессия CD33, мембранные IgM выявлялись только на лимфоцитах (рис. 7Б, лимфоциты обозначены синим цветом).

Проба 3 подтверждает наиболее ранний этап дифференцировки злокачественных В-лимфобластов по экспрессии ядерной TdT (рис. 8Б) и позволяет предположить наличие реаранжировки E-2A-PBX1 на основании выраженной экспрессией CD9 на части бластов (рис. 8В)

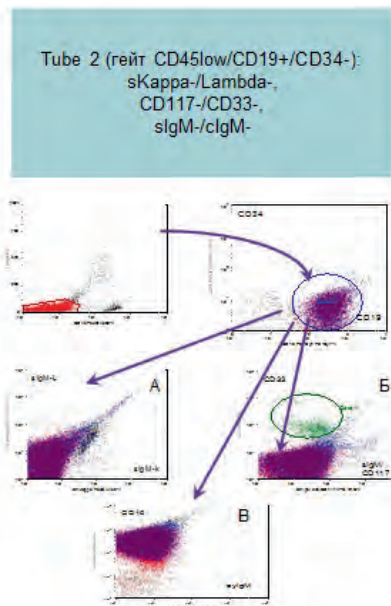


Рис. 7. BCP-ALL CD34-neg

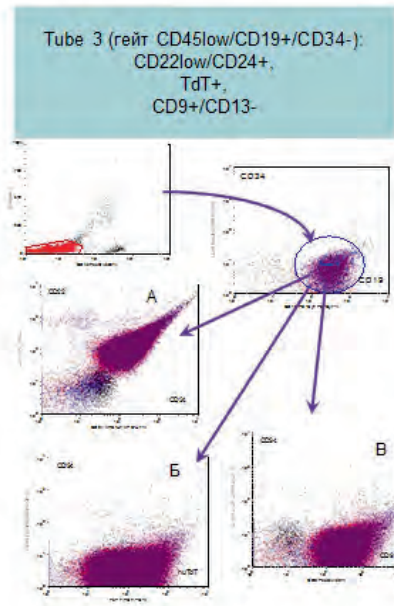


Рис. 8. BCP-ALL CD34-neg

Наконец, *проба 4* (рис. 9), важная не столько с целью диагностики, сколько в отношении выявления ЛАИ и прогноза. Здесь использован взаимодополняющий принцип – одновременная оценка CD15 и CD65, важных с целью исключения экспрессии данных антигенов, являющихся прогностическими при ОЛЛ. В нашем случае экспрессия CD15/CD65 была слабой (в сравнении с гранулоцитами отрицательной), а частая, но неспецифичная для В-лимфоцитов экспрессия NG2 антигена, ассоциированного с реаранжировкой MLL, отсутствовала (рис. 9А).

Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип характеризует CD123, однако экспрессия данного антигена не является стабильной. Отличить опухоль и регенерирующие лимфоциты может слабая в случае опухоли экспрессия молекулы тетраспанина CD81. В демонстрируемом варианте острого лейкоза отчетливой экспрессии CD123 на бластах не выявлено (рис. 9Б), тогда как экспрессия CD81 была, напротив, достаточной четкой.

Таким образом, установленный на этапе идентификация острый лейкоз из В-лимфоцитов определен иммунофенотипически как CD34⁻ пре-пре-В иммуноподвариант ОЛ с aberrантной экспрессией CD58 и CD38, с экспрессией CD9, CD81.

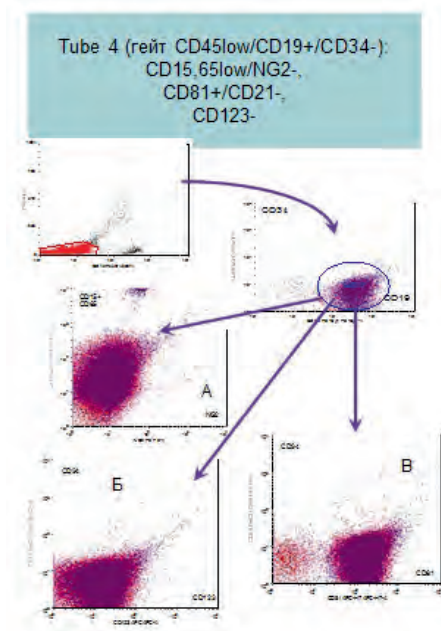


Рис. 7. BCP-ALL CD34-neg.

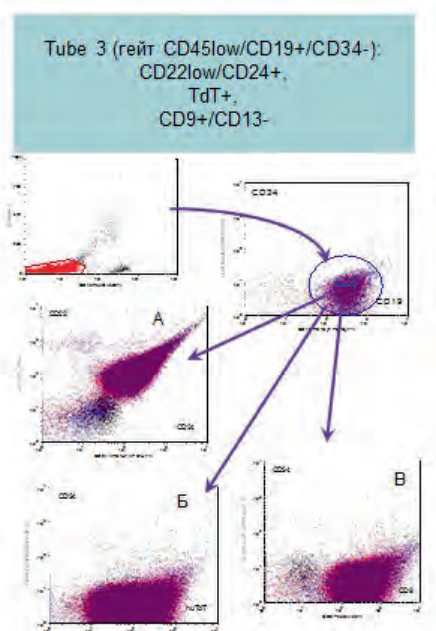


Рис. 8. BCP-ALL CD34-neg.

Острые лейкозы из t-линейных предшественников

Уточняющая иммунофенотипическая панель Т-ОЛЛ также включает 4 пробы (рис. 10), главная задача которых – выявление незрелых Т-клеток в костном мозге или периферической крови. Присутствие последних в данных органах аномально, поскольку Т-клеточное развитие происходит, главным образом, в тимусе. Исключение – опухоли средостения, при которых необходимо различать нормальные тимоциты и злокачественные. Иммунофенотипические профили, ассоциированные с повторяющимися аномалиями при Т-ОЛЛ, немногочисленны. Существуют аномалии иммунофенотипа, ассоциированные с типичным блоком созревания Т-клеток и профилями генной экспрессии. Пример: TLX-1 – кортикальные тимоциты. Несмотря на фенотипическое сходство нормального тимического созревания и опухолевых Т-клеток, многопараметровое иммунофенотипирование позволяет идентифицировать экспрессию белков, отличающих Т-ОЛЛ от нормальных тимических аналогов. Приводим разбор уточняющей диагностики Т-ОЛЛ, идентификация которого представлен на рис. 3. В данном случае $suCD3^+sCD3^-$ бластные клетки слабо экспрессировали CD5 (рис. 11А), бластные клетки обозначены зеленым, а лимфоциты – синим цветом), были разнородны в отношении CD10 и CD1a – часть бластов характеризовала слабая экспрессия CD10, часть бластов были CD1a⁺ (рис. 11Б).

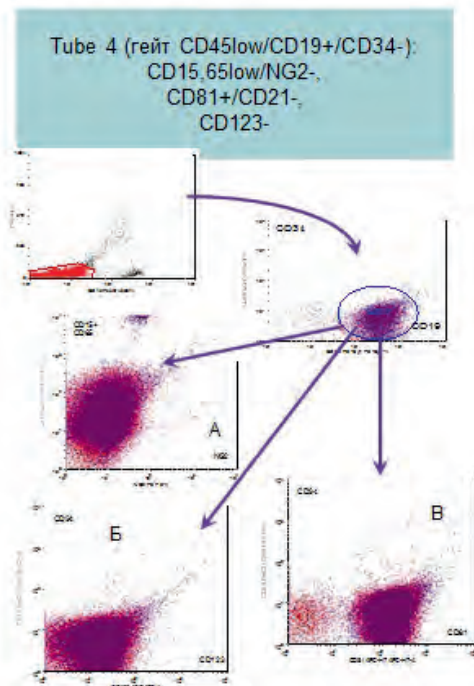


Рис. 9. BCP-ALL CD34-neg.

Т-линейные острые лимфобластные лейкозы

РисBlue V450	РисOrl V500	FITC	PE	PE-сy5	Pe-сy7	APC	APC-H7
сyCD3	CD45	пуТdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	сCD3
7мкл	5мкл	10 мкл	5 мкл	7мкл	5мкл	5 мкл	3 мкл
сyCD3	CD45	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	сCD3
7мкл	5мкл	5 мкл	5 мкл	7мкл	5мкл	2 мкл	3мкл
сyCD3	CD45	TCRγδ	TCRαβ	CD33	CD56	сyTCRβ	сCD3
7мкл	5мкл	10 мкл	7 мкл	7мкл	5мкл	3 мкл	3мкл
сyCD3	CD45	CD44	CD13	HLA-DR	CD45RA	CD123	сCD3
7мкл	5мкл	7 мкл	7 мкл	7мкл	5мкл	7 мкл	3 мкл

Рис. 10. T-ALL (Т-ОЛЛ).

Tube 1 (гейт CD45low/cyCD3+/sCD3-):
CD5low/CD10+/-/CD1a+/CD99low

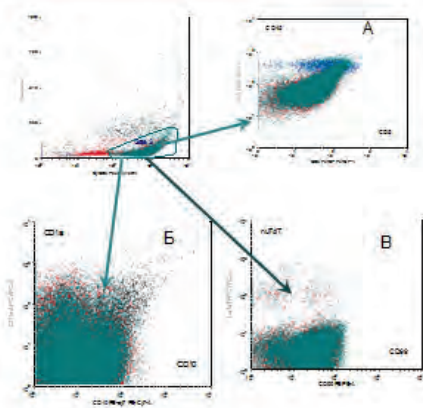


Рис. 11. T-ALL.

Tube 2/3 (гейт CD45low/cyCD3+/sCD3-):
CD4+/-/CD8+/-/CD117-/CD2+/TCRg'd-
/CD56-

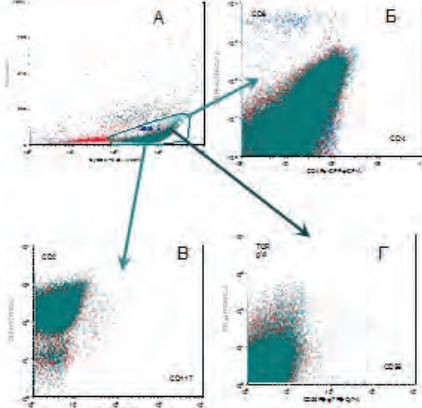


Рис. 12. T-ALL.

Експресія nuTdT відсутствовала, як і гіперекспресія CD99 (рис. 11В). Пробы 2 і 3 підтверджують, що частина бластних кліток відповідали по іммунофенотипу кортикальним тимоцитам CD4⁺CD8⁺ (рис. 12Б), були отрицательними в отношении CD117 і позитивними в отношении CD2 (рис. 12В). Експресія ґцепей TCR і антигена CD56 відсутствовала (рис. 12Г). На основанні пробы 4 установлено, що більшість бластних кліток не експресують CD123 (рис. 13А), на бластах не виявлено експресії миелоидного антигена CD13 і молекулы HLA-DR (рис. 13Б), а також молекул CD44, CD45RA (рис. 13В). Таким образом, совокупність даних може бути расценена як незрелый вариант Т-ОЛЛ.

Острые миелоидные лейкозы

Наиболее широкой среди уточняющих диагностических панелей EuroFlow является панель ОМЛ, включающая 7 проб. И это закономерно, так как в опухолевый процесс при ОМЛ может вовлекаться несколько клеточных линий и различных стадий созревания (рис. 14). Поэтому необходимо изучение и основных миелоидных линий – нейтрофильной моноцитарной, эритроидной, а так же плазмцитоидных дендритных клеток, базофилов, тучных клеток и мегакариоцитов.

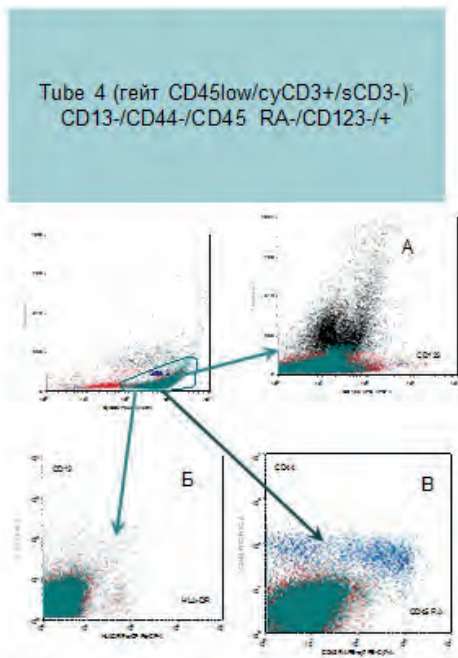


Рис. 13. T-ALL.

РacBlue\ V450	РacOr\ V500	FITC	PE	PE-cy5	Pe-cy7	APC	APC-H7
HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
1мкл	5мкл	20 мкл	7 мкл	5 мкл	5мкл	5 мкл	5 мкл
HLA-DR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
1мкл	5мкл	5 мкл	10 мкл	5 мкл	5мкл	5 мкл	5 мкл
HLA-DR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
1мкл	5мкл	5 мкл	10 мкл	5 мкл	5мкл	10 мкл	5 мкл
HLA-DR	CD45	пуТbТ	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
1мкл	5мкл	10 мкл	5 мкл	5 мкл	5мкл	2 мкл	5 мкл
HLA-DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
1мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	5 мкл	5 мкл	5 мкл	3 мкл
HLA-DR	CD45	CD42a/CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
1мкл	5мкл	1мкл/ 4 мкл	10 мкл	5 мкл	5 мкл	10 мкл	5 мкл
HLA-DR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9
1мкл	5мкл	1 мкл	10 мкл	5 мкл	5 мкл	1 мкл	5 мкл

Рис. 14. AML/MDS -миелодисплазии.

В панель включены 4 каркасных маркера (HLA-DR, CD45, CD34, CD117), несущие на себе несколько функций и в первую очередь позволяющие с высокой чувствительностью (более 88 % случаев) выявлять гетерогенную популяцию бластов миелоидной природы).

Проба 1 характеризует нейтрофильное созревание (рис. 15). В данном случае представлена подробная характеристика бластов при ОМЛ. Идентификация разобрана ранее и приведена на рис. 4. Большинство бластных клеток были CD13⁺, на части выявлена экспрессия CD34 и CD117. Сочетание CD34/CD11b выявило 2 популяции бластных клеток – ранние CD34⁺CD11b⁻ и более зрелые CD34⁻CD11b⁺. Однако экспрессия CD10 и CD16b, свойственная зрелым гранулоцитам, отсутствовала.

Проба 2 (рис. 16) характеризует моноцитарную линию дифференцировки, в данном случае – маркеры поздних стадий созревания моноцитов CD14, IREM-2 отсутствовали, так же не выявлено CD64⁺ клеток, однако на части установлена слабая экспрессия CD35, что может трактоваться двояко.

Проба 3 (рис. 17) характеризует эритроидный росток, начиная с самых ранних этапов дифференцировки, характеризуемых экспрессией CD117, CD34, HLA-DR, CD71 и постепенно нарастающей CD105, до поздних, иммунофенотип которых – CD34⁻CD117⁻ миелоидные – CD71⁺CD105^{low}-CD36⁺

У этого больного выявлена незначительная пропорция клеток с экспрессией трансферинового рецептора и эндогликана при отсутствии на данных клетках CD34.

Следующая проба, дифференцирующая линейную принадлежность бластов – *проба 6* (рис. 18). Она характеризует мегакариоциты, базофилы и тучные клетки, плазмоцитоидные дендритные клетки. В данном случае тучных клеток не выявлено, а МКЦ были единичными.

Проба 7 (рис. 19) дополняет и уточняет пробу 6, и у данного больного ранние предшественники МКЦ представлены единичными клетками.

Как и в случае ОЛЛ кроме диагностики линейной специфичности и стадийной принадлежности выявляется ЛАИ. Данный аспект характеризуют пробы 4 и 5. *Проба 4* (рис. 20) – выявление возможной коэкспрессии лимфоидных антигенов, ассоциированных с молекулярно-генетическими аномалиями как, например, в случае CD19 (наиболее типично для M2-варианта ОМЛ с t(8;22), или являющихся дополнительным признаком дисплазии, как в случае с CD7 и CD56.

Проба 5 (рис. 21) разработана для углубленной характеристики стволовых клеток и включает маркеры aberrантности. Так, NG2 не свойственен гемопоэтическим клеткам, но выявляется в 10% случаев при ОМЛ с реаранжировкой MLL. В рассматриваемом случае маркер отсутствовал. При этом бластные клетки экспрессировали CD15. Прогностически важным при ОМЛ является выявление среди бластов пропорции стволовых лейкозных клеток CD34⁺CD38⁻. Количество их у данного больного было выраженным.

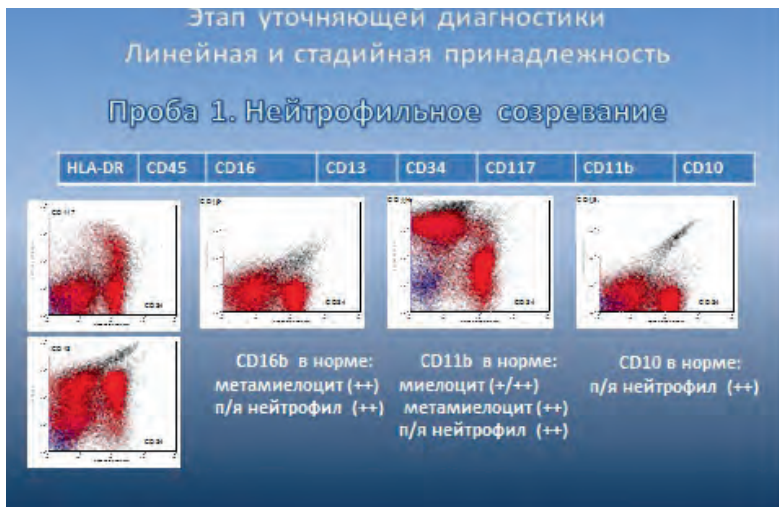


Рис. 15. AML/MDS -миелодисплазии.

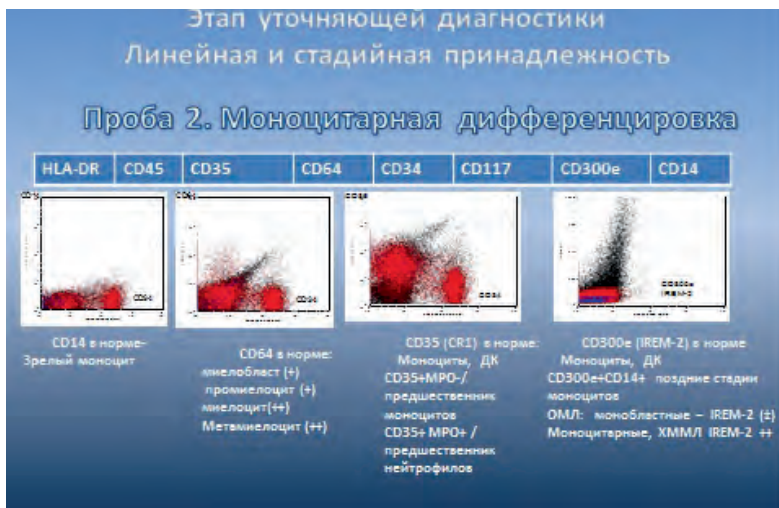


Рис. 16. AML/MDS -миелодисплазии.

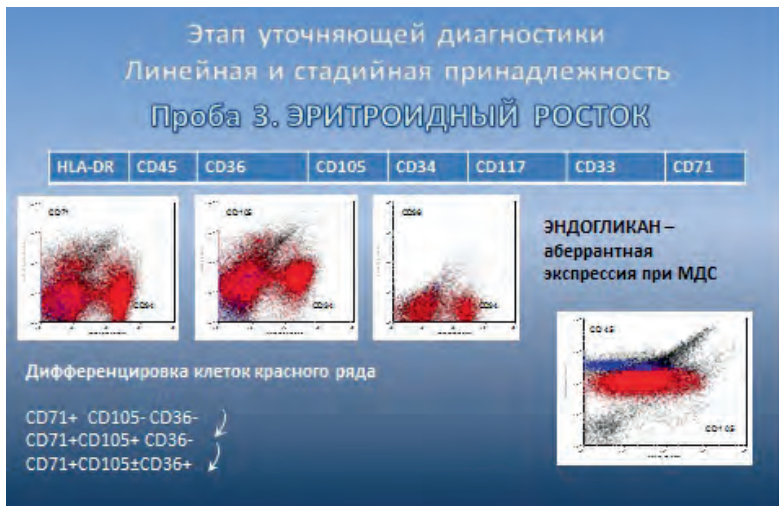


Рис. 17. AML/MDS -миелодисплазии.

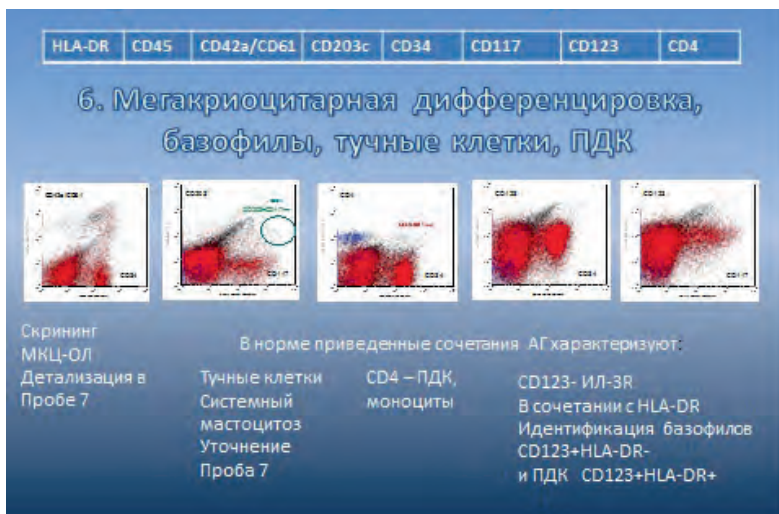


Рис. 18. AML/MDS -миелодисплазии.



Рис. 19. AML/MDS -миелодисплазии.

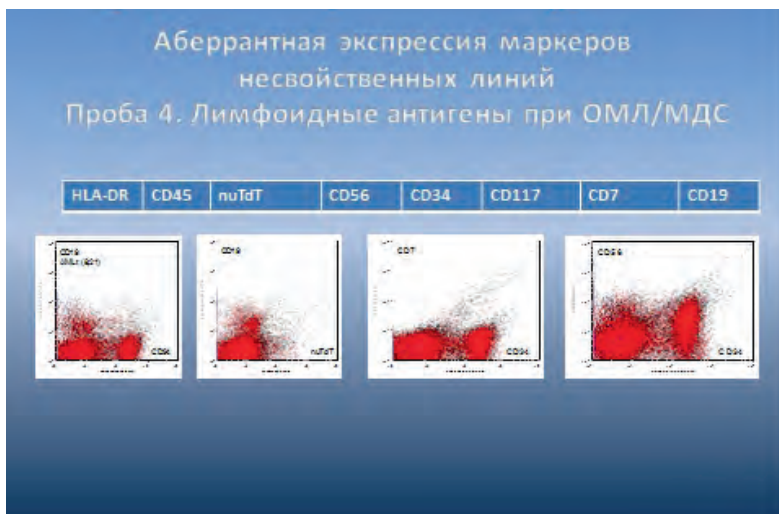


Рис. 20. AML/MDS -миелодисплазии.

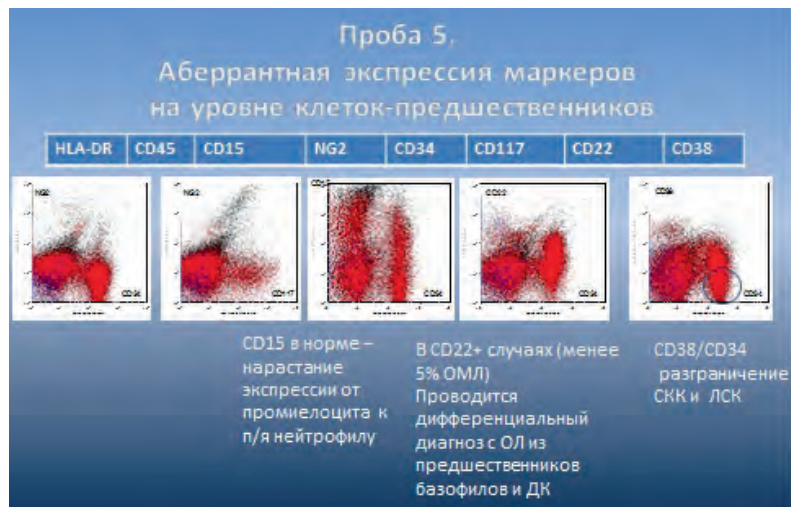


Рис. 21. AML/MDS -миелодисплазии.

Плазмочлеточные опухоли

Имунофенотипирование в настоящее время является стандартом диагностики и важным фактором прогноза при плазмочлеточных опухолях. На основании данных иммунофенотипирования проводится контроль эффективности терапии – оценка МОБ. Наиболее частыми среди плазмочлеточных неоплазий являются ММ и МГНЗ, реже встречаются экстрамедуллярные плазмочлеточные опухоли. Важность клинической информации многопараметрового иммунофенотипирования заключается в возможности идентификации и количественной оценки аберрантных плазматических клеток костного мозга в сравнении с нормальными.

Чем выше это соотношение, тем более высок риск злокачественного процесса (например, ММ). Сходным образом, присутствие < 5% нормальных плазматических клеток в общей популяции плазматических клеток костного мозга, также ассоциировано с худшим исходом симптоматической ММ и более высоким риском прогрессирования как при МГНЗ, так и при тлеющей ММ. Ряд маркеров и иммунофенотипических профилей (например, экспрессия CD28 и CD117) имеет ассоциацию со специфическими генетическими изменениями и исходом болезни.

Предложено большое число маркеров плазматических клеток. Консенсусные рекомендации включают CD38, CD138 и CD45 наряду с характеристиками светорассеяния в качестве каркасных маркеров для идентификации и количественной оценки плазматических клеток.

Консорциум Euro-Flow разработал панель из 12 моноклональных антител в 8-цветной проточной цитометрии, 2 пробы (рис. 22). Отобрано 4 каркасных маркера (CD38, CD138, CD45, CD19). Наиболее эффективно выявление плазматических клеток по сочетанию CD38 и CD138 (рис. 23) Антигены CD19 и CD45 предназначены для разграничения нормальных/реактивных плазматических клеток от клональных. Остальные 8 маркеров использованы для детальной характеристики плазматических клеток.

В целом пробы 1 достаточно для выявления, количественной оценки патологического клона и выявления aberrантной экспрессии антигенов с целью дальнейшего мониторинга МОБ. Так, например, у больного с ММ, первая проба которого продемонстрирована на рис. 24, отчетливо выявляется популяция плазматических клеток с отсутствием CD19 и экспрессией на мембране клеток β_2 микроглобулина (рис. 24Б). Кроме того, плазматические клетки демонстрировали очень слабую экспрессию CD45, в то время как экспрессия важного для диагностики антигена CD56, характеризующего aberrантный фенотип плазмочитов, была выраженной (рис. 24В). Проба 2 помимо упомянутых каркасных антигенов содержит маркеры CD81, CD117, CD28, CD27 и может быть использована по показаниям для более подробной характеристики плазматических клеток. В описываемом случае дополнительно выявлено отсутствие экспрессии CD81, что является aberrантным признаком и, возможно, может рассматриваться как неблагоприятный фактор прогноза (рис. 25Б). Кроме этого, опухолевые клетки были CD27⁺CD28⁺ (рис. 25В) и не экспрессировали CD117 (рис. 25Г).

Во втором демонстрационном случае ММ большинство клеток костного мозга были представлены плазматическими клетками (рис. 26А), которые, как и у первого больного, были CD19⁻CD56⁺CD45^{low} (рис. 26Б–В). Отличием их от предыдущего варианта было отсутствие мембранной экспрессии β_2 микроглобулина (рис. 26Б). При дальнейшей детализации выявлен ряд дополнительных иммунофенотипических отличий.

На части опухолевых плазмочитов выявлена экспрессия тетраспанина CD81 (рис. 27Б), отсутствие экспрессии CD28 (рис. 27В) и выраженная экспрессия CD117 (рис. 27Г), что, как уже упомянуто, ассоциировано с генетическими аномалиями и находит отражение в течение и исходе болезни.

Зрелоклеточные лимфопролиферативные заболевания

Диагностика зрелоклеточных ЛПЗ основана на иммунологической верификации субстрата опухолевых клеток.

Метод проточной цитофлуориметрии позволяет определить принадлежность опухолевых клеток к линии В-клеточных, Т-клеточных или НК-клеточных ЛПЗ, стадию дифференцировки, выявить коэкспрессию антигенов, характерных для данной опухоли, которая может быть использована для мониторингирования остаточного опухолевого клона.

РасBlue V450	РасOr V500	FITC	PE	PE-cy5	Pe-cy7	APC	APC-H7
CD45	CD138	CD38	CD56	B2- micro	CD19	cyIg- kappa	cyIg- lambda
5 мкл	4 мкл	5 мкл	5мкл	5 мкл	5 мкл	2,5 мкл	4 мкл
CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81
5 мкл	4 мкл	5мкл	20 мкл	10 мкл	5 мкл	5 мкл	5 мкл

Рис. 22. Плазмочеточные опухоли.

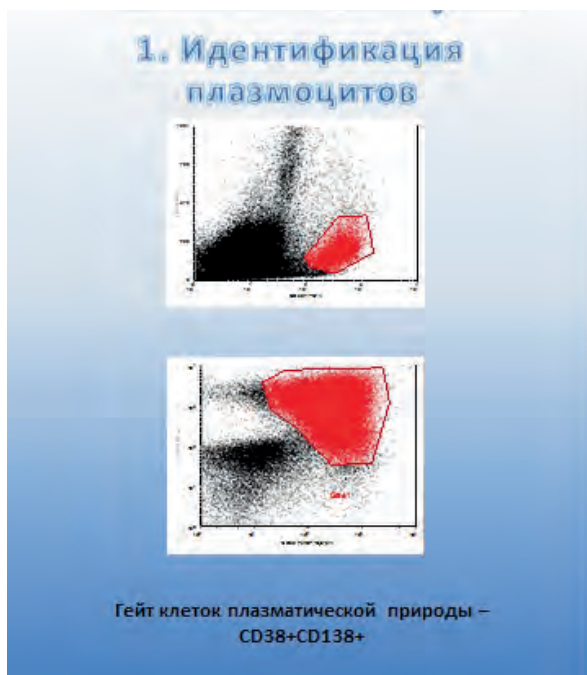


Рис. 23. Плазмочеточные опухоли.

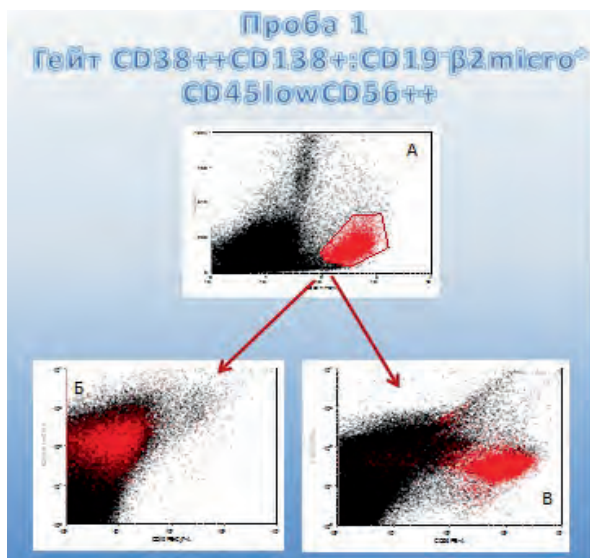


Рис. 24. Плазмоклеточные опухоли.

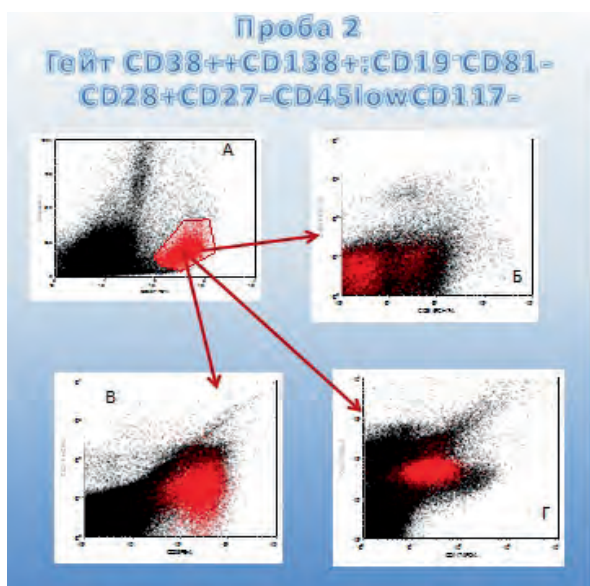


Рис. 25. Плазмоклеточные опухоли.

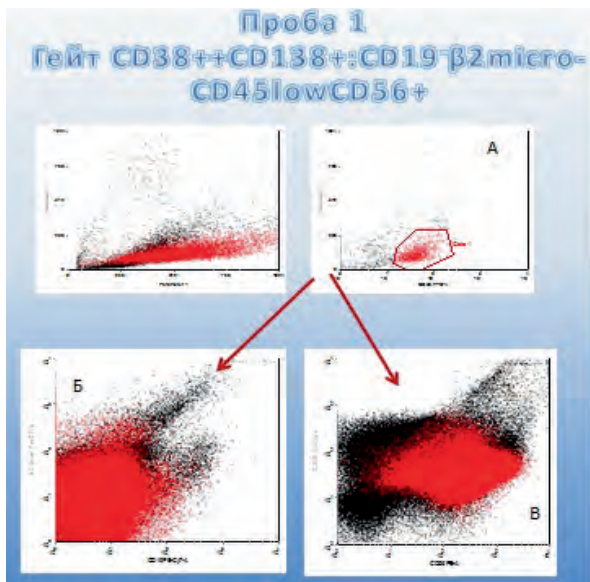


Рис. 26. Плазмноклеточные опухоли.

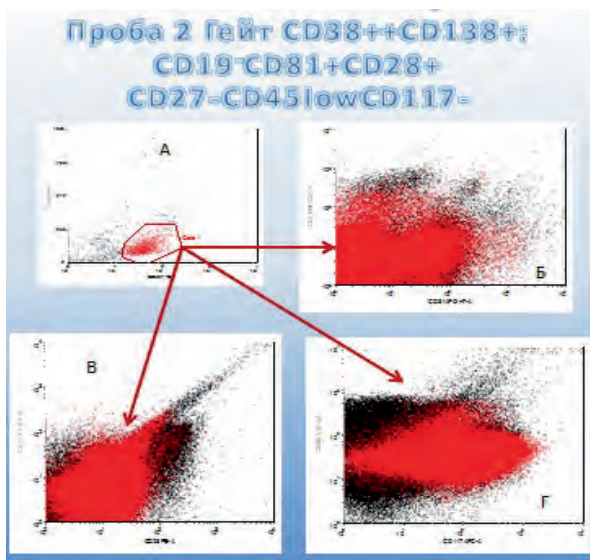


Рис. 27. Плазмноклеточные опухоли.

Также как и в протоколе, предусмотренном для диагностики острых лейкозов, на первом диагностическом этапе предложена идентификационная панель моноклональных антител, позволяющая определиться с направленностью дифференцировки клона лимфоцитов (рис. 28).

В этой пробирке подобраны 12 антител, с помощью которых в абсолютном большинстве случаев удастся установить принадлежность опухолевых клеток к Т- или В-клеточным лимфомам, НК-клеточным, а также опухолям из плазматических клеток. В качестве стандартного для идентификации лимфоидной популяции используется общелейкоцитарный антиген CD45 (рис. 29А, рис. 30А). CD45 позволяет провести отличие от негемопоэтических клеток, эритроидных предшественников, выявить доминирующую популяцию среди лейкоцитов. Благодаря использованию двух комбинаций взаимоисключающих маркеров в одном красителе, появилась возможность оценки не 8, а 12 антигенов. В пробе оценивают Т-клеточные антигены CD3, CD5, CD4, CD8 и TCR $\gamma\delta$. Для определения В-клеточной дифференцировки – антигены CD19 и CD20 – что в сочетании с яркой экспрессией CD45 бывает достаточно для суждения о В-клеточной клональности. Так, у больного, идентификация лимфоцитарных популяций которого приведен на рис. 29, выявлено существенное преобладание В-клеток (рис. 29Б) с коэкспрессией CD5 (рис. 29В) при отсутствии/слабой экспрессией легких цепей иммуноглобулинов на мембране (рис. 29Г).

Таким образом, на этапе идентификации у больного выявлен CD5⁺ В-клеточный процесс. Выявление выраженной пропорции CD56⁺ лимфоцитов может свидетельствовать об НК-клеточной природе опухоли, как это демонстрирует идентификационная проба, приведенная на рис. 30. В данном случае количество Т-лимфоцитов (CD3⁺) было достаточно выраженным, а число В-лимфоцитов не превышало средние нормальные показатели (рис. 30 Б). Вместе с тем, среди лимфоидной популяции выявлены CD56⁺ CD3⁻CD5⁻ клетки (рис. 30Д, Е), количество которых было существенным.

Подобная ситуация требует дальнейшей диагностики и динамического наблюдения с целью уточнения природы НК-клеточного лимфоцитоза.

Наличие маркера CD38 на CD45 слабопозитивных или отрицательных клетках в сочетании с типичными характеристиками светорассеяния, при условии отсутствия экспрессии других антигенов, на этапе постановки пробы идентификация лимфопролифераций требует углубленной диагностики в отношении плазмоклеточного варианта процесса. Выбор большего числа антигенов, относящихся к Т-линии, не случаен. Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания трудны для диагностики. Т-лимфоциты в норме преобладают среди остальных популяций клеток. Наличие аберрантности и/или коэкспрессии или нарушение соотношения CD4/CD8 могут указать на необходимость подтверждения или исключения диагноза Т-клеточной лимфомы.

Скрининг зрелоклеточных лимфопролиферативных заболеваний

РасBlueV4 50	РасOrV 500	FITC	PE	PE-cy5	Pe-cy7	APC	APC-H7
CD20/CD4	CD45	CD8/sIg-λ	CD56/sIg-κ	CD5	CD19/TCR γδ	sCD3	CD38
1 мкл/ 0,5 мкл	5 мкл	5 мкл/ 5 мкл	5мкл/ 5 мкл	15мкл	5 мкл/ 1 мкл	2,5 мкл	3 мкл

Рис. 28. LST.

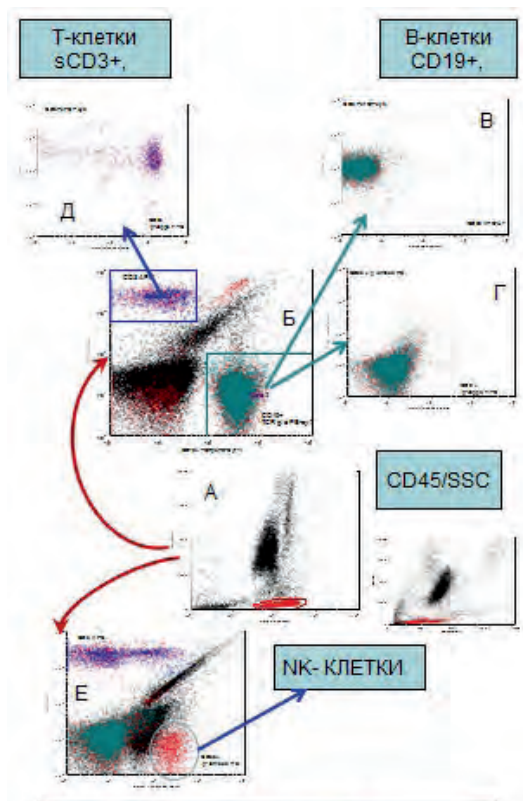


Рис. 29. LST: B-CPLD.

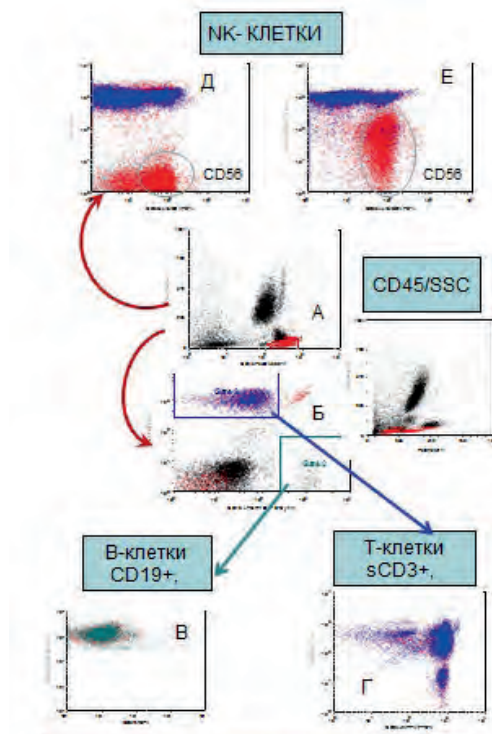


Рис. 30. LST: NK-CLPD.

РасBlue V450	РасOr V500	FITC	PE	PE- cy5.5	Pe-cy7	APC	APC-H7
CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
1 мкл	5 мкл	2,5 мкл	20 мкл	5 мкл	5 мкл	1,25 мкл	5 мкл
CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	sIgM	CD81
1 мкл	5 мкл	10 мкл	10 мкл	5 мкл	5 мкл	10 мкл	5 мкл
CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185	CD49d
1 мкл	5 мкл	2 мкл	20 мкл	2 мкл	5 мкл	10 мкл	2 мкл
CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	
1 мкл	5 мкл	2,5 мкл	10 мкл	10 мкл	5 мкл	2,5 мкл	

Рис. 31. B-CLPD.

После того, как определена линия дифференцировки лимфоцитов (Т-, В- или НК-), следует этап дифференциальной диагностики внутри каждого из вариантов лимфомы. Для этих целей диагностическая панель для В-клеточных лимфом состоит из 4 пробирок (по 8 маркеров в каждой); для Т-клеточных – из 6, для НК-клеточных – из 3.

Периферические в-клеточные лимфомы

Зрелые (периферические) В-клеточные опухоли. Диагностика этих вариантов лимфом осуществляется в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 года и строится на поиске нормального аналога злокачественных В-клеток, соответствующего тому или иному этапу активации и созревания В-лимфоцитов (рис. 31). Для более точной характеристики патологического клона лимфоцитов в каждую из 4 пробирок вносят так называемые каркасные маркеры, на основании которых и производится гейтирование. Выбор таких каркасных антигенов при зрелых В-клеточных ЛПЗ представляет значительные трудности, обусловленные неоднородностью экспрессии ряда антигенов при различных нозологических формах. Так, например, при В-ХЛЛ отмечается слабая экспрессия CD20; известны случаи фолликулярной и диффузной В-крупноклеточных лимфом с aberrантно низкой экспрессией CD19. Таким образом, в качестве каркасных для В-клеточных опухолей были выбраны CD19 и CD20 (наряду с CD45), обеспечивающие в 89–98 % случаев точное обнаружение В-клеток. Добавление антигена CD22 к каркасным позволяло во всех случаях идентифицировать В-клетки.

Маркеры дифференциальной диагностики В-клеточных лимфом включают в себя уже хорошо известные и ставшие неотъемлемой частью диагностических панелей антигены, такие как CD10, CD5, CD23, CD38, CD79b; для ВКЛ – CD103 и CD11c (обращает на себя внимание отсутствие в панели CD25). В-клеточные лимфомы представляют собой гетерогенную группу заболеваний, обнаружение атипичного иммунофенотипа даже внутри одной нозологической единицы не является редкостью.

В качестве примера можно привести случаи В-ХЛЛ с отсутствием/слабой экспрессией CD5 или CD23; мантийноклеточной лимфомы – напротив, с наличием CD23. Это привело к поиску новых информативных клеточных маркеров, которые, наряду с традиционными, позволят проводить точную дифференциальную диагностику вариантов В-клеточных опухолей и выявлять редкие варианты aberrантного иммунофенотипа. Так в панели Euro-Flow нашли свое место новые антигены – CD200, CD305 (LAIR-1), CD185 (CXCR5) и ряд других.

CD200 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. В норме гетерогенную экспрессию этой молекулы обнаруживают на разных (тимоциты, покоящиеся и активированные Т- и В-лимфоциты и др.) клетках. Опухолевые

клетки В-ХЛЛ отличаются сверхэкспрессией этого антигена на своей поверхности, слабая или негативная реакция с CD200 отличает лимфому из клеток маргинальной зоны (ЛКМЗ) и используется как дифференциально-диагностический признак. Также высокие показатели экспрессии CD200 показаны на клетках ВКЛ.

По рекомендации Euro-Flow для диагностики ВКЛ в панель включен еще один маркер – CD305 (LAIR-1). Трудности обычно возникают при дифференциальной диагностике ВКЛ и ЛКМЗ, так как иммунофенотип может характеризоваться отсутствием/наличием одного из диагностических маркеров (CD11c, CD103 или CD25). С целью уточняющей диагностики этих заболеваний и внесен этот маркер. Наиболее яркая экспрессия наблюдалась при ВКЛ (80–100% позитивных В-клеток), в то время как при ЛКМЗ экспрессия CD305 практически отсутствует. При В-ХЛЛ экспрессия этого антигена широко варьирует и не является постоянной. Предложенный алгоритм позволяет установить типичные иммунофенотипические образцы для большинства случаев восьми главных нозологий периферических В-клеточных лимфом – хронического лимфолейкоза, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза/лимфомы (ВКЛ) и лимфоплазмоцитарной лимфомы.

На рис. 32 приведен пример дальнейшего иммунофенотипирования CD5⁺ В-клеточного лимфоцитоза, идентификация которого представлен ранее (рис. 29). Так, проба 1 диагностической панели дает нам практически полное представление о дифференциальном диагнозе CD5⁺ В-клеточных лимфом. В представленном случае В-клетки не экспрессировали CD10, но были мономорфно позитивны в отношении CD23 (рис. 32В). Кроме того, В-клетки продемонстрировали экспрессию CD43, являющегося суррогатным маркером CD5, тогда как экспрессия CD79b, типичная для периферических В-клеточных лимфом, а также для нормальных периферических В-лимфоцитов, отсутствовала (рис. 32Г, в пробе выявляется незначительное количество нормальных В-клеток, являющихся в данном случае позитивным контролем).

Проба 2 (рис. 33) позволяет исключить волосатоклеточный лейкоз на основании отсутствия CD11c и CD305, однако, экспрессия LAIR при В-ХЛЛ является вариабельной и в данном случае может быть расценена как слабопозитивная (рис. 33В). В данную пробу включен антиген CD81 (в приводимом примере В-клетки CD81-негативны, рис. 33Б), являющийся важным маркером aberrантности клеток при В-ХЛЛ для дальнейшей оценки эффекта терапии и мониторинга остаточных опухолевых клеток в процессе лечения.

Пробы 3 и 4 дают дополнительную очень подробную информацию о маркерах aberrантности и прогноза (рис 34), и в представленном случае В-клетки ХЛЛ имели фенотип CD103⁻/CD49d⁻/CD95⁻/CD22^{low}/CD62L^{low}/HLA-DR⁺/CD27^{low}.

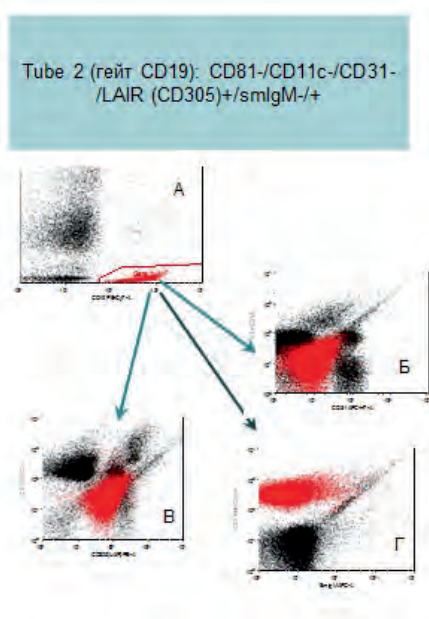
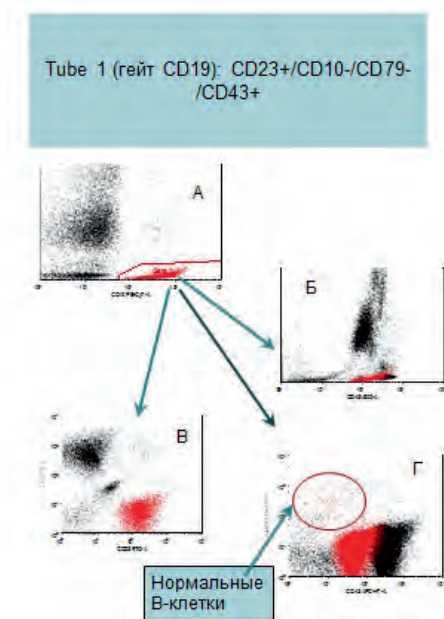


Рис. 32. CD5⁺B-CLPD: B-CLL.

Рис. 33. CD5⁺B-CLPD: B-CLL.

Периферические т-клеточные лимфомы

Зрелые (периферические) Т-клеточные опухоли. Эта группа лимфом составляет ~ 10% от всех периферических лимфом. Они возникают из пост-тимических зрелых Т-лимфоцитов и представляют собой весьма гетерогенную группу заболеваний. Зачастую их относят к наиболее агрессивным лимфомам. Исключение составляют грибовидный микоз, первичная анапластическая лимфома кожи и лимфома/лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-БГЛ). К настоящему времени накопленных знаний недостаточно для определения нормального клеточного эквивалента для каждой из Т-клеточных лимфом. Тем не менее, для некоторых видов Т-клеточных лимфом он установлен. Например, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома является отчетливым субтипом Т-клеточных лимфом и происходит из Т-хелперных клеток фолликулярных центров, а CD4⁺CD25⁺суFOXP3⁺ регуляторные Т-клетки – наиболее близкий нормальный аналог Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых.

Анапластическая крупноклеточная лимфома в зависимости от экспрессии гена *ALK* может быть представлена двумя подтипами с различным прогнозом. Клетки Т-пролимфоцитарного лейкоза в значительной части случаев гиперэкспрессируют киназный коактиватор Tc11 вследствие хромосомной перестройки

гена *TCL1*. Однако наиболее частой в классификации ВОЗ 2008 г. остается периферическая Т-клеточная лимфома неспецифицированная (около 30% всех Т-клеточных лимфом), что свидетельствует об отсутствии достаточных знаний для определения нормального клеточного эквивалента для Т-клеточных лимфом.

Как уже было сказано выше, иммунодиагностика Т-клеточных лимфом направлена на обнаружение Т-клеток с признаками aberrантности (рис. 35). В качестве каркасных были использованы 4 антигена CD45, smCD3, CD4 и CD8. Для дополнительной характеристики Т-клеток из широкой панели моноклональных антител были отобраны те, которые наиболее часто могут быть aberrантно экспрессированы при Т-клеточных лимфоопролиферативных заболеваниях.

Таким образом, в панель вошли пан-Т-клеточные антигены CD2, CD5 и CD7; антигены к маркерам Т-клеточной дифференцировки CD27, CD197 (CCR7), CD45RA, CD45RO; ко-стимуляторным молекулам – CD26 и CD28; маркерам активации – CD25, CD38, CD69, HLA-DR; рецептору интерлейкина ИЛ-2 – CD122; молекулам, связанным с цитотоксичностью эффекторных Т-больших гранулярных лимфоцитов – CD11c, CD16, CD56, CD57; Ig-подобным рецепторам киллерных клеток – CD158, NKB1; рецепторам лектинового типа – CD94, CD161; а также цитоплазматическим белкам перфорину, гранзимам, TIA-1. В иммунодиагностику включены также молекулы, связанные со специфическими подтипами Т-клеточных лимфом, такие как CD30, суТс11 и, с маркерами фолликулярных CD4⁺ Т-клеток – CD10, CD279.

Предложенный подход позволил четко отличить патологические клетки периферических Т-клеточных лимфом (синдрома Сезари, Т-пролимфоцитарного лейкоза, Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых, CD4⁺ Т-БГЛ, ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы) от нормальных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Маркерами дифференциальной диагностики синдрома Сезари явились CD2, CD26, CD7; при Т-пролимфоцитарном лейкозе наблюдается экспрессия суТс11. Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых характеризуется как позитивная по HLA-DR и CD25; CD4⁺ Т-БГЛ имеет маркеры CD28, су-Гранзим В, CD7. Для ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы характерен иммунофенотип CD279, HLA-DR, smCD3.

Лимфоопролиферативные процессы из Т-клеток с яркой экспрессией CD8 (CD8^{hi}) в большинстве случаев возможно отличить по иммунофенотипу от нормальных Т-лимфоцитов (CD8^{hi}), причем наиболее информативны маркеры CD45RO, CD27, су-Гранзим В, CD28, CD57, CD45RA. При разграничении патологических CD4⁺/CD8^{-lo} Т-клеток от нормальных аналогов к числу наиболее важных маркеров относятся CD28, су-Гранзим В, CD45RA, CD16, CD11c и CD27.

Имунофенотипических различий между CD8^{hi} TCRαβ Т-БГЛ и CD8^{hi} неспецифицированной Т-клеточной лимфомой не установлено.

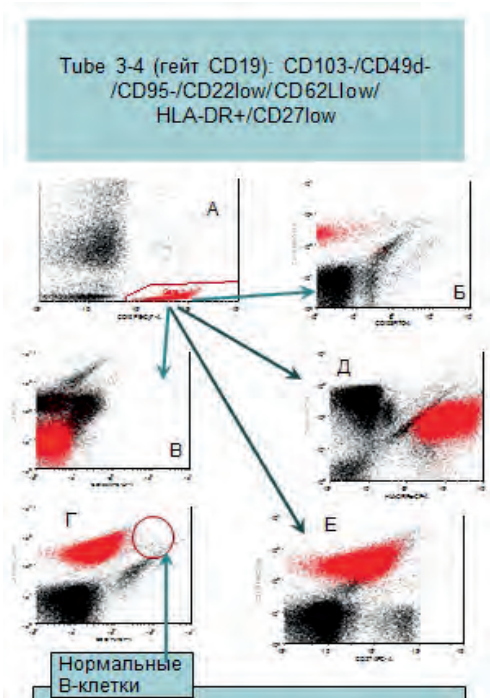


Рис. 34. CD5⁺B-CLPD: B-CLL.

РисBlue V450	РисOrV500	FITC	PE	PE-cy5.5	Pe-cy7	APC	APC-H7
CD4	CD45	CD7	CD26	smCD3	CD2	CD28	CD8
0,5 мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл	2 мкл	10 мкл	5 мкл
CD4	CD45	CD27	CD197	smCD3	CD45 RO	CD45 RA	CD8
0,5 мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл	2 мкл	10 мкл	5 мкл
CD4	CD45	CD5	CD25	smCD3	HLA-DR	cyTCL1	CD8
0,5 мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл	5мкл	2 мкл	5 мкл
CD4	CD45	CD57	CD30	smCD3		CD11c	CD8
0,5 мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл		2 мкл	5 мкл
CD4	CD45	Cy-Perforin	Cy-granzim B	smCD3	CD16	CD94	CD8
0,5 мкл	5мкл	10 мкл	15 мкл	10 мкл	2 мкл	5 мкл	5 мкл
CD4	CD45	-	cyCD279	smCD3			CD8
0,5 мкл	5мкл		20 мкл	10 мкл			5 мкл

Рис. 35. T-CLPD.

РасBlue V450	РасOr V500	FITC	PE	PE- cy5.5	Pe-cy7	APC	APC-H7
CD2	CD45	CD7	CD26	smCD3	CD56	CD5	CD19
1 мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл	5мкл	2,5 мкл	5 мкл
CD16	CD45	CD57	CD25	smCD3	CD56	CD11c	CD19
5 мкл	5мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл	5мкл	2 мкл	5 мкл
HLA-DR	CD45	Cy-Perforin	Cy-granzim B	smCD3	CD56	CD94	CD19
1 мкл	5мкл	10 мкл	15 мкл	10 мкл	5мкл	5 мкл	2 мкл

Рис. 36. NK-CLPD.

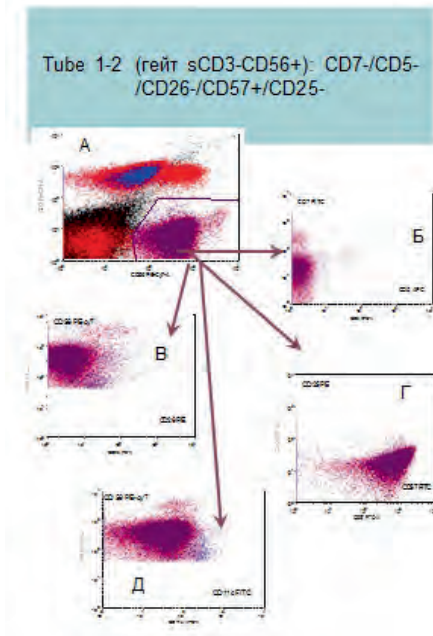


Рис. 37. NK-CLPD.

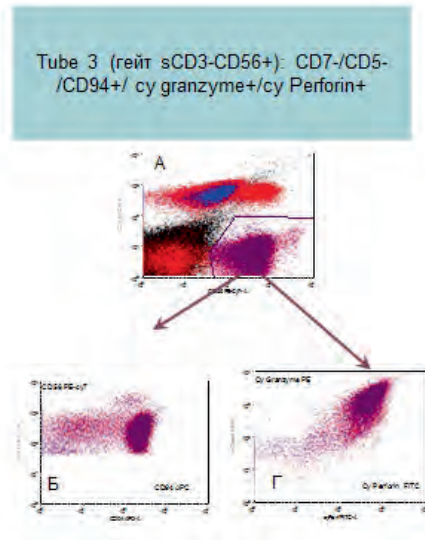


Рис. 38. NK-CLPD.

Также не выявлено различий в фенотипе между $CD4^-/CD8^{-/lo}$ TCR $\gamma\delta$ T-БГЛ и $CD4^-/CD8^{-/lo}$ гепатоспленической T-клеточной лимфомой.

НК-клеточные лимфопролиферативные заболевания

НК-клеточные лимфопролиферативные заболевания относятся к числу редких (менее 1% от всех лимфом).

В соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. выделяют 3 нозологии: агрессивный НК-клеточный лейкоз, экстранодальная (назальный тип) НК/Т-клеточная лимфома и хроническое лимфопролиферативное заболевание из НК-клеток. Заподозрить НК-клеточную пролиферацию можно уже на этапе идентификация по абсолютному или относительному увеличению числа $CD56^+$ или $CD56^{lo}/CD45^{hi}$ клеток при отсутствии экспрессии $smCD3$, $CD4$, $TCR\gamma\delta$ и $CD19$ (продемонстрировано на рис. 30). В этих случаях следует проводить углубленную иммунодиагностику НК-клеточных опухолей по панели Euro-Flow (рис. 36).

В качестве каркасных при диагностике НК-клеточных лимфом использованы 4 маркера: $CD45$, $smCD3$, $CD56$ и $CD19$. Набор добавочных маркеров достаточно широк. К ним относятся классические антигены, ассоциированные с НК-клетками – $CD2$, $CD5$, $CD7$, $CD8$; низкоаффинный рецептор $Fc\gamma RIII$ -рецептор $CD16$; маркеры активации – $CD26$, $CD38$, $CD45RO$, $CD69$, $HLA-DR$), рецепторы ИЛ-2 – $CD25$, $CD122$; цитотоксические молекулы – $CD11c$ и $CD57$; цитоплазматические энзимы – перфорин, гранзимы и $TIA-1$. Критериями необходимости использования антител явилась их способность дифференцировать нормальные/реактивные НК-клетки от иммунофенотипически aberrантных, оценка цитотоксического эффекторного фенотипа и стадии созревания количественно увеличенных НК-клеток.

Aberrантные или клональные НК-клетки имеют уникально измененные типы экспрессии $CD2$, $CD7$, $HLA-DR$, $CD94$ в сравнении с нормальными и реактивными НК-клетками, хотя и существует некоторый перекрест. Для подтверждения природы $CD56^{lo}$ НК-клеток полезен антиген $CD16$. Вышеперечисленные антигены относятся к маркерам первой линии. Для оценки цитотоксического эффекторного фенотипа и стадии созревания анализируемых НК-клеток используются маркеры, экспрессированные на терминально дифференцированных цитотоксических клетках – $CD11c$, $CD57$, перфорин, гранзим В. Они являются маркерами второго уровня, так как не позволяют отличить нормальные НК-клетки от aberrантных.

Рис. 37 демонстрирует детальное иммунофенотипирование $CD56^+$ -лимфоцитоза, рассмотренного выше (рис. 30). Так, пробы 1 и 2 сочетают в себе маркеры и первой ($CD7$, рис. 37Б), и второй линий ($CD57$, рис.37Г). В приводимом примере НК-клетки были $CD7^+CD57^+$. Проба 3 подробно характеризует цитотоксический фенотип и включает маркер первой линии $CD94$ (рис. 38Б), ярко экспрессируемый в данном случае и цитоплазматические маркеры поздних стадий дифференцировки НК-клеток – перфорин и гранзим В, которые также были выраженными (рис. 38В).

Таким образом, предложен комплексный подход к иммунофенотипированию опухолей кроветворной системы, позволяющий многосторонне изучать не только бластную популяцию, но и остаточные лимфоциты и гранулоциты с точки зрения их иммунофенотипических особенностей при различных опухолях крови.

Литература

1. *Тупицын Н.Н.* Иммунология клеток крови. – глава 6 в национальном руководстве Гематология (под ред. проф. О.А. Рукавицына) – М., ГЭОТАР–Медиа, 2015. – стр. 69-79.
2. *Тупицын Н.Н.* Иммунодиагностика острых лейкозов и неходжкинских лимфом. Глава 3 в кн.: Клиническая онкогематология (под ред. проф. М.А. Волковой). Изд. второе, перераб. и допол. – М.: Медицина, 2007. – с. 66-75
3. *Kalina T., Flores-Montero J., van der Velden V.H. et al.* EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012 – 26(9) – p. 1986-2010
4. *van Dongen J.J., Lhermitte L., Böttcher S. et al.* EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 – 26(9). P. 1908–75.
5. *Craig F.E., Foon K.A.* Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. – *Blood*. – 2008. – V. 11 (6). – p. 3941–67.
6. *Chu S.C., Wang T.F., Li C.C. et al.* Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. – *Leuk. Res.* – 2011. – 35(7) – p. 868–73.
7. *Loken M.R., van de Loosdrecht A., Ogata K. et al.* Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. – *Leuk. Res.* 2008 Jan; 32(1): 5-17.
8. *Van Lochem E.G., van der Velden V.H.J., Mind H.K. et al.* Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease – induced shifts. – *Cytometry Part B*. – 2004.- v. 60B.- p. 1-13.

I.S. Dolgopолов, G.Z. Chkadua, G.L. Mentkevich

**РОЛЬ И МЕСТО ИММУНОТЕРАПИИ
В ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ:
НЕКОТОРЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ**

ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

Резюме

Иммунотерапия рака – быстроразвивающаяся и перспективная область медицины, прошедшая за последнее десятилетие путь от лабораторий до клинических исследований. Благодаря активной работе по изучению механизмов взаимодействия иммунной системы с клетками опухоли и ее микроокружения, разработаны теоретические основы этого направления в лечении рака. В статье представлены клинические случаи эффективного применения различных моделей иммунотерапии у педиатрических пациентов с метастазами солидных опухолей в легкие.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что иммунотерапия рака должна рассматриваться, как одно из перспективных направлений в онкологии. Воздействие на различные звенья иммунитета с одной стороны позволяет получить клинический эффект в случаях, когда «стандартные» методы исчерпаны, а с другой стороны – приблизиться к пониманию механизмов осуществления иммунологического надзора в целом.

Ключевые слова: иммунотерапия, детская онкология, дендритные вакцины.

I.S. Dolgopолов, G.Z. Chkadua, G.L. Mentkevich

**DOES IMMUNOTHERAPY PLAY ROLE
IN THE TREATMENT OF PEDIATRIC CANCER:
SOME CLINICAL OBSERVATIONS**

FSBSI “N.N. Blokhin Cancer Research Center”, Moscow

Abstract

Immunotherapy of cancer is entering into a new phase of active investigation both at the pre-clinical and clinical level. This is due to the exciting developments in basic immunology and tumor biology that have allowed a tremendous increase in our understanding of mechanisms of interactions between the immune system and tumor cells. Clinical approaches are diverse but can now be based on strong scientific rationales. This article presents some clinical observations which reveal effects of immunotherapy in potentially incurable pediatric patients with lung solid tumor metastases. The analysis of the available clinical results suggests that, de-

spite some disappointments, there is room for optimism that both active immunotherapy (vaccination) and adoptive immunotherapy may soon become part of the therapeutic arsenal to combat cancer in a more efficient way.

Key words: immunotherapy, children tumors, dendritic vaccines.

Рак – одна из наиболее серьезных проблем современного мира, оказывающая влияние не только на судьбы отдельных людей, но и на глобальные показатели здоровья населения и экономику стран. Современная терапия онкологических заболеваний опирается на хирургию, лучевую и химиотерапию, возможности которых достигли своего предела к началу XXI века. Иммунотерапия рака – одно из направлений науки, способное склонить замершую чашу весов в пользу человека. Прошло уже более 100 лет с тех пор, как П. Эрлих предложил концепцию противоопухолевого иммунитета, и более 50 лет с тех пор, как М. Бюрне и Д. Томас заложили основы современной иммунотерапии [1–3]. С тех пор многие элементы этой головоломки встали на свои места. Появилось понимание роли микроокружения в процессах, происходящих в опухолях [4]. Приоткрылись механизмы функционирования дендритных клеток, воспалительных цитокинов, НК-клеток и различных популяций Т-лимфоцитов [5–7]. В рамках экспериментальных протоколов получены клинические результаты у пациентов с лейкозами, лимфомами, сблидными опухолями, опухолями ЦНС при использовании дендритных вакцин [8], моноклональных антител [9], опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов [10], НК-клеток [11]. Активно ведутся работы по внедрению в практику Т-лимфоцитов с химерными (CAR Т-лимфоциты) рецепторами [12–14].

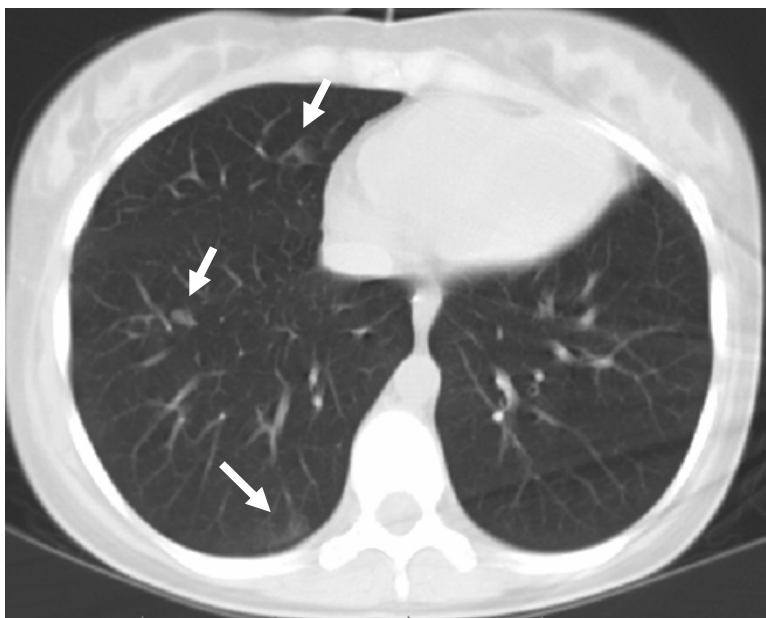
По мере накопления клинического опыта все острее встает вопрос: а существует ли противоопухолевый иммунитет как отдельное звено? Или необходимо влиять на все звенья иммунитета, а вернее – не влиять, а задавать им желаемый вектор действия? Недаром единственная сертифицированная дендритная вакцина против рака простаты не базируется на селективных биоинженерных технологиях, а модулирует ответ иммунной системы человека на относительно неспецифическую простатическую щелочную фосфатазу [15].

Работа по изучению возможностей иммунотерапии рака, осуществляемая нами в рамках экспериментальных клинических протоколов в течение последних 15 лет, включала в себя как проведение полноценных гаплоидентичных трансплантаций у пациентов с лейкозами (n = 56) и сблидными (опухоли семейства саркомы Юинга n = 7, нейробластома, n = 8) опухолями, так и использование различного рода цитотоксических лимфоцитов и дендритных вакцин (нейробластома, n = 25; опухоли печени, n = 7; остеосаркома, n = 6; опухоли ЦНС, n = 30).

В качестве противоопухолевых вакцин использовали аутологичные дендритные клетки (ДК), нагруженные опухолевыми антигенами (лизатом опухоли).

Аутологичные цитотоксические Т-лимфоциты (аутоЦТЛ) получали за счёт стимуляции лимфоцитов пациента аутологичными или аллогенными ДК, нагруженными опухолевыми антигенами. Для генерации аллогенных цитотоксических Т-лимфоцитов (аллоЦТЛ) использовали донорские лимфоциты, которые культивировали *in vitro* совместно с ДК пациента, также нагруженными опухолевыми антигенами. Способы получения описаны ранее [16]. Данная публикация посвящена некоторым результатам, полученным у больных с метастазами солидных опухолей в легкие. Обобщить результаты (ввиду уникальности каждого больного и течения его патологического процесса) не представляется возможным. Но даже в виде отдельных наблюдений последние представляют интерес, позволяют сделать некоторые заключения и указывают на направление дальнейшего развития метода иммунотерапии.

Наблюдение 1 (2003 год). Пациентка 16 лет, страдала ОССЮ правой плечевой кости; первично получила 10 курсов конвенциональной ПХТ, ЛТ и была радикально прооперирована с установкой эндопротеза локтевого сустава. Через 6 мес после окончания терапии на КТ органов грудной клетки отмечено появление множественных метастазов в легких. В качестве второй линии терапии был проведен курс ICE и произведена одномоментная резекция из обоих легких выявленных метастазов. Гистологически признаков лечебного патоморфоза не выявлено. В раннем послеоперационном периоде отмечено появление 2 новых опухолевых очагов в правом легком. В рамках программы терапии резистентных опухолей пациентке проведена гаплоидентичная аллогенная трансплантация ГСК. Режим сниженной интенсивности включал в себя флюдарабин, бусульфан, АТГ и тотальное облучение легких в дозе 10,8 Гр. Трансплантировано $2,2 \times 10^6$ СД34/кг ($6,7 \times 10^8$ СД3/кг) от совместимой по 4/6 HLA антигенам, без предварительных *in vitro* манипуляций. Профилактика острой РТПХ включала в себя циклоспорин и метотрексат на д +1; +3 и +7. Восстановление лейкоцитов $> 1,0 \times 10^9$ /л отмечено на д +12. Полный донорский лейкоцитарный химеризм установился на д + 90. Следует отметить необычно раннее начало (уже к концу 2 месяца после трансплантации) распространенной хронической РТПХ с поражением кожи, глаз, периартикулярных тканей, пищеварительного тракта и легких. В посттрансплантационном периоде по данным КТ легких отмечено уменьшение размеров метастазов на д +30 и их полное исчезновение к д +90 (рис. 1). Полная ремиссия сохранялась в течение всего периода наблюдения (17 мес.) на фоне распространенной хронической РТПХ, которая и стала причиной гибели пациентки от явлений дыхательной недостаточности и фиброзирующего бронхоальвеолита. Данное наблюдение продемонстрировало наличие эффекта «трансплантат-против-опухоли» у пациента после гаплоидентичной (т.е. частично совместимой) родственной трансплантации.



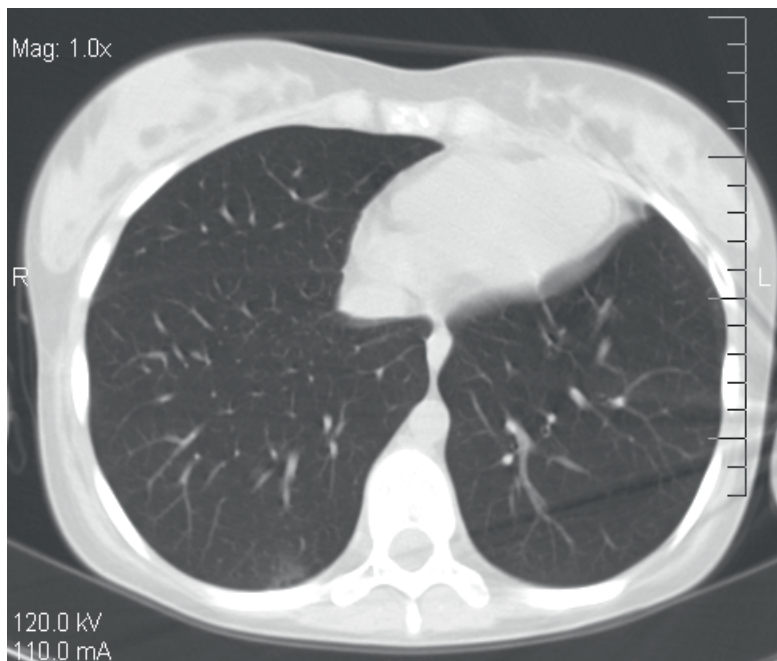


Рис. 1. Динамика метастазов в легкие ОССЮ после гаплоидентичной трансплантации

- а) до трансплантации
- б) День +30 после трансплантации. Сокращение метастазов.
- с) День +90 после трансплантации. Метастазы не определяются, ремиссия в течение 17 мес. наблюдения.

Т.к. предположение о том, что цитостатический эффект флюдарабина, бусульфана в дозе 8 мг/кг и лучевой терапии в дозе 10,8 Гр могли вызвать длительную ремиссию у интенсивно предлеченного пациента с ранним быстро прогрессирующим метастатическим рецидивом ОССЮ, не может рассматриваться всерьез. Скорее сочетание бусульфана и лучевой терапии внесли свой негативный вклад в развитие фатального легочного процесса на фоне хронической РТПХ. С другой стороны, в мировой литературе показана четкая взаимосвязь противоопухолевого эффекта аллогенной трансплантации и РТПХ. В наших исследованиях, при проведении гаплоидентичных трансплантаций пациентам с прогрессирующей или рецидивной диссеминированной нейробластомой, эта связь так же четко прослеживалась. У пациентов с рецидивом нейробластомы по костному мозгу в посттрансплантационном периоде отме-

на иммуносупрессии и связанная с этим активация РТПХ, позволяли получить повторную ремиссию. Причем добиться ремиссии по костному мозгу удавалось неоднократно. К сожалению, нарастание РТПХ приводило к развитию угрожающих жизни патологических синдромов и состояний, а начало ее активного лечения сводило на нет все противоопухолевые феномены, и способствовало прогрессированию нейробластомы. Несколько лет работы в этом направлении позволили сделать следующие выводы и предположения.

Во-первых, иммунотерапия является перспективным направлением терапии опухолей, достойным дальнейшего изучения.

Во-вторых, иммунологические феномены, развивающиеся после гаплоидентичной трансплантации, способны оказывать влияние на солидные опухоли, резистентные к химиолучевой терапии, однако мы неспособны управлять ими.

В-третьих, обязательная иммуносупрессия в посттрансплантационном периоде негативно влияет на становление противоопухолевого иммунитета.

Различного рода манипуляции с трансплантатом (клеточная деплеция и селекция) не решают проблемы, т.к. либо приводят к глубокому и длительному иммунодефициту при проведении глубокой деплеции, либо все равно требуют иммуносупрессии, пусть и в меньших объемах.

Вопреки ожиданиям, попытки подливать после трансплантации донорские НК-клетки и т.п. не оказались панацеей. Вероятно, причина здесь кроется в нашем непонимании, на данном этапе, механизмов иммунитета противоопухолевого, да и иммунитета в целом.

В настоящее время мы ведем программу терапии резистентных, инкурабельных солидных опухолей, в рамках которой делаем попытку подобрать ключи к решению проблемы контроля злокачественных клеток на фоне иммуносупрессии, неизбежной после гаплоидентичной трансплантации.

1. Начинаем с выбора потенциального донора среди совершеннолетних членов семьи пациента.
2. Готовим индивидуальные противоопухолевые дендритные вакцины на базе дендритных клеток донора и опухолевого материала реципиента.
3. Потенциальный донор вакцинируется этой вакциной с целью формирования у него противоопухолевого клона лимфоцитов, а также – лимфоцитов памяти.
4. После появления реакции гиперчувствительности замедленного типа в местах инъекций вакцины (что является, в нашем понимании, сигналом: цель достигнута), у донора собирают периферические ГСК для трансплантации пациенту.
5. Трансплантат переливаем без предварительных манипуляций.
6. В посттрансплантационном периоде проводим стандартную иммуносупрессию.

7. Параллельно в лаборатории происходит наращивание цитотоксических лимфоцитов превакцинированного донора на дендритных клетках, нагруженных лизатом опухоли реципиента. Эти лимфоциты регулярно трансфузируем пациенту после трансплантации в периоде аплазии кроветворения и глубочайшей иммунодепрессией с целью контроля роста резидуальных злокачественных клеток. Сразу после восстановления кроветворения и установления донорского химеризма у реципиента начинаем цикл вакцинаций больного противоопухолевыми дендритными вакцинами на основе дендритных клеток донора.
8. Мы предполагаем, что наличие у реципиента лимфоцитов памяти, сформировавшихся в процессе вакцинации донора, позволит пациенту ответить на специфическую антигенную стимуляцию, несмотря на проводимую иммуносупрессию. При этом учитывая целенаправленный характер иммунного ответа, не будет появления или обострения РТПХ.

Пример 2. Больной 9 лет. 2 рецидив диссеминированной ОССЮ в 2013. Первично – ОССЮ таза, в связи с чем он получил 10 курсов ХТ и операцию, после чего находился в ремиссии в течение 13 месяцев от окончания терапии. В связи с первым комбинированным рецидивом (таз, легкие) в сентябре 2013 г. пациент получил ХТ 2 линии; ЛТ 10,8 Гр на легкие; ВХТ с трансплантацией аутологичных КПП и лучевую терапию на первичную опухоль в дозе 52 Гр с полным эффектом. При контрольном обследовании через 11 мес. от ВХТ выявлены очаги в обоих легких. Рецидив был доказан гистологически после торакоскопической операции. В сентябре 2014 г. пациент взят на экспериментальную программу лечения. Мать, выбранная в качестве донора, получила 3 вакцинации, на фоне которых развилась выраженная реакция ГЗТ в местах введения вакцины с транзитной реакцией региональных лимфатических узлов. В октябре 2014 г. после проведения кондиционирования, включающего флюдарабин, треосульфан, мелфалан и АТГ, были трансплантированы неманипулированные периферические стволовые клетки в дозе $6,6 \times 10^6$ СД34⁺/кг и $2,2 \times 10^8$ СД3⁺/кг. Профилактика РТПХ включала такролимус и метотрексат. Донорские цитотоксические лимфоциты в дозе $3,4 \times 10^8$ СД3/кг, перелиты в дни +4; +7 и +11. Восстановление лейкоцитов $> 1,0 \times 10^9$ /л зафиксировано на д +15. Через 24 часа после 3 трансфузии донорских цитотоксических лимфоцитов (д +12) отмечено появление зудящей сыпи, что расценено, как острая РТПХ I степени. После короткого курса стероидов все проявления к д +23 купированы. На д +20 зафиксирован полный донорский химеризм. С д +28 начато введение пациенту донорских дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом с интервалом 1 раз в 3 недели. После первой вакцинации отмечено появление реакции ГЗТ в месте введения вакцины в виде папулы 1–1,5 см. (рис. 2).



Рис. 2. Реакция ГЗТ на фоне вакцинации дендритной противоопухолевой вакциной у пациента после гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Всего проведено 3 вакцинации, сопровождающихся нарастанием реакции ГЗТ. Признаков острой РТПХ нет. Наблюдается формирование локализованной формы хронической кожной РТПХ. После 2 месяцев полной ремиссии, в январе 2015 на КТ грудной клетки отмечено появление легочных метастазов в зонах прежней локализации.

Других локализаций рецидива и новых очагов в легких не выявлено. В феврале 2015 г удалены видимые метастазы из левого легкого. Планируется продолжение иммунотерапии и удаление одиночного метастаза из правого легкого, при условии отсутствия новых опухолевых очагов.

Таким образом, проведение предложенной нами схемы иммунотерапии не вызвало активации острой РТПХ или формирование непреодолимой токсичности в посттрансплантационном периоде, и не сказалось негативно на восстановлении кроветворения и иммунитета после гаплоидентичной трансплантации.

Также за этот период не отмечено изменения в показателях здоровья донора, получившего вакцинации противоопухолевыми дендритными вакцинами. Продолжение иммунотерапии с одновременным удалением видимых опухолевых очагов продиктовано постулатом, что, по всей видимости, количество опухолевых клеток в очаге имеет значение для результатов терапии.

Иммунная система, если и способна контролировать опухоль, то лишь субклинические очаги, сформированные относительно небольшим количеством опухолевых клеток. Также возможно, что количество вводимых донорских ЦТЛ и формирующихся в организме пациента на фоне иммуносупрессии, недостаточно для контроля крупных очагов.

Соответственно, кажется логичным удалять видимые метастазы, существовавшие до начала лечения очаги, если они появляются – в надежде на то, что клетки иммунной системы будут успешно бороться с более мелкими очагами болезни, обеспечивая ремиссию.

Показательно в этом смысле следующее наблюдение.

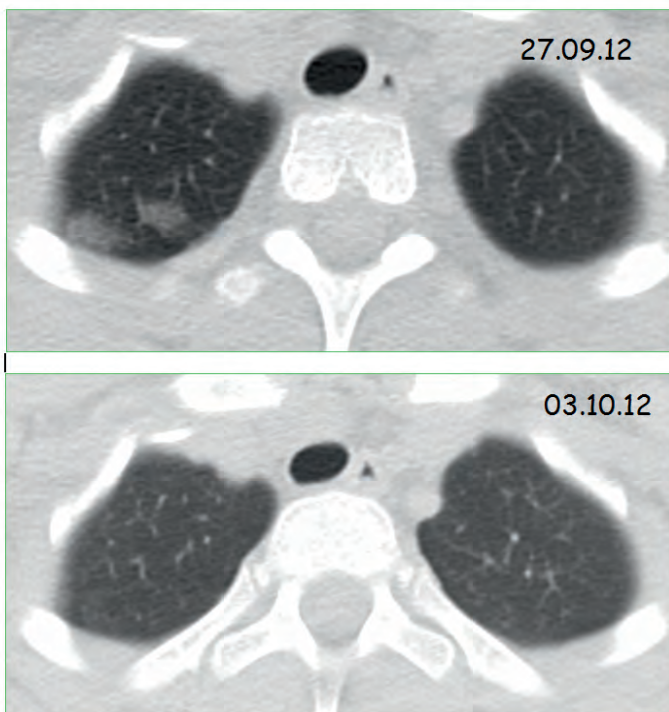
Пример 3. Девочка 5 лет, диагноз: гепатобластома IV стадии с метастазами в легких; получила 4 курса химиотерапии по месту жительства. Уровень АФП снизился на фоне терапии с 608 (перед первым курсом ХТ) до 388 МЕ/мл (после 4 курса ХТ). По данным КТ легких отмечен полный регресс метастазов. Пациентка госпитализирована в НИИ ДОиГ для оперативного вмешательства в объеме левосторонней гемигепатэктомии перед которым отмечен рост АФП до 2737 МЕ/мл; последний нормализовался в послеоперационном периоде на фоне 2 курсов конвенциональной ХТ. Через 4 мес. от окончания терапии отмечен рост уровня АФП до 88 МЕ/мл, появление метастазов в обоих легких. В процессе проведения 4 курсов ХТ второй линии с марта по июль 2011 г отмечается нормализация АФП и регресс легочных метастазов. Через 3 мес. (сентябрь 2011 г) отмечено нарастание АФП, уровень которого достиг к декабрю 2011 г. 294 МЕ/мл. Тогда же диагностированы 2 метастаза в легких до 0,7 см в диаметре каждый. Пациентка была включена в программу иммунотерапии. В течение первых 3 мес. получила 4 введения дендритной вакцины ($2-4 \times 10^6$ клеток) и 5 введений аутоЦТЛ ($3,5-7 \times 10^8$ клеток). Реакция ГЗТ отмечена после первого введения дендритной вакцины. Реакции на введение аутоЦТЛ не было. Наблюдался рост АФП до 438 МЕ/мл и увеличение размеров легочных метастазов до 1,2 см в диаметре. Новых очагов в легком не было. В марте 2012 г было решено ввести аллоЦТЛ ($6,5 \times 10^8$ клеток) против аутологичных ДК пациента, нагруженных АФП ($6,5 \times 10^8$ клеток). Интересно: если первое введение сопровождалось выраженной общевоспалительной реакцией с ознобом и лихорадкой $> 39^{\circ}\text{C}$, то второе, с интервалом в 48 ч, вызвало лишь незначительное повышение температуры тела до $37,7^{\circ}\text{C}$. В июле 2012 г. при контрольном обследовании уровень АФП 2282 МЕ/мл. На КТ грудной клетки и брюшной полости определяются 2 ранее выявленных метастаза в легких размером $1,5 \times 1,5 \times 1,6$ см, других проявлений болезни нет. Произведена атипичная резекция 2 сегментов легкого в пределах здоровых тканей. При гистологическом исследовании: к идентификации пригодно 100% злокачественных клеток, признаков лечеб-

ного патоморфоза нет. В послеоперационном периоде проведено по одному введению аутоЦТЛ ($7,65 \times 10^8$) и аллоЦТЛ ($2,5 \times 10^8$). В обоих случаях ЦТЛ было получены против дендритных клеток пациента, нагруженных опухолевым лизатом. Через 3 мес. от операции (октябрь 2012 г) констатирована полная ремиссия (АФП < 5 МЕ/мл). В этот период больная однократно вакцинирована аутологичной ДВ. От дальнейшей терапии родители отказались. В настоящее время у пациентки в течение 28 мес. от окончания иммунотерапии сохраняются клинико-лабораторная и рентгенологическая ремиссия.

Не менее интересные результаты получены при последовательном применении цитотоксических лимфоцитов и химиотерапии.

Пациент 11 лет, с гепатокарциномой $T_3N_0M_0$, поступил в РОНЦ в мае 2010 г. Получил 10 курсов конвенциональной ХТ первой линии, включающей доксорубин, карбоплатин и цисплатин. После первых 6 курсов получен по данным КТ частичный эффект. Отмечалось снижение уровня АФП с 1525 максимально до 10,4 МЕ/мл. Химиотерапия проведена в рамках подготовки к проведению трансплантации печени. К сожалению, в трансплантации от трупного донора было отказано; ни один из 3 потенциальных родственных доноров не подошел по техническим и медицинским причинам. В связи с тем, что опухоль перестала отвечать на проводимую ХТ, начался рост АФП. Решено в июне 2011 провести расширенную гемигепатэктомию. Операция имела целью максимальную циторедукцию и получить материал для дальнейшей иммунотерапии. В послеоперационном периоде пациент получал в течение 6 мес. ДКВ. После 3 вакцинации отмечено формирование ГЗТ и регулярное появление общевоспалительных реакций в первые 72 часа после вакцинации. После формирования ГЗТ переведен на в/в введения аутологичных и аллогенных ЦТЛ. Введения ЦТЛ, полученных против клеток гепатокарциномы пациента в дозе $3,6-4 \times 10^8$ сопровождалась подъемом температуры до $39,5^\circ$, ознобом, болями в области печени. При УЗИ отмечалось повышение эхогенности опухолевых узлов в печени с формированием вокруг них воспалительного вала. Интенсивность воспалительной реакции падала с каждым последующим введением (интервал 7–10 дней). За 8 мес. иммунотерапии (07.2011–03.2012 г) – медленный рост уровня АФП максимально до 106 МЕ/мл. В апреле-мае 2012 г отмечен резкий рост АФП до 460 МЕ/мл и появление новых очагов в печени. В плане подготовки пациента к трансплантации печени в мае и в июле 2012 г. проведено 2 курса химиотерапии ифосфамид-цисплатин. Наблюдалась стабилизация процесса со снижением АФП до 21 МЕ/мл. В сентябре – резкий рост АФП до 200 МЕ/мл и появление метастазов в обоих легких. Перед следующим аналогичным курсом ХТ пациент получил 2 введения аутоЦТЛ (по $3,6 \times 10^8$ на каждое введение). Третий курс ХТ проведен 28–29 сентября 2012 г.. При контрольной КТ в день +5 отмечено значительное уменьшение метастазов в легких.

Учитывая положительный эффект от комбинированного применения иммуно- и химиотерапии, за 48 часов до начала следующего курса ХТ (19–20 октября 2012 г) введены аллогенные ЦТЛ (6×10^8 клеток), а через 96 ч после введения химиопрепаратов – аутологичные ЦТЛ ($1,2 \times 10^8$ клеток). На КТ от 27 октября 2012 г отмечается исчезновение всех видимых метастазов в легких (рис. 3). При этом отмечено медленное увеличение массы опухоли в печени. В крови – стабилизация уровня АФП. На этом фоне неожиданным оказался существенный рост эпителиального маркера СА-125 с 9 (перед ХТ) до 19,7 Е/мл. Спустя 3 недели пациенту была сделана трансплантация печени от трупного донора. При гистологическом анализе выявлены опухоли 2 типов: первая – гепатокарцинома с индексом пролиферации 30%, вторая – протоковая холангиокарцинома с индексом пролиферации 0,1%. Через 4 месяца развился рецидив по брюшине, продолжена иммунотерапия в различных комбинациях. Пациент прожил 25 месяцев после трансплантации и погиб от прогрессирования заболевания в брюшной полости. Признаков рецидива опухоли в легких не было выявлено при самом тщательном наблюдении.



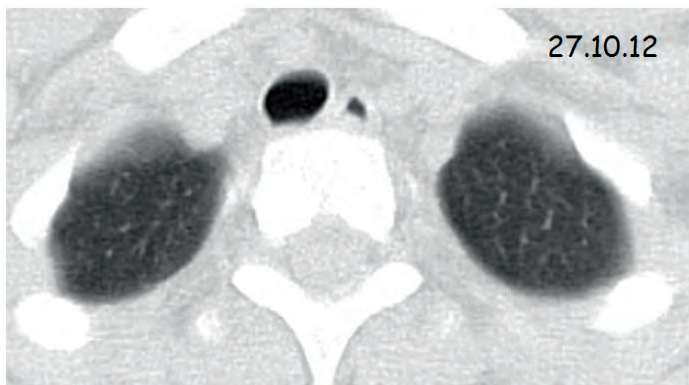


Рис. 3. Динамика метастазов в легких у пациента с гепатокарциномой на фоне комбинированного применения иммуно- и химиотерапии.

- а) метастазы в правом легком. Появление и рост на фоне 2^х курсов химиотерапии ифосфамид-цисплатин.
- б) положительная динамика после 3-го курса химиотерапии, включившего ифосфамид-цисплатин. За 10 дней до начала ХТ произведено 2 введения аутоЦТЛ (по $3,6 \times 10^8$ на каждое введение) с интервалом в 2 дня.
- с) Исчезновение метастазов после 4-го курса химиотерапии. За 48 часов до начала курса ХТ (19–20 октября 2012 г) были введены аллоЦТЛ (6×10^8 клеток), а через 96 часов после введения химиопрепаратов - аутоЦТЛ ($1,2 \times 10^8$ клеток).

В настоящее время в НИИ ДОиГ у детей старше 2 лет принят протокол лечения метастатической нейробластомы с поражением костей, включающий в себя на заключительном этапе комбинацию ВХТ и иммунотерапии. За 48 часов до ВХТ пациент получает аллогенные цитотоксические лимфоциты, затем, в раннем посттрансплантационном периоде, на фоне аплазии вводят аутологичные цитотоксические лимфоциты 2 раза в неделю до восстановления кроветворения. С дня +30 пациенты получают аутологичную дендритную вакцину с интервалом 1 раз в месяц в течение 12 мес.

Анализируя опыт применения аллогенных цитотоксических лимфоцитов, мы предположили, что их действие направлено не столько на сами клетки опухоли, сколько на клетки микроокружения, состоящего из нормальных лимфоцитов, макрофагов и т.п. пациента. При нарушении взаимодействий в системе опухоль-микроокружение чувствительность к химиотерапии меняется и те комбинации препаратов, которые казались уже неэффективными, начинают вновь оказывают выраженное цитостатическое действие.

Возможно, механизм резистентности злокачественных клеток обусловлен не только процессами и реакциями, происходящими внутри них, но и, прежде всего, микроокружением из абсолютно нормальных клеток?

То, что иммунотерапия может быть эффективна в случаях, когда исчерпаны все считающиеся традиционными и общепринятыми средства терапии злокачественных опухолей, уже не подлежит сомнению. У пациентов достигается не просто стабилизация процесса, а даже полная и длительная ремиссия. К сожалению, в большинстве случаев рано или поздно опухоль рецидивирует. Действие иммунотерапии значительно более направленное, точечное, чем, к примеру, химиотерапии, которая «бьет по площадям».

В этом ее плюсы. Но в этом же и минусы. Создавая цитотоксические лимфоциты, мы задаем им определенный вектор дифференцировки и специализации *in vitro*. В процессе культивирования противоопухолевой дендритной вакцины мы не можем контролировать, какие из множества антигенов, содержащихся в лизате (а это еще к тому же и не чистая культура клеток), выберет дендритная клетка для презентации на своих рецепторах. Клинический эффект на начальных этапах иммунотерапии свидетельствует: в ряде случаев происходит попадание в мишени, но носит оно неуправляемый характер. Нерешенным остается вопрос, что делать с пациентами, ответившими на иммунотерапию, особенно, как ни парадоксально, с теми из них, у кого получена полная клиническая, лабораторная и рентгенологическая ремиссия. Добились ли мы эрадикации всех злокачественных клеток или только обеспечиваем контроль болезни на субклиническом уровне? Как долго продолжать иммунотерапию? Опыт нашей работы с глиомами ЦНС демонстрирует: больные, достигшие ремиссии по данным МРТ и ПЭТ и сохраняющие ее на протяжении 2–3 лет, могут рецидивировать. Правда, в этом случае наблюдается, пусть незначительное, но изменение в гистологической картине рецидивной опухоли. Например, с глиобластомы диагноз меняется на глиосаркому, формально, на данном этапе знаний, входящую в группу глиальных опухолей, но, несомненно, отличающейся от каждой из них не только на уровне световой микроскопии, но и по антигенному составу. Точно так же, в описанном выше случае, у пациента с гепатокарциномой на фоне эффективного сочетанного применения иммунотерапии и химиотерапии, на фоне снижения уровня АФП наблюдался рост СА125, а исследование фрагмента удаленной печени выявил наличие не одной, а двух опухолей. Это указывает на тот факт, что в процессе длительной и эффективной иммунотерапии происходит селекция опухолевых клонов и/или микроокружения в опухоли. Таким образом, периодическая смена вариантов и схем иммунотерапии, периодическое подключение химиотерапии и других методов лечения выглядят логичными и оправданными.

Данная публикация преследует целью представление клинических данных, полученных на протяжении последних 15 лет в процессе применения

различных видов иммунотерапии у потенциально инкурабельных пациентов с метастазами в легкие. Несмотря на то, что в этих результатах научная составляющая в принятом в настоящее время среди исследователей понятии минимальна, результаты для пациентов не отличаются от таковых, полученных при проведении самых дорогостоящих, наукоемких и высокотехнологических программ лечения. С одной стороны, в условиях дефицита квалифицированных лабораторных работников, отсутствия финансирования научных программ со стороны государства, призрачной возможности получения полноценных грантов, а, главное, возможности самому ученому распоряжаться этими средствами в процессе работы, невозможно серьезно, на современном уровне изучать механизмы воздействия иммунитета на опухоль и организм в целом. Но, с другой стороны, учитывая относительную простоту применяемых методик иммунотерапии, мы имеем возможность быстро внедрять их в практику, получать результаты и модифицировать наши программы, используя единственный достоверный критерий познания истины – практику.

Вопреки расхожему мнению, за последние годы наука в медицине все дальше уходит от клиники, и уже явно вышла за пределы понимания практических врачей, которые используют достижения генетики, химии, физики, оптики и т.п. Современный ученый годами овладевает несколькими четко определенными факторами и их взаимодействиями, достигая совершенства в своей специализации. Современный клиницист в своем вечном стремлении помочь больному, спасти его жизнь и здоровье, ежедневно встречаясь с десятками синдромов и нозологиями, физически не имеет возможности получить углубленные знания во всех областях науки и ориентируется на результаты лабораторных экспериментов, подкрепленных авторитетом ученых. В результате данные, полученные *in vitro*, в условиях лабораторий, часто идеализируются и возводятся в абсолют, становятся основанием для внедрения в клинику. Но вряд ли можно себе представить, что попытка изменения в одном из десятков, если не сотен звеньев, может оказать направленное, желаемое, влияние на всю систему. Попытки рассматривать иммунитет, сложнейший механизм, результат миллионов лет эволюции как набор отдельных деталей, и попытки менять эти детали поодиночке на другие по форме и размеру, неизбежно заводят в тупик. В данном случае, разумнее не выдумывать новые, а использовать уже существующие механизмы, даже, если мы их до конца не понимаем.

Литература

1. Ehrlich P. Beiträge zur Experimentellen Pathologie und Chemotherapie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1909.
2. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. Br Med J, 1957; 1: 779–786.

3. *Thomas L.* On immunosurveillance in human cancer. *J. Biol. Med*, 1982; 55: 329–333.
4. *Gajewski T, Schreiber H, Fu Y.* Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 2013; 14: 1014–1022.
5. *Eerola A, Soini Y, Paakko P.* A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2000 ; 6: 1875–1881.
6. *Dhodapkar M, Dhodapkar K, Palucka A.* Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ*, 2008; 15: 39–50.
7. *Biswas S, Mantovani A.* Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 2010; 11: 889–896.
8. *Vacchelli E, Martins I, Eggermont A, Fridman W, Galon J, Sautes-Fridman C, et al.* Trial watch: peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology*, 2012; 1: 1557–1576.
9. *Krishnamachari Y, Geary S, Lemke C, Salem A.* Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. *Pharm Res*, 2011; 28: 215–236.
10. *Rosenberg S, Yang J, Sherry R, Kammula U, Hughes M, Phan G, et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2011; 17: 4550–4557.
11. *Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002; 295(5562):2097-2100.
12. *Lee DW, Barrett DM, Mackall C, Orentas R, Grupp SA.* The future is now: chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer. *Clin Cancer Res*, 2012; 18(10):2780-2790.
13. *Louis C.U, Savoldo B, Dotti G et al.* Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, 2011; 18(23): 6050-6056.
14. *Porter D.L, Levine B.L, Kalos M, Bagg A, June C.H.* Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 365(8): 725-33.
15. *Lubaroff D.M.* Prostate cancer vaccines in clinical trials. *Expert Rev Vaccines*, 2012; 11(7): 857-868.
16. *Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др.* Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения. *Российский биотерапевтический журнал*. 2002; 3(1): 56-62.

Мы попросили Георгия Чкадуа ответить на ряд вопросов, касающихся механизма действия аллогенных Т-лимфоцитов и дендритных вакцин.

Вопрос. Как получают аллогенные цитотоксические Т-лимфоциты?

Ответ. Лимфоциты донора культивируют совместно с дендритными клетками пациента, нагруженными опухолевым лизатом. После активации лимфоцитов и начала их пролиферации (через 5–7 суток) клетки переносят в новую культуральную посуду большего размера и проводят рестимуляцию дендритными клетками пациента. Далее через каждые 2–3 суток активно делящиеся лимфоциты разрезают, рестимулируют дендритными клетками и добавляют интерлейкин-2.

Вопрос. Каким иммунофенотипом обладают аллогенные цитотоксические Т-лимфоциты?

Ответ. Все лимфоциты несут на своей поверхности CD3 антиген; 40–70% – CD4⁺Granzyme B⁺; 30–60% – CD8⁺ CD314⁺Perforine Granzyme B⁺,

Вопрос. Что является мишенью для аллогенных цитотоксических Т-лимфоцитов?

Ответ. Мишенью являются антиген-презентирующие клетки, которые захватили и переработали белки, образующиеся при некрозе клеток. В нормальных условиях некроз практически отсутствует, а в случае онкологического заболевания некроз всегда имеет место быть в опухоли. Таким образом, основным местом приложения аллогенных цитотоксических Т-лимфоцитов будут антиген-презентирующие клетки (дендритные клетки, макрофаги), присутствующие в опухоли.

Вопрос. Данное взаимодействие эффекторных клеток с мишенями можно интерпретировать как реакцию "трансплантат–против хозяина", но разве аллогенные цитотоксические Т-лимфоциты не будут взаимодействовать со всеми клетками пациента, несущими чужеродные комплексы гистосовместимости?

Ответ. Алло-рестриктированные Т-лимфоциты распознают главный комплекс гистосовместимости вместе с пептидным фрагментом антигена, соответственно, взаимодействие будет происходить только с определёнными комплексами, а не со всеми подряд.

Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын

**СУБПОПУЛЯЦИИ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК:
ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОБИЛИЗАЦИИ
И ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВЕТВОРЕНИЯ
ПОСЛЕ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
И ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина», Москва

Резюме

Субпопуляции мобилизованных стволовых гемопоэтических клеток были изучены в 1187 образцах (продукт лейкофереза, периферическая кровь) у 430 онкологических больных (167 взрослых, 263 ребенка) и 50 доноров кроветворной ткани. Изучены следующие субпопуляции: CD45⁻, CD38⁻HLA-DR⁻, CD90, CD117, CD13, CD33, CD71, CD61, CD19, CD7, CD56. Эффективность мобилизации субпопуляций стволовых клеток была взаимосвязана с нозологической формой заболевания. Интересным фактом, установленным в работе, явилось то, быстрые сроки восстановления гемопоэза, как правило, наблюдались при наличии в трансплантате выраженного количества незрелых субпопуляций стволовых клеток (CD45⁻, CD90⁺), причем нарастании пропорции линейно коммитированных клеток (CD117, CD13, CD33) не вело к ускорению восстановления гемопоэза.

Ключевые слова: стволовые гемопоэтические клетки, субпопуляции, трансплантация, CD45⁻, CD90, CD117, CD13, CD33, CD71, CD61, CD19, CD7.

L.Yu. Grivtsova, N.N. Tupitsyn

**HEMATOPOIETIC STEM CELL SUBPOPULATIONS:
MOBILIZATION EFFICACY
AND HEMATOPOIESIS RESTORATION
AFTER HIGH DOSE CHEMOTHERAPY
AND STEM CELL TRANSPLANTATION
IN CANCER PATIENTS**

FSBSI "N.N. Blokhin Russian oncology center", Moscow

Summary

Mobilized haematopoietic stem cell subpopulations were studied in 1187 samples (leukapheresis product, peripheral blood) in 430 oncology patients (167 adults, 263 children) and in 50 donors. The following subpopulations were studied: CD45⁻, CD38⁻HLA-DR⁻,

CD90, CD117, CD13, CD33, CD71, CD61, CD19, CD7, CD56. Efficacy of stem cell subpopulation mobilization were related to nosology of disease. The shorter periods of haematopoiesis recovery were noted in cases with higher content of immature stem cell subpopulations in transplantation material (CD45⁻, CD90⁺), elevation of lineage committed subpopulations (CD117, CD13, CD33) did not accelerate haematopoiesis recovery.

Key words: haematopoietic stem cells, subpopulations, transplantation, CD45⁻, CD90, CD117, CD13, CD33, CD71, CD61, CD19, CD7.

Введение

Аутологичная и аллогенная трансплантации стволовых кроветворных клеток (СКК) в настоящее время широко используются в онкологии [1; 2]. В большинстве случаев это трансплантации периферических стволовых кроветворных клеток, мобилизованных воздействием ростовых факторов. Как правило, целью трансплантации является восстановление всех кроветворных ростков после высокодозной химиотерапии.

Главным ориентиром эффективности трансплантации является количество CD34⁺ клеток, стандартная доза которых, необходимая для полноценного восстановления кроветворения, составляет не менее 2 миллионов на кг массы тела реципиента [3; 4]. Однако пул стволовых кроветворных клеток чрезвычайно гетерогенен и представлен ранними, плюрипотентными и полипотентными предшественниками, способными восстанавливать все ростки кроветворения; бипотентными и унипотентными предшественниками, ответственными за созревание отдельных кроветворных линий (рис. 1). Каждый компартмент пула стволовых кроветворных клеток, наряду с общими их свойствами (самоподдержание и дифференцировка), имеет и уникальные особенности, находящие отражение в репертуаре белков, экспрессируемых на мембране клетки. Данное уникальное сочетание мембранных антигенов определяет каждую из субпопуляций стволовых кроветворных клеток [5; 6]

На основании иммунофенотипа субпопуляций ранних, плюрипотентных и полипотентных клеток, а также линейно-коммитированные предшественники могут быть идентифицированы в общем пуле стволовых клеток, с использованием методов проточной цитометрии [7; 8]. Исследование вклада каждой из этих субпопуляций в общий мобилизующийся пул и влияние их на полноту и скорость восстановления кроветворения окончательно не определены и представляют значительный научный и практический интерес.

Материалы и методы

Исследовано 1187 образцов моноклеарной фракции крови (лейкаферезные продукты) и стимулированной периферической крови.

Образцы мобилизованных СКК получены у 430 онкологических больных (167 взрослых и 263 ребенка) в ходе подготовки к высокодозной консолидации ремиссии и у 50 здоровых лиц (61 образец СКК), полученных с целью аллогенной трансплантации в детской онкологии). Средний возраст детей составил 7 лет, средний возраст взрослых больных и доноров аллогенных СКК – 32 и 34 года. Нозологически среди взрослых онкологических больных 95 % составили пациенты с онкогематологической патологией (НХЛ – 57, ЛХ – 58, ММ – 40, ОМЛ – 3 чел). Группа детей была более гетерогенной, преобладали больные с солидными опухолями высокого риска и плохого прогноза – ОССЮ, СМТ и медуллобластома; больные с онкогематологической патологией составили 21% (рис. 2.).

Изучение субпопуляционного состава мобилизованных стволовых кроветворных клеток онкологических больных и доноров проведено на основании экспрессии маркера стволовых клеток – антигена CD34, а также маркеров, отражающих степень зрелости стволовых клеток и их линейную коммитированность. С учетом субпопуляционного состава мобилизованных стволовых клеток крови дана сравнительная характеристика стволовых клеток крови онкологических больных и здоровых лиц и проведено сравнение их гемопоэтического потенциала у онкологических больных в зависимости от возраста (взрослые, дети). В качестве мобилизующего агента в основном использован Г-КСФ (в большинстве случаев – в сочетании с химиотерапией). Предлеченность перед сборами СКК существенно варьировала и составила в среднем 3 курса у детей и 5 курсов у взрослых пациентов, включая мобилизационный. Исключение составили доноры и дети, больные медуллобластомой, у которых стимуляция проведена без предварительной химиотерапии.

Субпопуляции стволовых клеток определяли иммунологически на основании реакции 3–цветной иммунофлуоресценции с детекцией результатов методом проточной цитометрии. Оценивали от 4 до 10 тройных комбинаций МКА. Изучена мембранная экспрессия антигенов, ассоциированных со стволовой кроветворной клеткой различного уровня дифференцировки. Наиболее ранний компартмент СКК охарактеризован на основании отсутствия на CD34⁺–клетках антигенов CD38 и HLA-DR, а также при выявлении среди CD34⁺ клеток Thy-1⁺ (CD90⁺) субпопуляций. Популяции плюрипотентных клеток идентифицированы и охарактеризованы на основании сочетания экспрессии на CD34⁺ клетках антигенов CD45, CD38, HLA-DR, CD117, CD90 и CD71. Изучены поли- и бипотентные СКК на основании экспрессии CD117, CD71, GlyA, CD13, CD33, CD61 (СКК уровня КОЕ-ГЕММ, Бое-ЭМЕг и КОЕ-ГМ), а также лимфоидно- коммитированные клетки-предшественники, выявляемые по экспрессии антигенов CD10, CD19 (B-линейная рестрикция) и антигенов CD2, CD7, CD57 и CD56 (T- и NK- клеточная рестрикция). Специфичность антигенов в отношении классов стволовых кроветворных клеток и изотипы МКА представлены в табл. и на рис. 3.



Рис. 1. Мобилизация СКК.



Рис. 2. Больные и доноры.

АНТИГЕНЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С СКК		
Антиген (клеточный дифференциальный маркер)	Класс / молекула	Класс СКК
CD133-120 (CD34)	HRCA-2 / IgG, k CD122 / IgG, k	Стволовый антиген – все классы стволов СКК
лейкоцит common antigen (CD45)	HLA-3 / IgG, k	Слабая экспрессия в отсутствие – равный компартмент Нарастающая экспрессия – коммитированные СКК
ICAM-3 (CD50)	HLA-3 / IgG, k	Мембранная экспрессия увеличивается на всех уровнях дифференровки СКК
HLA-DR	HLA-2 / IgG, k	Отсутствие экспрессии – равный компартмент Выраженная экспрессия – коммитированные или биологические СКК
CD38	HLA-2, HLA-3 / IgG, k	Отсутствие экспрессии – равный компартмент Выраженная экспрессия – коммитированные или биологические СКК
Thy-1 (CD90)	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – равный компартмент
c-kit (CD117)	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – равный мезенхимный (пластический) компартмент
N-CAM (CD56)	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – NK-лимфоцитарная экспрессия
Transferrin receptor CD71	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – равная экспрессия при дифференровке СКК АГ ⁺ – лимфоцитарный компартмент
CD13	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – мезенхимный или биологический компартмент
CD33	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – мезенхимный или биологический компартмент, но не мезенхимный в растях
Integrin β_3 chain (CD61)	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – мезенхимный компартмент
CD19	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – B-лимфоцитарный компартмент
CD7	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – T-лимфоцитарный компартмент
CD57, CD56	HLA-3 / IgM, NCAM	АГ ⁺ – NK-лимфоцитарный компартмент
CD2	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – T- и NK-лимфоцитарные линии дифференровки
CD10	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – лимфоцитарный компартмент
Glycophorin (CD236a)	HLA-3 / IgG, k	АГ ⁺ – эритроцитарный компартмент

Рис. 3. Антигены, ассоциированные с СКК.

Результаты

Необходимое для трансплантации (более 2 миллионов на кг веса реципиента) количество материала было набрано у взрослых больных за 2–3 процедуры лейкафереза. У детей и у доноров необходимое минимальное количество аутологичных СКК (2 миллиона и более на кг массы тела реципиента) в большинстве случаев (более 58% у детей и 68% у доноров) набрано за одну процедуру лейкафереза.

В среднем пропорция CD34⁺ клеток в материале, полученном за один лейкаферез, у взрослых больных была более высокой и составила $1,12 \pm 0,07\%$, медиана $0,59\%$ ($0,01-8,8\%$; $n = 390$). У детей материал одного лейкафереза содержал в среднем $0,82 \pm 0,05\%$, (медиана $0,45\%$; разброс $0,01-10,0$; $n = 446$). У доноров пропорция CD34⁺ клеток в материале одного лейкоконцентрата была самой невысокой и составила $0,36 \pm 0,03\%$ при медиане $0,29\%$ и разбросе от $0,02-1,23\%$ ($n = 61$). Вместе с тем, при оценке абсолютного количества CD34⁺ СКК на кг массы тела реципиента, наибольшее количество отмечено в случае аллогенных СКК (донорские СКК – $4,82 \pm 0,67 \times 10^6/\text{кг}$, медиана $3,6 \times 10^6/\text{кг}$ от $0,1$ до $35,5 \times 10^6/\text{кг}$; $n = 61$). У взрослых онкологических больных абсолютное количество стволовых

клеток, набранное за один лейкоферез ($3,11 \pm 0,38 \times 10^6/\text{кг}$) также превысило 3×10^6 , но медиана – только $1,5 \times 10^6$ (0,02 до $28,7 \times 10^6/\text{кг}$, $n=285$).

Достоверно более выраженной была мобилизация суммарного пула стволовых кроветворных клеток (% CD34+ клеток) у детей с СЮ и нейробластомой (1,03% и 1,19% CD34+–клеток соответственно, $p < 0,02$), а худший эффект мобилизации демонстрировала группа детей больных гемобластомами. У взрослых лучшая мобилизация ожидаемо выявлена у больных множественной миеломой, а худший – у больных с лимфомой Ходжкина (среднем 0,31% CD34+–клеток в трансплантируемой ткани, $p = 0,05$; рис. 4).

Суммарное количество стволовых клеток, набранных за все процедуры лейкоферезов, было наибольшим у взрослых больных и составило $7,61 \pm 0,9 \times 10^6/\text{кг}$, медиана 4,7 от 0,55 до $30,0 \times 10^6/\text{кг}$; $n = 55$. Для аутологичной трансплантации у детей было получено $4,97 \pm 0,32 \times 10^6/\text{кг}$, медиана 3,78 ($0,05$ – $30,0 \times 10^6/\text{кг}$; $n = 204$), донорские стволовые клетки составили $5,74 \pm 0,77 \times 10^6$ CD34+ клеток в пересчете на кг веса реципиента, (медиана $3,68 \times 10^6/\text{кг}$; от 0,1 до $35,5 \times 10^6/\text{кг}$; $n = 51$).

Основное внимание в работе уделено субпопуляционному составу стволовых кроветворных клеток в трансплантируемой ткани. Оценен эффект мобилизации по следующим группам антигенов: пул ранних, плюрипотентных; пул клеток гранулоцитарно-макрофагальной направленности дифференцировки; пул мегакариоцитарно-коммитированных СКК и эритроидных предшественников и, наконец, пул лимфоидных СКК.

По мере дифференцировки стволовых клеток от плюрипотентных к линейно-коммитированным нарастает экспрессия CD45, тогда как экспрессия CD34 снижается. Антиген CD45 в клинических исследованиях по трансплантации кроветворной ткани не изучался. Это обусловлено тем, что существующие цитометрические протоколы предлагают гейтирование лейкоцитов на основании CD45, то есть в анализ включаются только CD45+–клетки, и в их пределах оценивается пропорция стволовых клеток [9].

Проведенное исследование показало, что в ряде случаев экспрессия CD45 на мембране стволовых кроветворных клеток может быть очень слабой, вплоть до отрицательной. Пропорция клеток с крайне слабой или отрицательной экспрессией антигена, которая по данным литературы может представлять собой наиболее незрелую фракцию СКК [10], была изучена нами более детально. CD45 негативные стволовые кроветворные клетки составляли достаточно выраженное количество (более 20,0 %) от суммарного пула СКК во всех анализируемых группах и у большинства больных (более 60% образцов во всех анализируемых группах) выявлялось более 10% (рис. 5). Данные клетки были гетерогенны по размеру, среди аутологичных СКК детей выявлена достоверная обратная корреляция их количества с суммарным числом стволовых клеток в трансплантируемой ткани ($p = 0,045$).

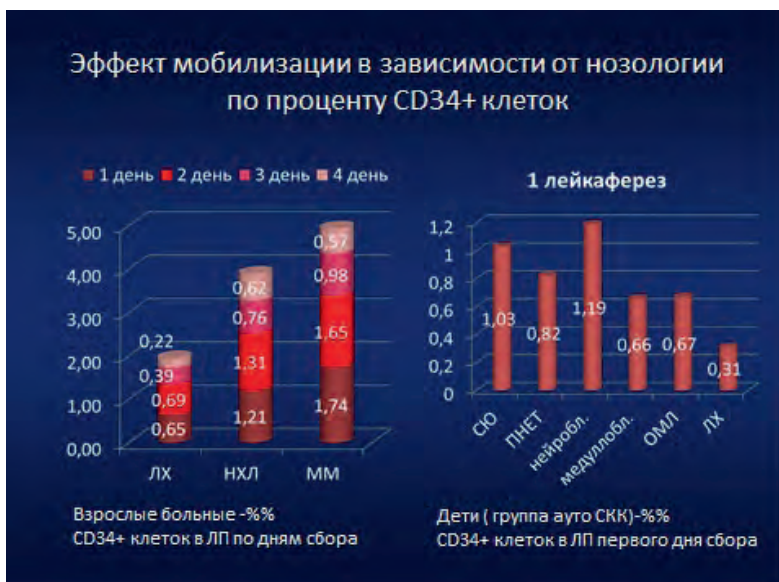


Рис. 4. Эффект мобилизации в зависимости от нозологии по проценту CD34⁺ клеток.

Иммунофенотипически данная субпопуляция также являлась неоднородной, на популяции CD45neg СКК установлена тенденция более выраженной экспрессии антигенов, ассоциированных с полипотентным пулом (HLA-DR, CD38, CD117, CD71). Содержание CD45⁻ популяций среди аутологичных СКК различалось в зависимости от нозологической формы заболевания (рис. 6). У детей достоверно более выраженным число клеток данной субпопуляции было в группе опухолей ЦНС и гемобластозов, а среди них у больных ЛХ – более 27% от суммарного пула СКК (p < 0,04).

Стволовые кроветворные клетки взрослых больных ЛХ так же, как и у детей, содержали более выраженную пропорцию CD45⁻ стволовых клеток (более 30,0%), при этом наибольшая пропорция данных клеток наблюдалась в образцах лейкоконцентратов первого дня сбора.

При анализе образцов, содержащих различное количество CD34⁺ лейкоцитов, установлено, что среди лейкоконцентратов с меньшим содержанием стволовых клеток пропорция CD45⁻ стволовых клеток была достоверно более высокой у взрослых (исключение составила группа образцов с очень низким количеством CD34⁺ клеток). У детей лейкоферезные продукты с низкой пропорцией CD34⁺ лейкоцитов содержали более выраженное количество CD45⁻ стволовых клеток.

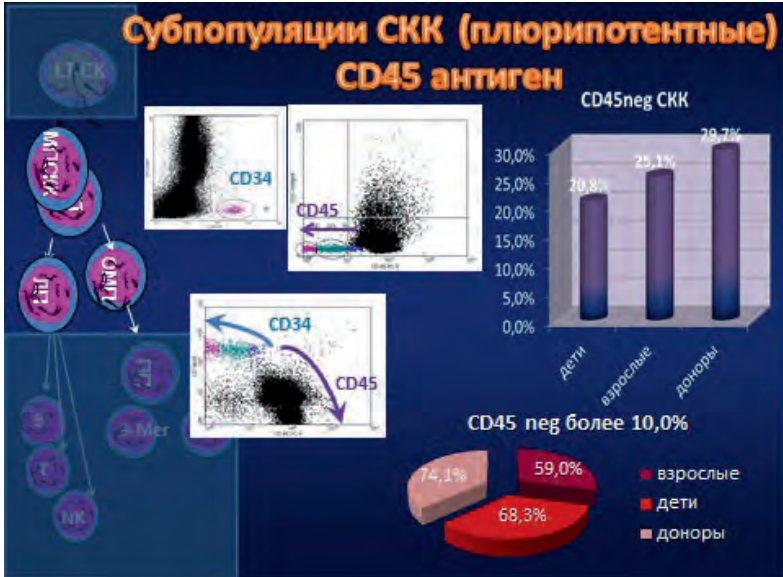


Рис. 5. Субпопуляции СКК (CD45).



Рис. 6. Субпопуляции СКК (CD45⁻).



Рис. 7. Субпопуляції СКК по віксам (CD45).

Таким образом, в случае удовлетворительной мобилизации установлена обратная взаимосвязь между суммарным числом стволовых клеток и количеством CD45-негативных мобилизованных СКК (рис 7).

Учитывая факт гетерогенности стволовых клеток в отношении CD45, предпринято два варианта выявления СКК – на основании CD50 и нуклеотропного красителя syto16 (рис. 8). CD34⁺ клетки были более гомогенны в отношении экспрессии CD50 и всегда составляли более 98,0% среди мобилизованных СКК. Однако наиболее информативным является Syto 16, позволяющий четко выявлять не только ядросодержащие, но и жизнеспособные клетки – вне зависимости от степени их дифференцировки.

В ходе исследования показано, что все CD34⁺ клетки являются syto16+/++. Таким образом, данный краситель наиболее пригоден для точной идентификации пропорции стволовых кроветворных клеток в трансплантируемой ткани.

Пул наиболее ранних плюрипотентных СКК не экспрессирует антигены CD38 и HLA-DR [11]. Доля этих клеток в трансплантируемой ткани незначительна; наибольшее количество клеток данной субпопуляции выявлено у доноров. CD34⁺HLA-DR⁻CD38⁻ клетки находятся в обратной корреляции с пулом миелоидно-коммитированных, но не с лимфоидно-коммитированными предшественниками у детей и доноров (рис. 9).

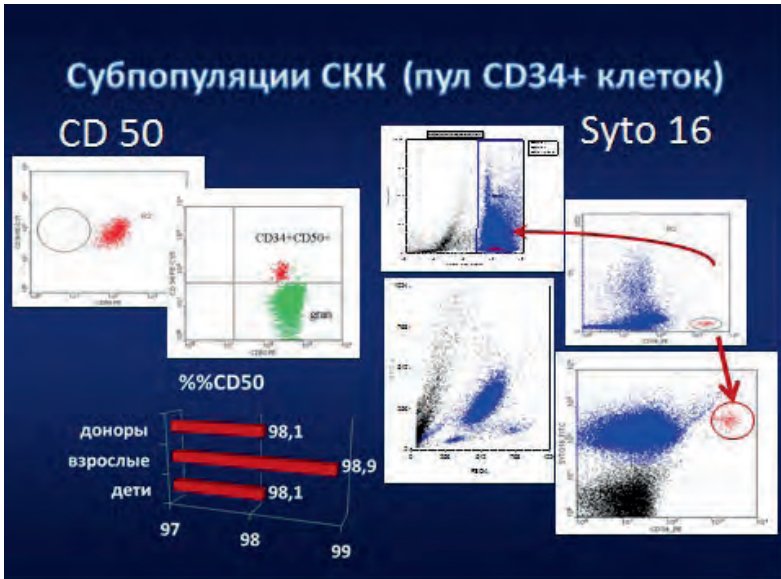


Рис. 8. Субпопуляции СКК (пул CD34⁺ клеток).

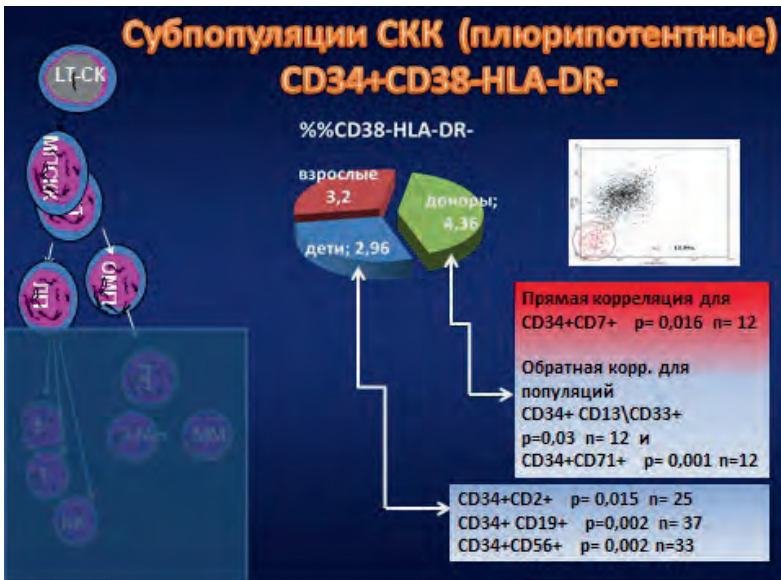


Рис. 9. Субпопуляции СКК (плюрипотентные).

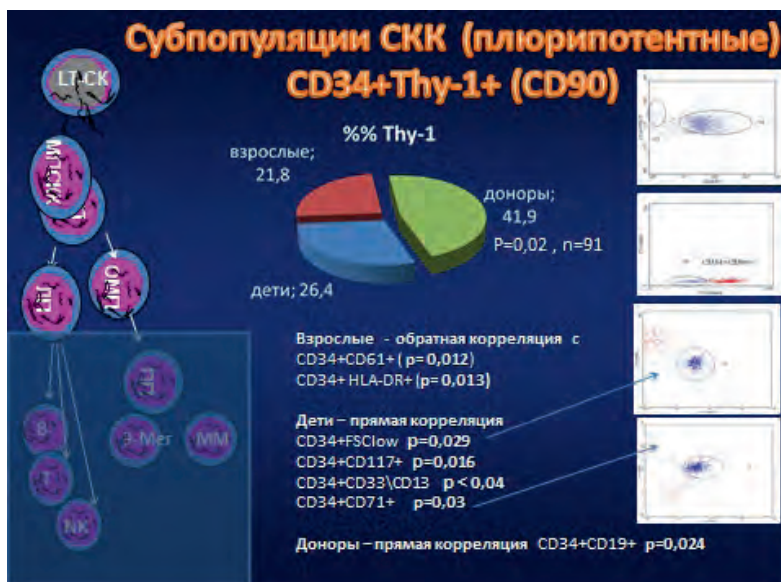


Рис. 10. Субпопуляции СКК (плюрипотентные; продолжение).

Также пул плюрипотентных стволовых клеток характеризует экспрессия Thy-1 (CD90) антигена [12; 13], пропорция данных клеток была достоверно более выраженной среди донорских стволовых клеток. Thy-1 клетки были представлены наиболее мелкими фракциями, и количество их было обратно пропорциональным числу HLA-DR⁺ и мегакариоцитарно-коммитированных (CD61⁺) СКК у взрослых. У детей число CD34⁺CD90⁺ клеток было достоверно взаимосвязано с пулом миелоидно-коммитированных предшественников (рис. 10).

Наиболее эффективно Thy-1 субпопуляция мобилизуется у доноров и у детей с медуллобластомой и нейробластомой (p < 0,04). Наименьшая пропорция таких клеток характеризует СКК группы гемобластозов и опухолей ЦНС (p = 0,03).

Главная цель трансплантации – восстановление основных кроветворных ростков для предотвращения инфекционных, геморрагических и иных осложнений связанных с цитопениями, вызванными ВХТ. Не случайно поэтому в числе мобилизующих агентов используют ГМ-КСФ, Г-КСФ. Подобные режимы обеспечивают мобилизацию стволовых клеток, обогащенных миелоидными предшественниками [14]. В числе маркеров стволовых кроветворных клеток миелоидного ряда изучены как ранние предшественники CD117⁺, так и клетки, экспрессирующие пан-миелоидные антигены CD13, CD33.

C-kit рецептор CD117 обычно расценивают как доминанту миелоидно-коммитированных предшественников ранних этапов дифференцировки [15; 16].

Мобилизованные СКК характеризовал широкий диапазон присутствия CD117⁺ клеток, достоверно взаимосвязанных с суммарным пулом СКК у онкологических больных ($p = 0,03$). Наименьшее среднее содержание c-kit-рецептор⁺ СКК выявлено у детей группы ПНЭО и медуллобластомы, более эффективно ($p < 0,01$) данная субпопуляция мобилизовалась у онкогематологических больных (рис. 11). Количество CD117⁺ СКК не было достоверно взаимосвязано с другими субпопуляциями, за исключением Thy-1⁺ СКК детей.

Значительную пропорцию среди мобилизованных СКК составляли CD13⁺ и CD33⁺ субпопуляции. Однако экспрессия CD13 была всегда более интенсивной в сравнении со вторым пан-миелоидным АГ CD33, экспрессия которого более типична для миело-моноцитарной линии дифференцировки. Количество CD33⁺ СКК было наименьшим у взрослых онкологических больных и ассоциировано с суммарной дозой СКК (рис. 12).

Количество CD33⁺ СКК у детей оказалось пропорциональным доле Thy-1⁺ клеток. Установлена коэкспрессия данных антигенов на уровне одной стволовой клетки, что подтверждает гемопоэтическую природу Thy-1⁺ СКК, поскольку экспрессия CD33 характерна только для кроветворных клеток. На стволовых кроветворных клетках миелоидной рестрикции установлена коэкспрессия лимфоидных антигенов, и подтверждена их гетерогенность в отношении рецептора трансферрина CD71 (рис. 13). Достоверно более эффективной была мобилизация миелоидных CD33⁺ СКК у детей с ОМЛ ($p = 0,04$).

Одной из главных задач трансплантации кроветворной ткани, обогащенной стволовыми клетками, является восстановление тромбоцитарного звена гемопоэза. Поэтому логична оценка пропорции мегакариоцитарно-коммитированных предшественников, которая оказалась наиболее выраженной среди донорских клеток ($p = 0,001$). Наименьшее количество мегакариоцитарных предшественников характеризовало стволовые клетки, полученные у детей, страдающих нейробластомой ($p = 0,04$), в сопоставлении с группой медуллобластомы и ПНЭО.

Главным маркером дифференцированных клеток эритроидного ряда является гликофорин А (GlyA). Этот маркер появляется на более поздних этапах дифференцировки СКК в направлении эритроидного ростка, и самые ранние эритроидные предшественники не экспрессируют гликофорин А [17]. Пропорция GlyA⁺ клеток среди периферических мобилизованных СКК была очень низкой – менее 1,0% от суммарного пула.

Другим маркером, ассоциированным с клетками эритроидного ростка, является трансферриновый рецептор [18.].

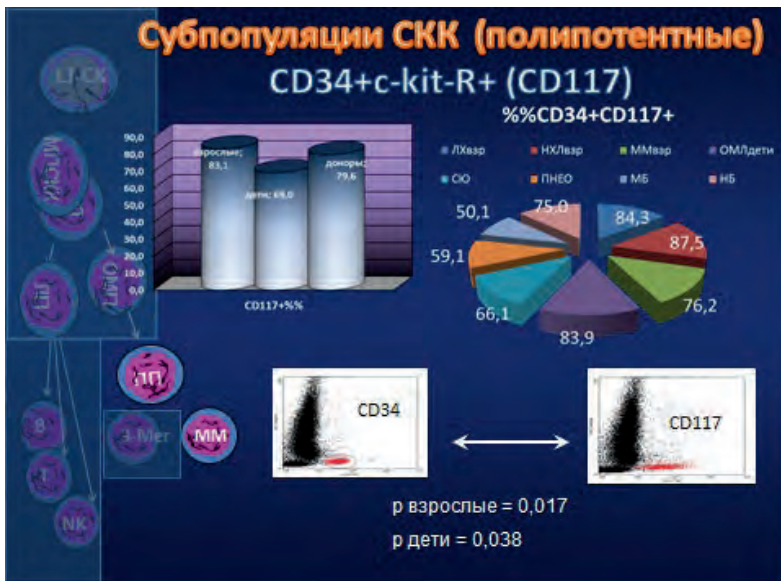


Рис. 11. Субпопуляції СКК (поліпотентні).

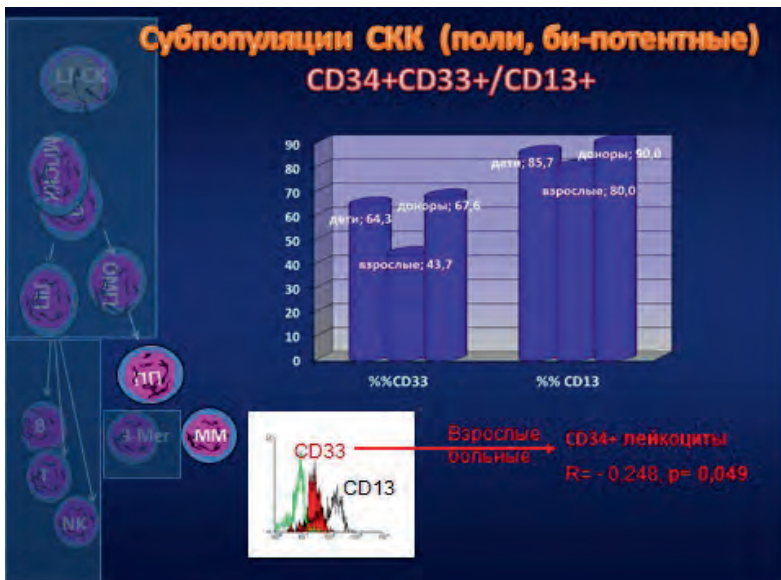


Рис. 12. Субпопуляції СКК (полі, бі-потентні).

Показана высокая ассоциация между гликофорином A⁺ и CD71⁺ клетками – все GlyA⁺ стволовые клетки экспрессировали CD71, вместе с тем выявлена популяция CD71⁺ GlyA⁻ СКК. Это подтверждает существенную гетерогенность CD71⁺ СКК в отношении линейной направленности и уровней дифференцировки, то есть, вероятность экспрессии трансферринового рецептора на более ранних этапах дифференцировки СКК и на других, нежели эритроидные предшественники, линиях.

Лимфоидный росток был изучен на основании экспрессии маркера В-клеток CD19, пан-Т-клеточного антигена CD7 и антигенов NK-клеток CD56, CD57. Наиболее активно данные субпопуляции мобилизовались у доноров ($p < 0,03$). Среди онкологических больных достоверно лучше мобилизовались CD7⁺ СКК у детей, больных нейробластомой, и саркомами мягких тканей и у взрослых при ЛХ (более 4,8 % от суммарного пула СКК, $p < 0,02$). Более высокая эффективность мобилизации CD19⁺CD34⁺ клеток отмечена в группе детей, страдавших ПНЭО ($p = 0,03$) и медуллобластомой ($p = 0,01$), тогда как при ОМЛ CD19⁺ клеток не выявлено.

Факт присутствия CD19⁺CD10⁺ В-лимфоидного предшественника сомнений не вызывает [19] и подтвержден в работе. Вместе с тем установлен факт мобилизации CD19⁻CD10⁺ СКК. Эта субпопуляция по данным литературы соответствует наиболее раннему плюрипотентному общему лимфоидному предшественнику (ОЛП) [20–22]. Факт присутствия среди мобилизованных периферических стволовых клеток популяции CD34⁺CD10⁺CD19⁻ подтвержден нами и в случае отсутствия CD19⁺-клеток в образцах и при одновременной оценке CD10 и CD2, также являющихся дискретными популяциями (рис 14).

Представляет интерес, насколько вклад каждой из субпопуляций СКК определяет эффект процедуры трансплантации в целом, то есть сроки и полноту восстановления кроветворения у реципиентов.

Относительно общего содержания CD34⁺ клеток в литературе практически нет расхождений [1–3], и наши данные подтверждают факт, что трансплантация не менее 2×10^6 CD34⁺ клеток на кг массы реципиента, как правило, достаточна для восстановления кроветворения.

При низкой дозе СКК больным трансплантировали костный мозг, что также позволяло получить удовлетворительные результаты. Однако панцитопении в этих случаях были более длительными. Интересным оказался тот факт, что в случае трансплантации более 5×10^6 CD34⁺ клеток на кг массы тела реципиента ускорения восстановления кроветворения клиницисты не наблюдали. У этих больных отмечены более длительные сроки восстановления нейтрофилов ($p = 0,001$). Повидимому, оптимальной является трансплантация 2–5 миллионов CD34⁺ клеток на кг массы тела реципиента.

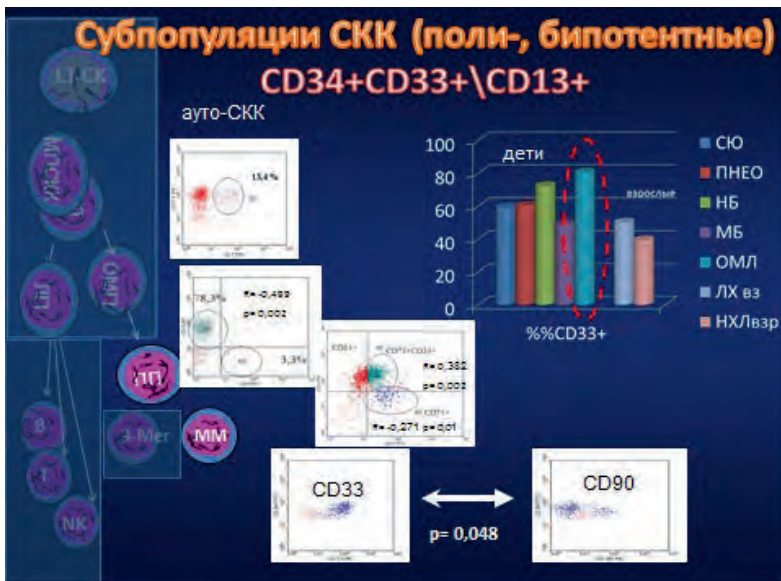


Рис. 13. Субпопуляции СКК (поли, би-потентные).



Рис. 14. Субпопуляции СКК (би, -унипотентные).

Сопоставлен вклад различных трансплантируемых субпопуляций СКК в непосредственный эффект их трансплантации; оценены сроки восстановления гранулоцитарного и тромбоцитарного ростков в зависимости от пропорции ранних предшественников и линейно-коммитированных стволовых кроветворных клеток.

Выраженная пропорция CD45⁻ СКК (> 15,0%) ассоциировалась с более быстрыми сроками восстановления нейтрофилов и тромбоцитов в случае аутотрансплантации СКК у детей и у взрослых, а также с более быстрым восстановлением лейкоцитов у детей при трансплантации донорских аллоСКК (рис 15). Как уже отмечено, низкая экспрессия CD45 характерна для менее зрелых субпопуляций СКК, пролиферативный потенциал которых убывает по мере их дифференцировки [10]. Возможно, именно этим определяются более короткие сроки и полнота восстановления гемопоэза (как нейтрофилы, так и тромбоциты) при аутологичной и аллогенной трансплантации кроветворной ткани.

Субпопуляция наиболее ранних CD34⁺CD38⁻HLA-DR⁻ клеток оказалась информативной в случае аллотрансплантации СКК – прямая ассоциация со сроками восстановления лейкоцитов: чем больше было клеток данной субпопуляции в трансплантированной ткани, тем дольше были сроки восстановления лейкоцитов (рис.16). Обращает на себя внимание тот факт, что данная ассоциация выявлена только в отношении донорских СКК и не наблюдалась в случае трансплантации аутологичных СКК у онкологических больных. Наиболее очевидным объяснением данного феномена может являться предлеченность онкологических больных, влияющая на пропорцию пула незрелых СК, чувствительных к химиотерапии.

В случае трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток у детей информативной оказалась субпопуляция CD38⁻ клеток, содержание которых менее 65% обуславливало сокращение критической лейкопении (рис. 16). Данная популяция также может представлять собой более ранние формы СКК [11]. Третья субпопуляция незрелых клеток – Thy-1⁺ СКК, трансплантация большей дозы которых также характеризовала группу более быстрого восстановления тромбоцитов (рис. 16).

Маркеры незрелых клеток CD45 и Thy-1, по-видимому, определяют ранние плюрипотентные СКК с большим потенциалом пролиферации, и число таких клеток при трансплантации взаимосвязано с более быстрым и полным восстановлением кроветворения.

Популяция СКК отрицательная в отношении CD38 и HLA-DR – это еще более ранние, крайне малочисленные фракции, обогащенные в отношении клеток, иницирующих долгосрочные клеточные культуры. Для дифференцировки клеток субпопуляции CD34⁺HLA-DR⁻CD38⁻ необходимо большее время.

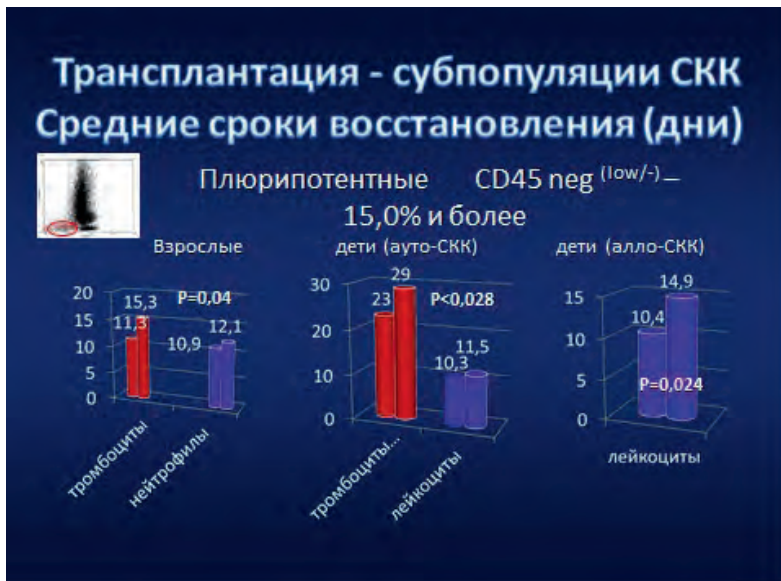


Рис. 15. Трансплантация - субпопуляции СКК.

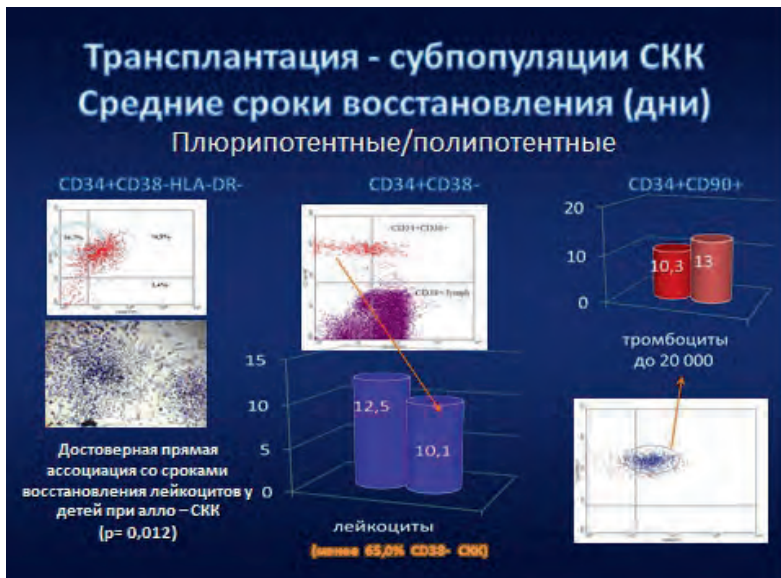


Рис. 16. Трансплантация - субпопуляции СКК.

В отношении миелоидно-коммитированных субпопуляций, как уже сказано выше, оценено три антигена – пан-миелоидные – CD13, CD33 и CD117 – маркер миелоидных предшественников. Интересно отметить, что вклад этих популяций был противоположным вкладу незрелых гемопоэтических предшественников. Так, чем больше было количество CD117⁺ СКК (рис. 17), тем более длительными были сроки восстановления нейтрофилов. То же самое мы наблюдали и в отношении пан-миелоидных антигенов, в особенности – CD13. Чем больше таких клеток в трансплантируемой ткани, тем длиннее период восстановления и нейтрофилов и тромбоцитов. Увеличение пропорции CD33⁺ СКК до 70,0% и более отразилось на возрастании длительности критической лейкопении у взрослых больных.

Эти данные в определенной степени подтверждаются и на мегакариоцитарном звене (хотя количество сопоставленных трансплантаций в данном случае невелико) – чем выше пропорция трансплантируемых СКК, тем длиннее период тромбоцитопении, однако данные требуют дальнейшего изучения.

Исключением из общей тенденции является трансферриновый рецептор, CD71 – антиген с очень широким спектром клеточной экспрессии, и хотя он более специфичен для эритроидного ростка [17; 18], данный антиген ни в коей мере нельзя соотносить только с клетками эритроидного ряда. Поэтому в силу линейной разнородности клеток, экспрессирующих трансферриновый рецептор, результаты неоднозначны – обратная ассоциация со сроками восстановления тромбоцитов как в случае аутологичной, так и при аллогенной трансплантации и прямая, с длительностью лейкопении (рис. 18). Для того чтобы интерпретировать данные по CD71 необходимы дополнительные исследования этого важного маркера в контексте его линейной принадлежности на стволовых кроветворных клетках.

Из числа лимфоидных антигенов, достоверные ассоциации, сходные с тенденцией в отношении количества ранних плюрипотентных СКК (CD45⁺, Thy-1⁺ стволовые кроветворные клетки), получены в отношении CD19⁺ СКК и CD56⁺ СКК (рис. 19). Чем больше таких клеток, тем более быстро восстанавливалось нейтрофильное звено (CD19) и тромбоциты (CD56).

Маркер CD7 считается T-линейно-ассоциированным антигеном, вместе с тем хорошо известен факт, и он подтвердился в исследовании, что CD7 представлен на миелоидных предшественниках, причем на достаточно ранних этапах их дифференцировки [23]. Поэтому рассмотрение роли данного антигена возможно как в контексте маркера незрелых клеток, так и коммитированных СКК. При аллогенной трансплантации скорость восстановления лейкоцитов была обратно пропорциональной содержанию CD7⁺ СКК. С другой стороны сроки восстановления тромбоцитарного звена при аутогенной трансплантации были пропорциональны количеству CD7⁺ СКК (рис. 20).

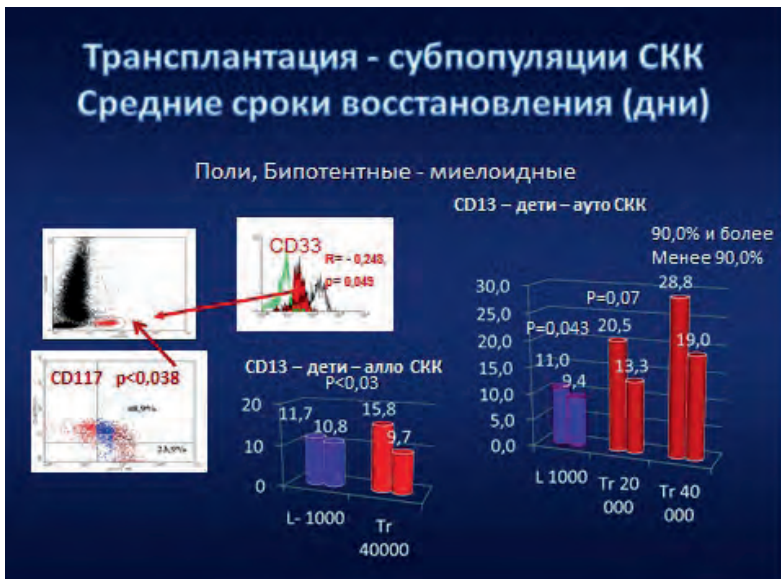


Рис. 17. Трансплантація - субпопуляції СКК.



Рис. 18. Трансплантація - субпопуляції СКК.



Рис. 19. Трансплантация - субпопуляции СКК.



Рис. 19. Трансплантация - субпопуляции СКК.

Заклучение

Таким образом, пул мобилизованных СКК гетерогенен и представлен плюрипотентными предшественниками и коммитированными стволовыми кроветворными клетками, которые находятся в различных, достаточно сложных взаимоотношениях, пропорция их в трансплантированной ткани различна. Эффективность мобилизации отдельных субпопуляций стволовых клеток взаимосвязана с нозологической формой заболевания.

Как в случае аутологичной, так и при аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток следует учитывать не только суммарный пул CD34⁺ СКК и пропорцию гранулоцитарных или других линейно-коммитированных СКК, но и обращать внимание на пул незрелых клеток, характеризующихся как CD34⁺CD45⁻Thy-1⁺ клетки.

Вопреки расхожему мнению о важности для быстрого восстановления гранулоцитарных линий коммитированных миелоидных СКК, оптимальный состав трансплантируемых СКК должен представлять определенный баланс между коммитированными стволовыми кроветворными клетками и их наиболее ранними субпопуляциями. Именно в этом случае удастся добиться оптимальных сроков и полноты восстановления кроветворения, как при аутологичной, так и при аллогенной трансплантации кроветворной ткани.

Литература

1. *Korbling M., Freireich E.J.* Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*, 2011, v.117, p. 6411–6.
2. *Blume K.G., Thompson E.D.* A review of autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2000. – V. 6. – p. 1–12.
3. *Appelbaum F.R.* The current status of hematopoietic cell transplantation – *Annu. Rev. Med* – 2003, 54, 491–512.
4. *Reddy R.L.* Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* 2005, 32(1): 63–72.
5. *Seita J., Weissman I.L.* Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews.* 2010, v.2 (6), p.640–53.
6. *Benz C., Copley M.R., Kent D.G. et al.* Hematopoietic stem cell subtype expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell. Stem Cell*, 2012, V.10 (3), p. 273–83.
7. *Preston S.L., Alison M.R., Forbes S.J. et al.* The new stem cell biology: Something for everyone. *Mol.Pathol.*, 2003, v.56, p. 86–96.
8. *Ratajczak M.Z.* Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol.* 2008 Jul;15(4):293–300.

9. *Gratama J.W., Orfao A., Burnett D. et al.* European Working Groupe on Clinical Cell Analysis. – Flow cytometric enumeration of CD34+ Hematopoietic Stem and progenitor cells. – *Cytometry*. – 1998. – V.34. – p. 132.
10. *Shiftiel S., Lapid K., Kalchenko V. et al.* CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabecules. – *J. Exp. Med.* – 2008. – V. 8. – p. 2381–95.
11. *Ishikawa F., Livingston A.G., Minamiguchi H., Wingard J.R., Ogawa M.* Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+CD38- . – *Leukemia*. – 2003. – V. 17. – p. 960–4.
12. *Mayani H., Lansdorp P.M.* Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive haematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood*, 1994; 83: 2410–5.
13. *Humeau L., Bardinl., Maroc C.* Phenotypic, molecular and functional characterisation of human peripheral blood CD34+/Thy-1+ cells. – *Blood*, 1996; 87: 949–55.
14. *Becker P.S.* Optimizing stem cell mobilization: lessons learned. . *J Natl Compr Canc Netw*. 2014 Oct;12(10):1443–9.
15. *Hassan H.T., Zander A.* Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. – *Acta Haematol* 1996;95:257–62.
16. *Ashman L.K., Matsuoka Y., Sasaki Y. et al.* Low level of c-kit expression marks deeply quiescent murine hematopoietic stem cells. – *Stem Cells*. – 2011 – V.29 – 1783–91.
17. *Mirabelli P., Di Noto R., Lo Pardo C. et al.* Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigen implication for erythroid differentiation studies. – *BMC Physiol*. – 2008. – V.8. – p.13.
18. *Ponka P., Lok C. N.* The transferrin receptor: role in health and disease. – *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999-31 (10). – 1111–37.
19. *LeBien T.W.* Fates of human B-cell precursors. – *Blood*. – 2000. – V.96. – 9–23.
20. *Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al.* Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment granulocyte colony- stimulating factor. – *J. of Immunol.* – 2005. – V. 175. – p. 2647–54.
21. *Karsunky H., Inlay M.A., Serwold T., Bhattacharya D., Weissman I.L.* FLk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineage. – *Blood*. – 2008. – V. 111 (12). – p. 5562–70.
22. *Serwold T., Ehrilich L.I., Weissman I.L.* Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. – *Blood*. – 2009. – V.113 (4). – p. 807–15;
23. *Blanc C, Legac E, Binet J.L, Michel A, Debré P, Merle-Beral H.* Characterization of normal human bone marrow by flow cytometry. – *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* – 1991; 33: 231–5.

*Ф.А. Шамилов, Н.Н. Тупицын, И.К. Воротников, Я.А. Вишневецкая,
Н.А. Козлов, В.Ю. Сельчук.*

**ПОЛИОКСИДОНИЙ
В ПРЕДОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.
ПОЛНАЯ РЕГРЕССИЯ ОПУХОЛИ
В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ.
ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина», Москва**

Резюме

У 20 больных раком молочной железы полиоксидоний применен в неоадьювантном режиме. Оценено влияние препарата на субпопуляции интра-туморальных лимфоцитов. У 6 больных в материале хирургически удаленных опухолей отмечены явления иммуно-индуцированного патоморфоза; в одном имел место патоморфоз IV степени, т.е. полное исчезновение опухоли. Приводим описание данного наблюдения.

В целом среднее количество большинства субпопуляций интра-туморальных лимфоцитов не изменялось после иммунотерапии, достоверно снижались только NK-клетки (CD3–CD56⁺), однако их содержание было крайне низким: $1,68 \pm 0,3\%$ и $1,16 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$). Содержание CD4⁺ интра-туморальных лимфоцитов 6 больных с патоморфозом опухолевой ткани после применения полиоксидония было достоверно более высоким, чем в случаях отсутствия патоморфоза: $50,9 \pm 2,0\%$ и $42,1 \pm 2,0\%$, $p = 0,009$. У больной с 4 степенью иммунного патоморфоза содержание CD4⁺ интра-туморальных лимфоцитов возросло с 46,6 до 55,4% в процессе иммунотерапии, что отразилось на снижении индекса CD8/CD4 с 0,9 до 0,6. Исследование механизмов противоопухолевого действия полиоксидония нуждается в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадьювантная иммунотерапия, интра-туморальные CD4 лимфоциты, полиоксидоний.

F.A. Shamilov, N.N. Tupitsyn, I.K. Vorotnikov, Ya.A. Vyshnevskaya, V.Yu. Selchuk.

**IMMUNE MODULATOR POLYOXIDONIUM
IN PREOPERATIVE TREATMENT OF BREAST CANCER.
CASE REPORT OF COMPLETE TUMOR
REGRESSION DURING NEO-ADJUVANT IMMUNOTHERAPY.
FSBS "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow**

Summary

Polyoxidonium was used in neo-adjuvant regimen in 20 breast cancer patients. Influence of this immunomodulator on intratumoral lymphocyte subpopulations

was studied. In 6 (30%) patients study of surgically removed tumor revealed immune mediated pathomorphosis. In one case pathomorphosis of 4th degree (complete resorbtion of tumor) took place. The case is described in this paper. In general, mean numbers of lymphocytes of different subpopulations did not change after immunotherapy, except of NK cells (CD3–CD56+) which number diminished ($1,68 \pm 0,3\%$ and $1,16 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$). Percentage of CD4+ intratumoral lymphocytes in 6 patients with pathomorphosis of tumor tissue after polyoxidonium treatment was significantly higher than in the cases without pathomorphosis: $50,9 \pm 2,0\%$ и $42,1 \pm 2,0\%$, $p = 0,009$. In patient with 4th degree of pathomorphosis number of CD4 cells raised from 46,6 to 55,4% during immune therapy, so CD8/CD4 ratio declined from 0,9 to 0,6. Mechanisms of anti-tumor polyoxidonium action needs further investigations.

Key words: breast cancer, neo-adjuvant immune therapy, intratumoral CD4-lymphocytes, polyoxidonium

Введение

Исследования последних лет показали, что рост большинства злокачественных опухолей сопровождается значительными нарушениями различных звеньев иммунного ответа организма.

Снижение уровня Т-клеточной инфильтрации опухоли имеет определенную связь с регионарным метастазированием или наличием микрометастазов [1]. Размер опухоли не взаимосвязан с уровнями лимфоцитарной инфильтрации опухоли. Доказано, что увеличение количества интратуморальных Т-киллеров является фактором благоприятного прогноза у больных раком молочной железы, преимущественно без регионарного метастазирования [2].

Работами Университета Калифорнии (США) доказано, что инфильтрация опухолевой ткани рака молочной железы цитотоксическими лимфоцитами (CD8+) является фактором благоприятного прогноза, а выраженная инфильтрация CD4+ лимфоцитами и макрофагами, напротив, ухудшает прогноз [3;4].

Прогностическая роль субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы также достаточно хорошо известна. При однофакторном анализе главенствующая прогностическая роль принадлежит CD8+ лимфоцитам [5]. В отсутствие выраженной инфильтрации рака молочной железы CD8+ клетками CD4+ лимфоциты способствуют опухолевой инвазии и развитию отдаленных метастазов рака молочной железы путем влияния на протуморальную активность гематоассоциированных макрофагов [6].

Три клеточных типа—CD4+ и CD8+ лимфоциты, а также CD68+ макрофаги играют главную роль в прогнозе рака молочной железы.

На основании этих данных предложена трехмаркерная иммунная сигнатура для более точной оценки прогноза у больных раком молочной железы [7]. Иммунный профиль CD68^{Low}CD4^{Low}CD8^{High} характерен для первичного рака молочной железы, который даже в случаях только хирургического лечения, характеризуется высокими показателями общей и безрецидивной выживаемости. Напротив, иммунные ответы CD68^{High}CD4^{High}CD8^{Low} соответствуют группе больных с риском развития отдаленных метастазов и сниженной выживаемостью.

Таким образом, на сегодняшний день понятны прогностически благоприятные иммунологические параметры состава интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы.

В нашей работе предпринята попытка повлиять на субпопуляции интратуморальных лимфоцитов с помощью иммуномодулятора полиоксидония.

Материалы и методы

Клиническая характеристика больных

20 больным в возрасте от 32 до 78 лет (медиана–53,5) проводилась кор-биопсия опухоли, последующее лечение полиоксидонием, радикальная операция. Полиоксидоний применялся внутримышечно в дозе 12 мг в 1-й, 2-й, 3-й, 5-й, 7-й дни (1-й день–день кор-биопсии). Операция осуществлялась на следующий день после последнего введения полиоксидония.

Инфильтративный протоковый рак установлен у 14 пациенток (70,0%), инфильтративный дольковый–4 (20%), тубулярный–1 (5%), медулярный–1 (5%). Рецепторы эстрогенов были положительны в 16 случаях из 20 (80%), рецепторы прогестерона–в 14 из 20 (70%). Статус по Her2/neu: 0–9 (45%), 1+–7 (35,0%), 2+–3 (15,0%), 3+–1 (5,0%). В одном из 3 случаев, расцененных как 2+, экспрессия рецептора расценена как положительная на основании результатов FISH-реакции. Таким образом, положительный статус по Her2/neu имел место у 2 больных (20%). Пролиферативный индекс (Ki-67) находился в диапазоне от 7 до 75% (среднее–33,9 ± 17,4%). У 12 больных установлена 2-ая степень злокачественности (70,6%), у 5–3-я (29,4%).

Размеры опухоли в основном (95,0%, 19 больных) соответствовали индексу pT2, лишь в одном случае (5,0%)–pT1. Метастазы в регионарные лимфатические узлы установлены у 14 (70,0%) больных (N1–7 /35%/, N2–7 /35%/, у 6 больных (30%) метастазы отсутствовали. Отдаленных метастазов у больных анализируемой группы не было. В соответствии с клиническими стадиями заболевания больные распределились следующим образом: 1 стадия –1 (5%), 2а–5 (25%), 2б–7 (35%), 3а–7 (35%).

Иммунологические исследования

Иммунологическое исследование материала кор-биопсии и удаленной опухолевой ткани проводили методом 4-цветной проточной цитометрии с

использованием следующих комбинаций антител: 1-ая проба–CD4/CD3/CD25/CD45, 2-ая проба–CD8/CD3/CD56/CD45. Анализ данных проводили с использованием программы WinMDI или (в случаях, требующих дополнительной компенсации параметров флуоресценции)–программы FCS, версия 3. Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS.

Оценены следующие иммунологические показатели интратуморальных лимфоцитов:

- Общий уровень лимфоидной инфильтрации–количество CD45+ лимфоцитов по отношению к общему числу событий, набранных при проточной цитометрии.
- Процент зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) среди лимфоцитов (CD45+).
- Процент зрелых CD4+CD3+ Т-лимфоцитов.
- Процент зрелых Т-цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+
- Соотношение CD8/CD4
- Процент активированных (регуляторных) CD4+CD25+ клеток
- Процент NK-клеток–CD3–CD56+
- Процент TNK клеток–CD3+CD56+

Результаты

Все больные хорошо переносили введение полиоксидония. Осложнений нами не отмечено. Ни у кого из больных во время проведения иммуномодулирующей терапии и в послеоперационном периоде не было инфекционных заболеваний.

По результатам морфологического исследования хирургически удаленной опухоли у 6 из 20 больных (30%), получавших в неoadъювантном режиме только полиоксидоний, отмечен лечебный патоморфоз: у 3 больных–1 степени, у двух больных–патоморфоз второй степени, у 1 больной–патоморфоз 4 степени.

Особого внимания заслуживает клинический случай пациентки с полным лечебным патоморфозом.

Пациентка А., 32 лет, в мае 2012 при самообследовании выявила узел в левой молочной железе. Обратилась в поликлинику РОНЦ за консультацией. Выполнена маммография и УЗИ молочных желез: кожа нижне-наружного квадранте левой молочной железы отечна, утолщена. В том же квадранте в проекции пальпируемого уплотнения на прицельном снимке малой интенсивности образование размерами 3,0×3,4см. При УЗИ – в нижне-наружном квадранте левой молочной железы – отек и инфильтрация кожи, подкожно-жировой клетчатки; снижение гипозхогенности ткани без четких контуров на площади 3,0×2,0 см с усилением кровотока.

В обеих аксиллярных зонах гиперплазированные лимфоузлы до 1,5 см в диаметре.

Заключение

Изменения в ткани молочной железы следует дифференцировать между воспалительным процессом и раком молочной железы.

Пациентке для уточнения диагноза выполнена кор-биопсия левой молочной железы. Гистологическое заключение: небольшие фрагменты ткани молочной железы с разрастанием инфильтративного протокового рака 2 степени злокачественности (рис.1; 2).

Иммуногистохимическое исследование: рецепторы эстрагенов – 0 баллов, рецепторы прогестерона – 0 баллов, экспрессия HER2/neu – 0 баллов, индекс пролиферации опухолевых клеток Ki67 = 75%.

Комплексное обследование: отдаленных метастазов не выявлено.

В рамках исследовательского протокола начата иммунотерапия полиоксидонием по схеме 12 мг×1 раз в сутки в дни 1–3; 5; 7, после чего выполнено оперативное вмешательство в объеме радикальной мастэктомии слева с сохранением грудных мышц.

Плановое гистологическое исследование: молочная железа 25×21×6 см с регионарной клетчаткой. Кожа и сосок без видимых изменений. На разрезе в ткани молочной железы, в нижнем наружном квадранте участок уплотнения 6×5,5×5 см с нечеткими границами, представленный участками распадающейся серовато-желтой ткани, очагами темно-красного цвета с разрастаниями белесоватой ткани. На остальном протяжении ткань молочной железы представлена широкими прослойками белесоватой ткани и дольками жира. В регионарной клетчатке 16 лимфоузлов 0,5–1 см по длиннику, с жировым перерождением. Отдельно: подключичные лимфоузлы; фрагмент клетчатки с тремя узелками 0,5–1 см по длиннику, серого цвета – подмышечные лимфоузлы в салфетке без маркировки, 3 узелка 0,5–1 см по длиннику, серого цвета, эластичной консистенции.

1. Опухоль.
2. Сосок, ткань железы вне опухоли.
3. Лимфоузлы регионарной клетчатки.
4. Подключичные лимфоузлы.
5. Подмышечные лимфоузлы.

В молочной железе в области макроскопически описанных изменений обширные очаги выраженной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрации с многоядерными клетками типа клеток рассасывания инородных тел, гистицитозом, формированием неспецифических гранулем. Достоверных признаков опухолевого роста не обнаружено.

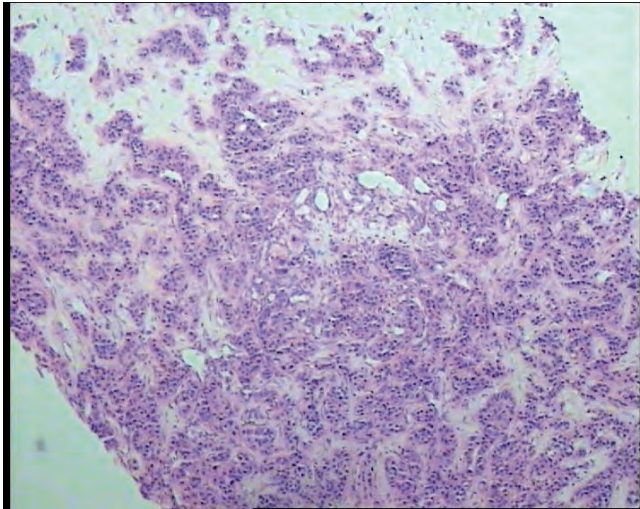


Рис. 1. Биопсия узлового новообразования молочной железы. Инвазивный рак неспецифического типа G₂. В верхней части микропрепарата показан инфильтративный край опухоли. Гематоксилин-эозин, $\times 50$.

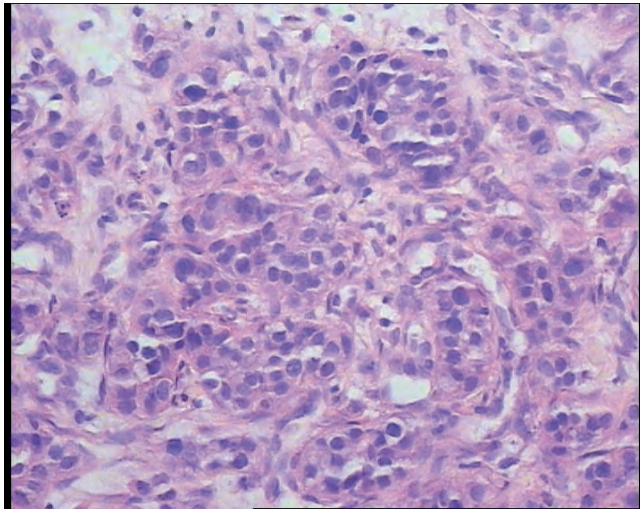


Рис. 2. Биопсия узлового новообразования молочной железы. Множественные комплексы инвазивного рака неспецифического типа G₂. Гематоксилин-эозин, $\times 200$.

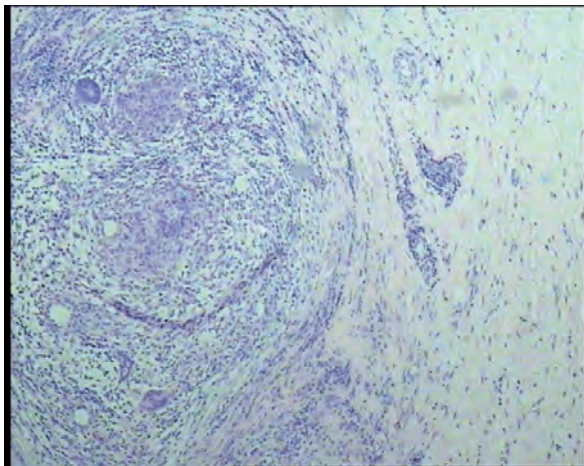


Рис. 3. Ткань молочной железы (операционный материал). Опухолевое ложе содержит множественные гранулемы без очагов некроза, с плотной лимфоидной инфильтрацией по периферии (слева) и широкие поля фиброзной ткани (справа), среди которых встречается редкие предсуществующие протоки молочной железы (левый верхний угол) – элементы опухолевого роста не обнаружены. Гематоксилин-эозин, $\times 50$.

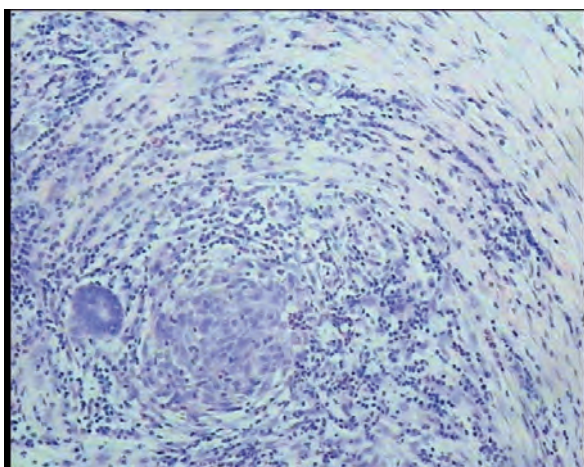


Рис. 4. Ткань молочной железы (операционный материал). Деталь предыдущего снимка – эпителиоидноклеточная гранулема с лимфоидной инфильтрацией и мелким предсуществующим протоком в фиброзированном опухолевом ложе. Гематоксилин-эозин, $\times 100$.

Вышеописанные изменения можно трактовать как признаки полного лечебного патоморфоза опухоли (рис.3–5). В ткани молочной железы на остальном протяжении эктазия протоков. Сосок и кожа обычного строения. Во всех лимфатических узлах регионарной клетчатки – признаки реактивной гиперплазии, липоматоз.

Пациентка консультирована химиотерапевтами; принято решение о продолжении иммунотерапии полиоксидонием по 6 мг 1 раз до года.

Через 24 месяца проведено комплексное обследование. Данных за прогрессирование не выявлено.

При анализе субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов после иммунотерапии полиоксидонием в группах больных с наличием и отсутствием иммунного патоморфоза выявлены достоверные различия лишь по 2 показателям: при наличии патоморфоза процентное содержание CD4⁺ лимфоцитов было более высоким ($40,89 \pm 2,26\%$ и $50,91 \pm 2,05\%$, $p = 0,006$), а соотношение CD8/CD4 – более низким ($1,17 \pm 0,13$ и $0,79 \pm 0,09$; $p = 0,03$). В описанном нами случае изменения после применения полиоксидония заключались в нарастании интратуморальных CD4⁺ лимфоцитов с 46,6% до 55,4% и снижении индекса CD8/CD4 с 0,9 до 0,6.

Обсуждение

В последние несколько лет наметился явный прорыв в области клинической иммунологии рака молочной железы. Авторитетнейшие фундаментальные американские журналы PNAS и Cancer Discovery опубликовали статьи, доказывающие главенствующую роль иммунной системы человека в прогнозе рака молочной железы [8; 9] при изучении тонких взаимодействий между Т-хелперными (CD4), Т-цитотоксическими (CD8) лимфоцитами и макрофагами, присутствующими в ткани опухоли, то есть интратуморальными клетками иммунной системы [14; 15]. К аналогичным результатам пришли и отечественные ученые, убедительно доказавшие важную прогностическую роль количества и качественного состава интратуморальных лимфоцитов (в особенности – CD8⁺ Т-цитотоксических клеток) в прогнозе рака молочной железы [10; 11]. Результаты этих работ проливают свет на то, какие клетки иммунной системы являются наиболее важными с точки зрения противоопухолевого иммунитета, и открывают перспективы поиска иммунологических путей воздействия для активации данных клеточных типов.

При длительном (7–15 лет) наблюдении за больными после радикального хирургического лечения показано: высокие уровни инфильтрации опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8⁺) являются важным фактором благоприятного прогноза, в особенности, у пациенток, не имеющих метастазов в регионарные лимфатические узлы, N₀ [1].

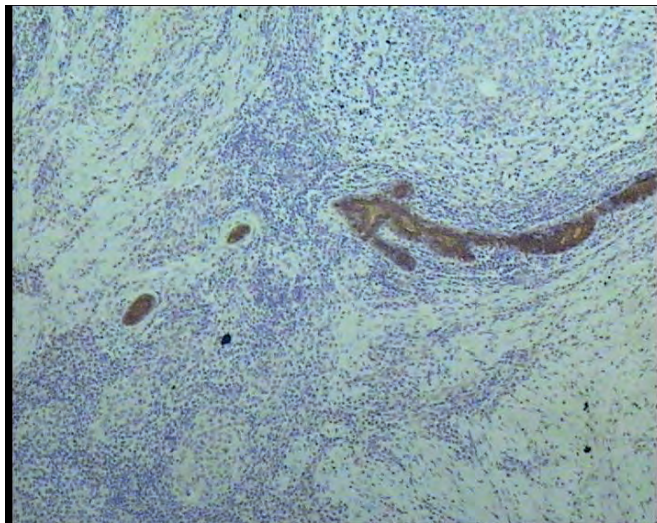


Рис. 5. Ткань молочной железы (операционный материал). Экспрессия панцитокератина ограничена сохранными предсуществующими протоками молочной железы – гистологическая картина полного лечебного патоморфоза. Иммунопероксидазная реакция с антителами к панцитокератину (докраска гематоксилином Майера), $\times 50$.

В отсутствие выраженной инфильтрации рака молочной железы $CD8^+$ клетками $CD4^+$ лимфоциты способствуют опухолевой инвазии и развитию отдаленных метастазов РМЖ путем влияния на протуморальную активность опухолеассоциированных макрофагов [1–3].

Учитывая то, что три клеточных типа – $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоциты, а также $CD68^+$ макрофаги играют главную роль в прогнозе РМЖ, предложена трех-маркерная иммунная сигнатура для более точной оценки прогноза у больных [5]. Иммунный профиль $CD68^{Low}CD4^{Low}CD8^{High}$ характерен для первичного рака молочной железы, который даже в случаях только хирургического лечения, характеризуется высокими показателями ОВ и БРВ. Напротив, иммунные ответы $CD68^{High}CD4^{High}CD8^{Low}$ соответствуют группе больных с риском развития отдаленных метастазов и сниженной выживаемостью.

Накопленные факты относительно влияния различных популяций интратуморальных лимфоцитов на прогноз рака молочной железы ставят со всей определенностью вопрос, может ли быть проведена иммунокоррекция в направлении прогностически благоприятных профилей субпопуляционного состава интратуморальных лимфоцитов. На сегодняшний день подобных работ нет.

Одним из перспективных и разрешенных к клиническому использованию в онкологии иммуномодуляторов является полиоксидоний (азоксимера бромид; сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромид). Он обладает выраженной иммуномодулирующей активностью и прежде всего, действует на систему врожденного иммунитета, усиливает функциональную активность как клеточного, так и гуморального иммунитета [16]. В конечном итоге под действием полиоксидония активируется вся иммунная система организма.

Данная активация аналогична формированию иммунной реакции в ответ на антигенный (патогенный) фактор [12]. В условиях *in vivo* препарат обладает выраженной способностью стимулировать гуморальный иммунный ответ [13].

Интересно отметить, что в нашей работе полиоксидоний приводил в 30% случаев РМЖ к лечебному патоморфозу различной степени (от I до IV). Особого внимания заслуживает рассмотренный случай. Механизм данного явления является иммуно-опосредованным и требует дальнейшего детального изучения.

Необходимо отметить: по-видимому, возможны различные механизмы реализации противоопухолевого иммунного ответа. Наиболее изученной, с доказанной благоприятной прогностической ролью является выраженная интратуморальная инфильтрация $CD8^+$. Этот механизм считается (Е.В. Артамонова, некоторые американские ученые) ведущим, наиболее значимым в прогнозе РМЖ.

Попытка стимуляции данного звена иммунитета с помощью полиоксидония не привела к успеху: содержание $CD8^+$ интратуморальных лимфоцитов не различалось до и после назначения препарата.

Как показали ранее опубликованные нами данные, на уровне опухолевой ткани полиоксидоний обладает своего рода иммуномодулирующим действием. Он снижает уровни интратуморальных лимфоцитов в случаях их содержания выше медианы и, напротив, — повышает при уровнях ниже медианы [17].

У 30% больных в нашем исследовании применение полиоксидония вело к развитию иммунного патоморфоза опухолевой ткани. Анализ состава интратуморальных лимфоцитов у больных с наличием/отсутствием патоморфоза показал преобладание $CD4^+$ популяции в случаях наличия противоопухолевого эффекта препарата.

В наиболее типичном случае (патоморфоз IV степени) отмечено нарастание уровней $CD4^+$ лимфоцитов после применения полиоксидония. По-видимому, сбрасывать со счетов роль популяции $CD4^+$ преждевременно. Изучение влияния полиоксидония на интратуморальные лимфоциты $CD4^+$ у больных раком молочной железы должно быть продолжено.

Литература

1. Крохина О.В. Микрометастазы рака молочной железы в костный мозг. Иммуноморфологическая диагностика: дис... канд. мед. наук: 14.00.14 / Крохина Ольга Владимировна. М., 2003. – 170 с.
2. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы: дис... д-ра мед. наук: 14.01.12 / Артамонова Елена Вячеславовна. – М., 2003. – 311 с.
3. DeNardo D.G. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages / D.G. DeNardo et al. // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol. 16. – P. 817-819.
4. Rouse B.T. Anti-theta serum-induced suppression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to syngeneic plasma cell tumour / B.T. Rouse, M. Rollinghoff, N.L. Warner // *Nat. New Biol.* – 1972. – Vol. 238. – P. 116-117.
5. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы / Е.В. Артамонова // *Иммунология гемопозза*. – 2009. – Т. 6, № 1. – С. 8-51.
6. Daniel D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells / D. Daniel, N. Meyer-Morse, E.K. Bergsland et al. // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 197. – P. 1017-1028.
7. DeNardo D.G. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages / D.G. DeNardo et al. // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol. 16. – P. 817-819.
8. DeNardo D.G. Leucocyte complexity in breast cancer predicts overall survival and functionally regulates response to chemotherapy / D.G. DeNardo et al. // *Cancer discovery*. – 2011. – Vol. 1, N 1. – P. 54-67.
9. Sachs G. Lyric effector cell activity and major depressive disorder in patients with breast cancer: a prospective study / G. Sachs, S. Rasoul-Rockenschaub, H. Aschauer et al. // *J. Neuroimmunol.* – 1995. – Vol. 59. – P. 83-89.
10. Beatty G.L., Paterson Y. IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen // *J. Immunol.* -2000. –V.165. –P.5502-5508
11. Beck-Engeser G.B., Monach P.A., Mumberg D. et al. Point mutations in essential genes with loss or mutation of the second allele: relevance to the retention of tumor-specific antigens // *J. Exp. Med.* -2001. –V.194. –P.285-300
12. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // *Цитокины и воспаление*. -2004. –Т.3, №3. –С.41-47

13. Дьяконова В.А., Дамбаева С.В. и др. Изучение механизма действия иммуномодулятора Полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro*. // Физиология и патология иммунной системы. -2004. –Т8, №2. – С.32-36
14. Wang H.Y. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy / H.Y. Wang, D.A. Lee, G. Peng et al. // Immunity. – 2004. – Vol. 20. – P. 107-118.
15. Lang P.A. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity / P.A. Lang, K.S. Lang, H.C. Xu et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol.109, N 4. – P.1210-1215.
16. Монахов, А.С. Определение клинической и цитогенетической эффективности иммунотерапии полиоксидонием у больных с меланомой кожи (предварительные результаты) / А.С. Монахов, В.В. Анисимов, А.С. Барчук // Иммунология. – 2005. – № 4. – С. 231-235.
17. Воротников И.К., Шамилов Ф.А., Шевцов В.А., Ельшина Г.А., Буров Д.А., Вишневская Я.В., Чхиквадзе Н.В., Зернов Д.И., Тимошенко В.В., Сельчук В.Ю., Родионова Н.В., Тупицын Н.Н. /Критерии эффективности неoadъювантной иммуномодулирующей терапии полиоксидонием у больных раком молочной железы (предварительные результаты). //Биопрепараты. -2014. –Т.50, №2. – С.42-48

Е.С. Обаревич, В.А. Горбунова, Н.С. Бесова, М.М. Давыдов, Н.Н. Тупицын
**КОСТНЫЙ МОЗГ
БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА.
(КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)**
ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина»

Резюме

По данным международных исследований диссеминированные опухолевые клетки (ДОК), выявляемые в костном мозге онкологических больных на диагностическом этапе, являются в дальнейшем основным источником отдаленных метастазов. Методом проточной цитометрии определяли диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге больных диссеминированным раком желудка, (к ДОК⁺ случаям относили таковые с наличием не менее 1 опухолевой клетки на 10 млн миелокариоцитов).

ДОК обнаружены у 18 из 27 пациентов. Больные с наличием ДОК в костном мозге имели худшие показатели выживаемости без прогрессирования в сравнении с лицами, у которых опухолевые клетки в костном мозге отсутствовали ($p = 0,019$; $\chi^2 = 5,49$). Присутствие ДОК в КМ достоверно чаще наблюдается при раке желудка с первичной локализацией в области кардиоэзофагеального перехода (0,049). При наличии канцероматоза брюшины поражение костного мозга наблюдается достоверно реже, чем в случаях отсутствия диссеминации ($p = 0,049$). По результатам, представленным в нашем исследовании, можно сделать вывод: наличие ДОК в костном мозге у больных раком желудка 4 стадии ассоциировано с крайне неблагоприятным прогнозом и высоким риском раннего прогрессирования.

Ключевые слова: диссеминированный рак желудка, костный мозг, диссеминированные опухолевые клетки, проточная цитометрия.

E.S. Obarevich, V.A. Gorbunova, M.M. Davydov, N.N. Tupitsyn

BONE MARROW IN PATIENTS WITH DISSEMINATED GASTRIC CANCER

Federal State Budgetary Scientific Institute "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center"

Abstract

Numerous multicenter trials has shown that disseminated tumor cells (DTC) diagnosed in bone marrow, are the main source of distant metastases. We studied by flow cytometry method presence of DTC in 27 patients with metastatic gastric cancer (DTC-positive cases were ones with 1 or more cancer cells per 10 millions of myelocaryocytes).

BM-DTCs were found in 18 patients. PFS was significantly higher in group with no BM-DTC ($p = 0,019$; $\chi^2 = 5,49$). DTCs were statistically more frequently detected in patients with the localization of primary tumor in cardio-oesophageal junction ($p = 0,049$). In patients with peritoneal dissemination of tumor DTCs were detected less frequently ($p = 0,049$). In conclusion, preliminary results of our study show that BM-DTC is a factor of unfavorable prognosis of IV stage gastric cancer patients and associates with high risk of progression.

Key words: bone marrow, disseminated tumor cells, flow cytometry, disseminated gastric cancer.

Введение

Рак желудка является одной из нерешенных, наиболее актуальных проблем в современной клинической онкологии, сохраняя на протяжении нескольких лет третью в мире позицию (8,8%) в структуре смертности от злокачественных заболеваний.

В 2012 г. по данным мировой статистики было диагностировано 952 000 новых случаев РЖ и 723 000 смертельных исходов от него [1].

Высокие показатели летальности обусловлены не только низкой выявляемостью ранних форм РЖ, но и невозможностью адекватно оценивать МРБ после проведенной терапии, прогнозировать дальнейший исход.

Попыткой к индивидуализации подхода к лечению больных диссеминированным раком желудка явилось проведение морфологической и иммунологической оценки аспиратов костного мозга на этапе диагностики заболевания с целью определения диссеминированных опухолевых клеток.

Материалы и методы

В 11.2013–04.2015г. в РОНЦ им. Н.Н. Блохина инициировано исследование по выявлению микрометастазов и/или диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных раком желудка IV стадии. Подробные исходные данные по пациентам представлены в табл. 1.

Оценка ДОК-КМ выполнялась 27 больным раком желудка IV стадии перед началом специфического лечения.

Иммунофенотипическая диагностика осуществлялась на материале, полученном при пункции костного мозга (1 000 000).

Определение микрометастазов проводили методом проточной цитометрии с окрашиванием антителами CD45 и EpCam или CD45 и цитокератины, как описано ранее [2].

К ДОК⁺ случаям относили таковые с наличием не менее 1 опухолевой клетки на 10 млн миелокариоцитов.

Результаты

Из всей группы пациентов у 18 (66,7%) было обнаружено поражение костного мозга, в 33,3% случаев ($n = 9$) ДОК в костном мозге отсутствовали.

Анализ данных показал, что ДОК в КМ достоверно чаще выявлялись при локализации первичной опухоли желудка в области кадиоэзофагеального перехода (КЭП). У этих больных ДОК выявляли в 90% случаев ($p = 0,049$). Интересно отметить, что ни в одном из двух случаев тотального поражения желудка ДОК не выявлены, данные достоверны ($p = 0,038$), несмотря на крайнюю малочисленность больных с тотальным поражением желудка.

Интересно отметить: при наличии канцероматоза брюшины ДОК в костном мозге определяли достоверно реже (53 и 90 %, $p = 0,049$).

Не отмечено связи наличия ДОК с полом, гистологической формой опухоли, наличием метастазов в забрюшинных и периферических лимфатических узлах, отдаленных метастазов в печени, костях, яичниках.

Не выявлено достоверной ассоциации наличия ДОК с ответом на противоопухолевую терапию: частичная регрессия, стабилизация, прогрессирование (табл.). Мы изучили выживаемость без прогрессирования (PFS) у больных диссеминированным раком желудка в зависимости от наличия диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге на этапе диагностики. Больные с наличием ДОК имели достоверно более короткую выживаемость без прогрессирования ($p = 0,019$). Сравнение кривых выживаемости представлено на рис. 1.

При анализе всей группы больных диссеминированным раком желудка медиана наблюдения составила 11,1мес.

Медиана ВВП в группе больных с исходно выявленным поражением костного мозга составила 6,5мес., в группе больных с отсутствием микрометастазов – 9,2 мес. При сравнении по long-rank тесту различия оказались статистически значимыми ($p = 0,019$).

Наличие метастазов в печени, костях, забрюшинных или периферических лимфатических узлах, диссеминации по брюшине, яичниках не влияли на ВВП ($p > 0,05$).

Обсуждение

Данные нашего исследования продемонстрировали высокую частоту поражения/вовлечения костного мозга при диссеминированном раке желудка (67% случаев).

Согласно полученным результатам, наличие ДОК в костном мозге было напрямую связано с имплантационной и гематогенной диссеминацией опухоли.

Таблица

Взаимосвязь наличия ДОК у больных раком желудка IV стадии с полом, первичной локализацией опухоли в желудке, гистологической формой рака, N⁺, M⁺, ответом на противоопухолевую терапию.

Характеристика	Количество больных		X ²	p	
	абс. (n = 27)	%			
<i>Пол</i>					
Мужчины	+	12/17	66,7	0,32	0,570
Женщины	+	6/10	33,3		
<i>Локализация опухоли в желудке</i>					
КЭП	+	9/10	90	3,9	0,049
	-	9/17	10		
Тело	+	6/10	60	0,32	0,573
	-	12/17	70,6		
Антральный отдел	+	3/5	60	0,12	0,726
	-	15/22	68,2		
Тотальное поражение	+	0/2	0	4,32	0,038
	-	18/25	72		
<i>Гистологическая форма опухоли</i>					
Аденокарцинома	+	14/20	70	0,39	0,535
	-	4/7	57,1		
Перстневидноклеточный рак	+	4/7	57,1	0,39	0,535
	-	14/20	70		
Недифференцированный	+	0/1	0	2,78	0,150
	-	18/26	69,2		
<i>Локализация метастатических очагов</i>					
Печень	+	6/9	66,7	0,10	0,920
	-	11/17	64,7		
Кости	+	3/3	100	1,69	0,194
	-	15/24	62,5		
Периферические л/у	+	4/7	57,1	0,39	0,535
	-	14/20	70		
Забрюшинные л/у	+	8/10	80	1,27	0,260
	-	10/17	58,8		
Яичники	+	1/2	50	0,27	0,603
	-	17/25	68		
Канцероматоз брюшины	+	9/17	52,9	3,89	0,049
	-	9/10	90		
<i>Эффект</i>					
Частичный эффект	+	5/10	50	1,99	0,159
	-	13/17	76,5		
Стабилизация	+	4/6	66,7	0	1
	-	14/21	66,7		
Прогрессирование	+	6/7	85,7	1,54	0,214
	-	12/20	60		

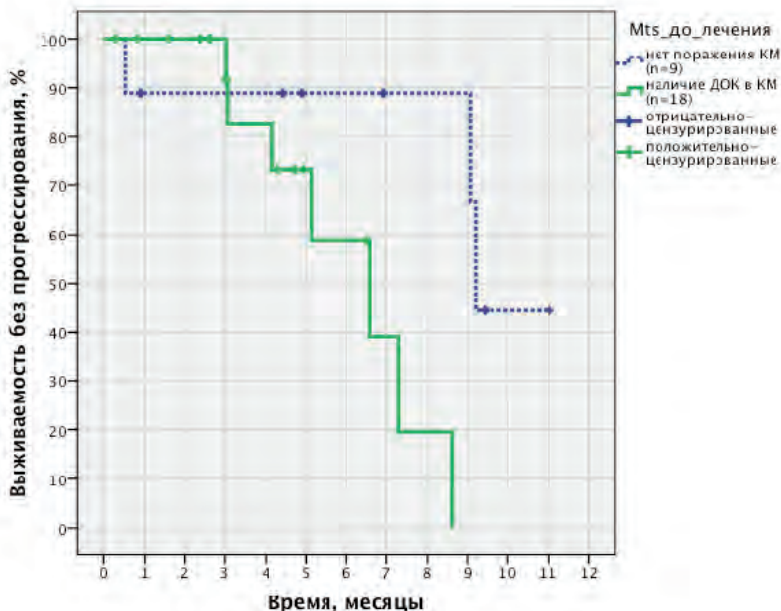


Рис. Сравнение PFS у больных с ДОК в костном мозге (сплошная линия) / без ДОК в костном мозге (пунктир). Различия высоко достоверны, $p = 0,019$.

Напротив, у больных с канцероматозом брюшины ДОК выявляли достоверно реже. При тотальном поражении желудка ни в одном из 2 случаев ДОК-КМ не были обнаружены. Таким образом, местная распространенность рака желудка и гематогенная диссеминация опухолевых клеток – показатели, не взаимосвязанные между собой. Более того, они могут находиться в реципрокных взаимоотношениях.

Время до прогрессирования оказалось достоверно короче в группе больных с ДОК в костном мозге. Соответственно, вероятность успешного лечения рака желудка достоверно выше у больных с отсутствием специфического поражения костного мозга. Для оценки прогноза заболевания, перспектив лечения данный фактор является одним из определяющих. Иными словами, даже наличие отдаленных метастазов не является столь грозным препятствием в борьбе за жизнь больного диссеминированным раком желудка как специфическое поражение костного мозга.

Полученные нами данные хорошо соотносятся с современными представлениями о роли костного мозга в опухолевой прогрессии.

В костном мозге опухолевые клетки могут присутствовать в латентном состоянии в течение длительного времени, а затем давать начало отдаленным гематогенным метастазам. Помимо этого фактора, необходимо акцентировать внимание на том, что метастазирование происходит не однонаправленно – от первичной опухоли к отдаленным органам, но и, наоборот, от метастазов в первичную опухоль. Этот процесс, открытый в самое последнее время и детально разбиравшийся на 9 Международной конференции «Иммунология гемопоэза» в докладе директора института биологии рака в Гамбурге Клауса Пантеля, представляет собой одно из наиболее фундаментальных, присущих только опухолевым клеткам феноменов. Малигнизированные клетки, повторно попадая в первичную опухоль из отдаленных метастазов, во-первых, стимулируют её бурный рост, а во-вторых, приобретают новые свойства полиорганного метастазирования [3]. В наблюдаемой нами когорте больных наличие опухолевой диссеминации в костном мозге наблюдалось на фоне существующей неоперабельной первичной опухоли желудка. И создавались идеальные условия для повторного обсеменения первичной опухоли метастатическими клетками, что, как известно, сопровождается бурным ростом первичной опухоли и возникновением новых очагов отдаленного метастазирования [4]. Следовательно, при отсутствии эффективной лекарственной терапии рака желудка, единственным способом предотвращения быстрого прогрессирования этой опухоли является совершенствование хирургической тактики, направленной на максимальную эрадикацию первичной опухоли, в том числе – и ее отсевов по брюшине. В этих случаях присутствующие в костном мозге диссеминированные опухолевые клетки не столь грозны. На примере радикально удаляемых опухолей (РМЖ доказано: ДОК в костном мозге могут персистировать в течение многих лет и десятилетий. Разумеется, сам факт их наличия является фактором неблагоприятного прогноза [5].

Нельзя не учитывать и взаимосвязь первичной локализации опухоли в желудке с частотой поражения костного мозга. При раке области кардиоэзофагеального перехода частота обнаружения ДОК достигала 90%, что достоверно выше, чем при любой другой локализации в органе. При большой распространенности опухоли, отсутствии её чувствительности к химиотерапии, надеяться на хирургический этап лечения возможно далеко не во всех случаях. И здесь опять на помощь приходит фундаментальная наука. Дело в том, что метастазирование опухолевых клеток в первичную опухоль – активный процесс, управляемый ИЛ-6. Учитывая немногочисленные данные международных исследований, предполагаем: вторичное обсеменение опухоли реально предотвратить, используя антитела к ИЛ-6 или его рецептору gp80. В настоящее время уже разработаны лечебные антитела (силтуксимаб, тоцилизумаб), позволяющие блокировать как растворимый ИЛ-6, так и взаимодействие цитокина со специфическим рецептором gp80 [6].

Диссеминированные раковые клетки во много имеют свойства стволовых раковых клеток. Они более резистентны к химиолучевой терапии, чем первичная опухоль. В настоящее время стратегически важным является создание новых классов лечебных препаратов, направленных на уничтожение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.

Завершая сказанное, отметим: исследование костного мозга у больных диссеминированным раком желудка должно быть более широко использовано как полезный и информативный метод выбора лечебной тактики и оценки прогноза.

Литература

1. *Siegel R., Naishadham D., Jemal A.* Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 2012.
2. *Davydov M.I., Tupitsin N.N., Grigorieva T.A. et al.* Assessment of minimal bone marrow involvement by flow cytometry in cancer patients. *Haematopoiesis Immunology*. 2014. – Т.12, №1-2. –С.8-17.
3. *Kim M.Y., Oskarsson T., Achryya S. et al.* Tumor self-seeding by circulating cancer cells. // *Cell*. -2009. –V.139, №7. –P. 1315–26.
4. *Тупицын Н.Н.* Биологическое и клиническое значение циркулирующих и диссеминированных раковых клеток. // *Иммунология гемопоэза*. 2012. – Т.10, №2. –С.35-45.
5. *Braun S., Vogl F.D., Naume B. et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastases in breast cancer. // *New Engl. J. Med.* – 2005. –V. 353. – P. 793-802.
6. *Жан-Франсуа Росси.* Интерлейкин-6 как терапевтическая мишень при иммунопатологии и онкологических заболеваниях. *Иммунология гемопоэза*. 2012. –Т.10, №2. – С. 8–34.

*И.В. Буравцова, М.Н. Костюкова, Н.Н. Калитин, А.К. Голенков,
Н.Н. Тупицын, А.Ф. Карамышева*

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК CD138 И РЕЦЕПТОРА ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ VEGFR3 У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ: КОРРЕЛЯЦИЯ С ПРОГНОЗОМ

Множественная миелома (ММ) характеризуется клональной пролиферацией плазматических клеток в костном мозге. Плазматические клетки экспрессируют факторы роста эндотелия сосудов VEGF и их рецепторы VEGFR, в связи с чем эти сигнальные системы могут не только участвовать в развитии неоангиогенеза при ММ, но и стимулировать размножение самих плазматических клеток по аутокринному механизму.

В аспиратах костного мозга 33 больных ММ была исследована экспрессия мРНК факторов роста эндотелия сосудов VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D и их рецепторов VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3 до и после проведенного лечения. Экспрессия мРНК факторов роста VEGF и их рецепторов была сопоставлена с такими клиническими характеристиками как выживаемость и плазмоцитоз.

При сравнении выживаемости в группах больных, различающихся по коэкспрессии VEGF-A/VEGFR1 и VEGF-C, VEGF-D/VEGFR3 оказалось, что наименьшей была выживаемость в группе больных с отсутствием коэкспрессии мРНК VEGF-C, VEGF-D/ VEGFR3. В группе больных, у которых после лечения экспрессия мРНК VEGFR3 повысилась, выживаемость была лучше, чем в группах больных, у которых экспрессия мРНК этого рецептора осталась неизменной или понизилась. Самой низкой была выживаемость в группе больных, где экспрессия мРНК VEGFR3 снизилась. Эти данные указывали на то, что отсутствие экспрессии рецептора VEGFR3 в плазматических клетках может служить негативным признаком развития заболевания.

Для более детальной характеристики плазматических клеток, различающихся по экспрессии VEGFR3, экспрессия этого рецептора была исследована у 23 больных ММ с помощью проточной цитометрии. У большинства исследованных больных (16/23) доля экспрессирующих VEGFR3 плазматических клеток составляла 93–99%. Анализ данных проточной цитометрии показал, что популяция плазматических клеток больных ММ в 21 случае из 23 исследованных состоит из 2-х фракций: CD38⁺⁺/CD138⁺ и CD38⁺⁺/CD138⁻. Популяция клеток CD38⁺⁺/CD138⁻ во всех исследованных случаях не отличалась от популяции клеток CD38⁺⁺/CD138⁺ ни по одному из других используемых маркеров (CD19, CD45, CD56), но была отрицательной по экспрессии VEGFR3.

Таким образом, в большинстве плазматических клеток больных ММ наблюдается высокий уровень экспрессии VEGFR3, при этом экспрессия VEGFR3 отсутствует в CD138⁻ популяции плазматических клеток. Выживаемость больных ММ с отсутствием экспрессии VEGFR3 снижена, что указывает на необходимость учета популяции клеток CD138⁻ при характеристике больных ММ и дает возможность сделать предположение о том, что VEGFR3 может служить одним из прогностических факторов при множественной миеломе.