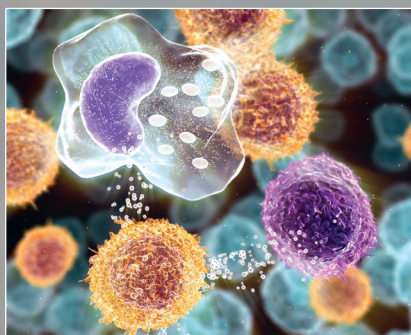


ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HAEMATOPOÏESIS
IMMUNOLOGY

И 1-2/2013



ISSN 1818-4820



9 771818 482005

CONGRATULATIONS
CATHERINE ALIX-PANABIERES
National Academy of Medicine - French Cancer Price
Gallet & Breton



Премия «*GALLET И BRETON*» - присваивается одному исследователю или одной группе исследователей (D. 13/12/1985 - ежегодная).
Предназначена для поощрения или поддержки исследовательской работы, проделанной одним человеком или группой ученых, в области изучения рака.
Самый большой приз Франции в области онкологии.

PRIX GALLET ET BRETON - Partage interdit - (D. 13.12.1985 - Annuel).
Destiné à récompenser ou aider un travail personnel ou réalisé par un groupe, concernant des recherches ou des progrès techniques ou thérapeutiques, relatifs à la cancérologie.

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
1-2/2013 том 11

Учредитель: РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН (лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРЫ 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. Брошье (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. Тюлядин (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 77-51917 от 29.11.2012
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписано в печать 31.12.2012. Формат 60×90/8.
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

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
1-2/2013 vol. 11

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (H/Ematopoiesis 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. Ramazanov (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzsk)
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
Haematopoiesis immunolog
Coordinator: E.G. Turnyanskaya. Design: B.B. Krukov

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА.....4

<i>Кампос Л., Аанеи К., Фландрин-Креста П., Гиотат Д.</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ	8
---	---

<i>Горбунова Т.В., Поляков В.Г., Шведова Т.В., Серебрякова И.Н., Тимошенко В.В., Тупицын Н.Н.</i> АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ ПРИ РАБДОМИОСАРКОМЕ И ОССЮ	32
--	----

<i>Маркина И.Г., Тупицын Н.Н., Демидов Л.В.</i> КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ	72
--	----

<i>Ламбер К.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫРАЖЕННОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ Т-КЛЕТОК МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ	102
---	-----

<i>К.М. Аанеи, П. Фландрин-Греста, Э. Тавернье, Д. Гиота, Л. Кампос</i> РОЛЬ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПАТОФИЗИОЛОГИИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА ...	122
--	-----

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ.....164

Программа

10 Международной конференции «Иммунология гемопоэза» 6-7 июня 2013.....	182
--	-----

**Организация X международной конференции «Иммунология гемопоэза»
и публикация материалов конференции в настоящем номере
«Иммунологии гемопоэза» поддержаны Российским фондом
фундаментальных исследований, Грант №13-04-06031-г**

CONTENTS

FROM THE EDITOR.....5

<i>Campos L., Aanei C., Flandrin-Gresta P., Guyotat D.</i> DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA BY FLOW CYTOMETRY	9
--	---

<i>Gorbunova T.V., Polyakov V.G., Shvedova T.V., Serebryakova I.N., Timoshenko, V.V., Tupitsyn N.N.</i> ANALYSIS OF CLINICALLY SIGNIFICANT SUBSETS OF BONE MARROW LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH RHABDOMYOSARKOMA AND ESET	33
--	----

<i>Markina I.G., Tupitsyn N.N., Demidov L.V.</i> CLINICAL SIGNIFICANCE OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN CUTANEOUS MELANOMA	73
---	----

<i>Lambert C.</i> EXPLORING THE T-CELL HIGH DIVERSITY USING FLOWCYTOMETRY	103
---	-----

<i>Aanei C.M., Flandrin-Gresta P., Tavernier E., Guyotat D., Campos L.</i> THE PLACE OF STROMAL MICROENVIRONMENT IN MYELODISPLASTIC SYNDROMES (MDS) PATHOPHYSIOLOGY	123
---	-----

<i>van de Loosdrecht, A.A and Westers T.M.</i> THE EMERGING IMPACT OF FLOW CYTOMETRY IN MYELODISPLASTIC SYNDROMES	137
---	-----

<i>RAWSTRON A.</i> MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD) AS AN END-POINT IN CLINICAL TRIALS: AN UPDATE FROM THE US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION PUBLIC WORKSHOP	144
--	-----

<i>Kolbatskaya O.P., Tupitsyn N.N.</i> BONE MARROW LYMPHOCYTE SUBSETS IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA AT DIAGNOSIS	150
--	-----

ABSTRACTS	164
------------------------	-----

Program

of 10 th International Conference “Haematopoiesis Immunology”. June 6-7, 2013.....	182
--	-----

**Organization of 10th International Conference «Haematopoiesis Immunology»
and publication of materials in this issue was supported by Russian
Foundation for Basic Research, grant № 13-04-06031-g**

ОТ РЕДАКТОРА

Очень быстро пролетели 10 лет (2003–2013 гг.). И вот уже лаборатории иммунологии гемопоэза – 10 лет. 6-м июня 2003 года датирован приказ директора Центра академика М.И. Давыдова о создании лаборатории.

Начиная с этой даты каждый год 6 июня в день рождения великого русского поэта А.С. Пушкина мы проводим конференцию «Иммунология гемопоэза». Первые годы она была внутринститутской, затем – Российской, затем – с международным участием. И, наконец, в последние годы конференция может по праву считаться международной (например, в программе 2013-го года – 10 докладов ведущих ученых США, Англии, Германии, Франции, Нидерландов, Турции, Австралии и других стран). Главную роль в определении направленности конференции сыграл профессор Джордж Джаносси (Англия). Этот крупный иммунолог современности привлек в 2006 году внимание к проблеме минимальной остаточной болезни при лейкозах. И эта проблема получила свое развитие при раке и в формулировке проблемы эрадикации минимального рака – главной теме конференции 2013 года. Эта проблема, широко разрабатываемая во всем мире, получила развитие и в России. Главная заслуга в этом принадлежит лидерам в области изучения циркулирующих раковых клеток, участникам конференции профессору Клаусу Пантелу (Германия) и Катрин Аликс-Панабьер (Франция). О значении этих работ свидетельствует высокая оценка Академии наук Франции, присвоившей главный приз Франции в области онкологии в 2012 году Катрин Аликс-Панабьер.

С первого же года существования лаборатории мы стали выпускать «Иммунологию гемопоэза», до 2006 года как сборник трудов, а с 2006 года как полноценный журнал на русском и английском языках. И в этом году «Иммунология гемопоэза» – 10 лет. Журнал всё более привлекает зарубежных ученых, и в настоящем номере они представили 5 статей. Сердечно благодарю руководителя издательской группы к.м.н. Е.Г. Турнянскую.

Лаборатория многое сделала за 10 лет. Укреплен кадровый состав, в штат вернулись когда-то ушедшие из онкоцентра опытные гематоцитологи Н.Б. Лебедева и З.Д. Жарова, подготовлены молодые кадры морфологов и иммунологов – Л.Ю. Гривцова, Н.А. Купрышина, О.П. Колбацкая, С.В. Чулкова, А.В. Моженкова, Я.А. Удалова, М.Н. Костюкова, О.А. Безнос. Влились в коллектив хорошо подготовленные молодые медицинские лабораторные техники – О.А. Повалякина, Д.М. Новицкая, Д.В. Романова, Н.В. Ковалева. Особую роль в профессиональном становлении молодежи играет старшее элитное звено Российских ученых – профессор М.А. Френкель, в.н.с. Е.Н. Шолохова, высокопрофессиональные лаборанты-исследователи, медицинские технологи, фельдшеры-лаборанты, лаборанты, санитарки – В.В. Тимошенко, Т.Н. Азаровская, С.Ю. Тихонова, О.С. Двойникова, Л.П. Зеленская. За 10-летие подготовлено 26 кандидатов и 7 докторов наук, опубликовано множество статей, монографий, глав в руководствах, докладов на российских и международных конференциях. Но главное не только в этом – создан коллектив единомышленников, сплоченных единой целью победы над раком. И глубоко убежден, что результаты работы конференции послужат делу эрадикации рака, будут внедрены в клинические протоколы антитела SC-1 (рак желудка), PAT-SM6 (меланома) и другие.

Нашей плодотворной работе всемерно содействует заведующая отделом – профессор Заира Григорьевна Кадагидзе. От души поздравляем ее со славным юбилеем в этом году!

*Главный редактор журнала «Иммунология гемопоэза»
Заслуженный деятель науки России, профессор*

Н.Н. Тупицын

FROM THE EDITOR

Ten years (2003 to 2013) have fled by unnoticed. And the Haematopoiesis Immunology Laboratory is ten years of age. The 6th of June, 2003, is the date when Academician M.I. Davydov, Director of the Center, signed his order to set up the laboratory.

Every year since this date of June the 6th – the birthday of the great Russian poet A.S. Pushkin, we have been holding the Haematopoiesis Immunology conference. First it was intrainstitutional, then became Russia-wide and later it attracted international participants. And now the conference has gained a full right to be considered international (for instance, the 2013 program includes 10 reports by leading scientists from the USA, UK, Germany, France, Netherlands, Turkey, Australia and other countries). It was George Janossy (UK) who plaid a key role in determining the conference direction. In 2006 this prominent immunologist of the present drew attention to the problem of minimal residual disease in leukemia. This problem later evolved into minimal residual disease in cancer which, phrased as ‘eradication of minimal cancer’, is the main topic of the 2013 conference. This problem under intensive development worldwide is currently in focus in Russia too. Participants of our conference Professor Klaus Pantel (Germany) and Catherine Alix-Panabieres (France) are the main contributors to these developments. The great importance of this research is confirmed by appreciation of the French Academy of Sciences that in 2012 awarded Catherine Alix-Panabieres with the grand prix in oncology.

Since the laboratory first year we began to publish the *Haematopoiesis Immunology* journal, as proceedings before 2006, and since 2006 as a full-value journal in Russian and in English. This year the *Haematopoiesis Immunology* is 10. We have strengthened our staff with experienced hemocytologists such as N.B. Lebedeva and Z.D. Zharova who returned to the Center after leaving it earlier, and trained young morphologists and immunologists, L.Yu. Grivtsova, N.A. Kupryshkina, O.P. Kolbatskaya, S.V. Chulkova, A.V. Mozhenkova, Ya.A. Udalova, M.N. Kostyukova, O.A. Beznos. New, well-trained young medical laboratory technicians, such as O.A. Povalikhina, D.M. Novitskaya, D.V. Romanova, N.V. Kovaleva joined our laboratory. The senior contingent representing elite of the Russian science, Professor M.A. Frenkel, leading research scientist E.N. Sholokhova, skilled medical technologists, medical and laboratory assistants, attendants, T.N. Azarovskaya, L.Yu. Tikhonova, V.V. Timoshenko, O.S. Dvoynikova, L.P. Zelenskaya play a special role in the professional making of the young. Over the last decade 26 laboratory workers took their PhD degree and another 7 had their DSc degree, we published multiple reports, monographs, chapters of guidelines, prepared presentations at Russian and international conferences. However the main point is that we have created a team of like-minded specialists, solidary in their commitment to conquer cancer. I am deeply convinced that results of our conference will contribute to cancer eradication, antibodies SC-1 (gastric cancer), PAT-SM6 (melanoma) and others will be included into clinical protocols.

Professor Zaira Grigorievna Kadagidze, the Department Head, provides all possible assistance to our fruitful activities. We heartedly congratulate her with her glorious jubilee!

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген

аллоТГК – аллотрансплантация гематопозитических клеток

Ауто-, алло-ТКМ – аутологичная или аллогенная трансплантация клеток костного мозга или мобилизованных стволовых клеток периферической крови

БРВ – безрецидивная выживаемость

БСВ – бессобытийная выживаемость

ГСК – гематопозитическая стволовая клетка

β -ХЛЛ – В-клеточный хронический лимфолейкоз

ИГ – иммуноглобулин

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФТ – иммунофенотипирование

ЛАФ – лейкоз-ассоциированные фенотипы

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛСК – лейкозные стволовые клетки

МДС – миелодиспластические синдромы

МК – моноклональный компонент

МКА(Т) – моноклональные антитела

ММ – множественная миелома

МНК – мононуклеарные клетки

МОБ – минимальная остаточная болезнь

МСК – мезенхимальная стромальная клетка

МПО – миелопероксидазы

МПЦ – мультипараметрическая проточная цитометрия

МРБ – минимальная резидуальная болезнь

НХЛ – неходжкинская лимфома

НЭ – α -нафтил-ацетат-эстеразы

ОМЛ – острый миелолейкоз

РА – рефрактерная анемия

РБ – резидуальная болезнь

РМЖ – рак молочных желез

РЛ – разнице логарифмов

СКПК – стволовые клетки периферической крови

ТКР, Т-клеточный рецептор

кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция

КМ – костный мозг

РИФ – реакция иммунофлуоресценции

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПК – плазматические клетки

ПР – полная ремиссия

ПЦ – проточная цитометрия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ТПЛ – опухоле-пенетрирующие лимфоциты

ФА – фокальная адгезия

ФТС – фетальная телячья сыворотка

ЦМВ, цитомегаловирус

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЧР – частичная ремиссия

ABBREVIATIONS

Ag, antigen.
AML, acute myeloid leukemia
APC, allophycocyanin
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.
BC, breast cancer
BSA, bovine serum albumin.
BM, bone marrow
CD (cluster of differentiation) – кластер лейкоцитарных дифференцировочных антигенов
CMV, цитомегаловирус
CR, complete remission
CRP, C-reactive protein
Cy, cyanine
EDTA, ethyleneDiamineTetraAcetic Acid
EIA, enzyme immunoassay
ESR, erythrocyte sedimentation rate
ESFT, ewing's sarcoma family of tumors
FA, focal adhesion
FC(M), flow cytometry
FISH, fluorescent hybridization *in situ* (флюоресцентная гибридизация *in situ*)
FITC, fluorescein IsoThioCyanate
HMW-MAA, high molecular weight-melanoma-associated antigen
HSC, hematopoietic stem cell
IG, immunoglobulin
IFR, immunofluorescence reaction
IPP, изопентенил пирофосфат
IPT, immunophenotyping
LAPs, leukemia-associated phenotypes
LDH, lactate dehydrogenase
LSC – leukemic stem cells
MDS, myelodysplastic syndromes
MdFCS, Median Forward Scatter, медиана FSC
MdFI, median fluorescence intensity, медиана интенсивности флуоресценции
MC, monoclonal component
Mab, monoclonal antibodies.
MFC, multiparameter flow cytometry
MHC, major histocompatibility complex
MNC, mononuclear cells
MRD, minimal residual disease
MSCs, mesenchymal stromal cells
NK-клетки, натуральные киллеры
NHL, Non-Hodgkin's lymphomas
QPCR, quantitative polymerase chain reaction
PCR, polymerase chain reaction
PE, phyco-erythrin
RC, refractory cytopenia
RFS, relapse-free survival
PNAS (Proceedings of National Academy of Sciences of the USA)
RD, residual disease
PBS, phosphate buffered saline
PC, plasma cells
PerCP, peridin chlorophyl protein
SSC – боковое светорассеяние
TCR, T cell receptor
VCAM-1, vascular cell adhesion molecule (молекула адгезии сосудистых клеток)

Л. Кампос¹, К. Аанеи¹, П. Фландрин-Греста¹, Д. Гиотат²

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ОСТАТОЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ
ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ**

¹Лаборатория гематологии, Больничный центр Университета, Сент-Этьен, Франция

²Отделение гематологии, Институт онкологии им. Люсьена Неувира, Сен-Прьест-ан-Жаре, Франция

Резюме

Мониторинг МОБ имеет большое значение для стратификации больных по степени риска и раннего выявления рецидива при ОМЛ. Как показано в ряде исследований, оценка МОБ является мощным независимым фактором прогноза при ОМЛ; безрецидивная и общая выживаемость у больных без МОБ выше, чем в случаях выявления МОБ. С прогрессом в разработке лабораторных методов, таких как кПЦР и МПЦ, связана эволюция клинической применимости мониторинга МОБ. Последний метод позволяет одновременно оценивать пять и более характеристик и определять, таким образом, ЛАФ. МПЦ является высокочувствительным, количественным (позволяющим классификацию выше и ниже уровня 0,01% – порога стратификации, принятого в клинике), быстрым методом, который подходит более чем для 90% больных. Кроме того, методы МПЦ и кПЦР обладают высокой степенью комплементарности, что позволяет выявлять МОБ в 100% случаев. Этот метод также применяется для выявления низких уровней МОБ в аутооттрансплантатах, а также у больных в период после трансплантации. Также МПЦ способна выявлять ЛСК, которые составляют очень малую фракцию, обеспечивающую развитие лейкозных бластных клеток и рецидива заболевания. Уровень ЛСК в период последующего наблюдения может служить новым пост-диагностическим фактором прогноза.

Таким образом, МПЦ можно считать отличным инструментом для определения МОБ при ОМЛ.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь (МОБ), острый миелолейкоз (ОМЛ), лейкоз-ассоциированные фенотипы (ЛАФ), лейкозные стволовые клетки (ЛСК).

Введение

ОМЛ трудно поддается лечению у большого числа больных, несмотря на применение интенсивной химиотерапии, вследствие устойчивости к лечению и большой частоте рецидивирования. Как показали многочисленные исследования, персистенция МОБ в костном мозге у больных ОМЛ после химиотерапии, связана с риском рецидива лейкоза.

Lydia Campos¹, Carmen Aanei¹, Pascale Flandrin-Gresta¹, Denis Guyotat²

**DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE
IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA BY FLOW CYTOMETRY**

¹Laboratory of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne, 42055 Saint Etienne, France

²Department of Hematology, Institut de Cancerologie Lucien Neuwirth, 42271 Saint Priest en Jarez, France

Abstract

Monitoring of MRD is valuable for risk stratification and early detection of relapse in patients with AML. Several studies have demonstrated that MRD evaluation is a powerful and independent prognostic factor in AML; MRD-negative patients having a better disease-free survival and overall survival than MRD-positive patients. The clinical utility of monitoring MRD has evolved with the progress in techniques such as QPCR and MFC. The latter approach assesses five or more characteristics simultaneously allowing the detection of LAPs. MFC is sensitive, quantitative (allowing classification above or below the 0.01% level, the target used in clinical stratification), rapid and applicable in more than 90% of patients. Moreover, the MCF and the QPCR are highly complementary methods allowing the MRD detection in 100% of cases. This method is also useful for monitoring low level MRD in autologous graft products or in the post-transplant period. In addition, the MCF allows detection of LSC which constitute a very small population responsible for the propagation of leukemic blasts and relapse. The LSC quantification in follow-up time points offers a new post-diagnosis prognostic factor.

In summary, MFC is a perfect tool for the MRD evaluation in AML.

Keywords: minimal residual disease, acute myeloid leukemia, leukemia-associated phenotypes, leukemic stem cells

Introduction

The management of AML is a therapeutic challenge due to resistant or relapsing disease in a significant number of patients despite intensive chemotherapy. The persistence of MRD in the bone marrow (BM) of patients with AML following chemotherapy has been established by many studies to be strongly associated with relapse of leukemia.

МОБ представляет собой популяцию лейкозных клеток, неопределяемую морфологическими методами, и следовательно, для определения эффективности химиотерапии и МОБ необходимы более чувствительные методы, такие как КПЦР и МПЦ. Количественная ПЦР в реальном масштабе времени (rt-ПЦР) позволяет определять транскрипты слияния и реаранжировки генов антигенных рецепторов и обладает преимуществом высокой чувствительности (одна клетка-мишень на 10^{-4-6} клеток).

Однако не у всех больных лейкозом имеются специфические генетические мутации, необходимые для выявления МОБ. МПЦ позволяет оценить пять и более параметров одновременно, что обеспечивает выявление специфических аберрантных фенотипов лейкозных клеток и, следовательно, количественное определение МОБ в большинстве случаев.

Определение МОБ методом МПЦ

Определение МОБ методом МПЦ при ОМЛ представляет определенную трудность, обусловленную иммунофенотипической гетерогенностью популяции лейкозных клеток [1].

Клетки ОМЛ обычно распределены по многим областям точечного графика, а не образуют четкий кластер, как это происходит при остром лимфолейкозе (ОЛЛ), который обычно характеризуется гомогенностью.

По этой причине для иммунофенотипического определения МОБ при ОМЛ необходимо использовать более широкую панель антител, чем при ОЛЛ. Комбинация соответствующих маркеров позволяет определить аберрантную экспрессию маркеров или ЛАФ на злокачественных клетках при постановке диагноза [2–7].

Наша группа, как и многие другие, провела исследование ЛАФ при ОМЛ. Нами показано, что ЛАФ отсутствуют или присутствуют очень редко на нормальных бластах и клетках КМ, также мы определили следующие наиболее важные аберрации:

1. Асинхронная антигенная экспрессия (одновременная экспрессия ранних и поздних маркеров на одной и той же клетке, например, коэкспрессия антигенов CD34/HLA-DR/CD117/CD33/CD15);
2. Линейная «неверность» (экспрессия лимфоидных маркеров – CD2, CD3, CD5, CD7, CD10 и CD19 на миелоидных бластах);
3. Гиперэкспрессия антигена (аномально повышенная экспрессия определенного антигена на одну клетку);
4. Аберрантные свойства светорассеяния (экспрессия антигенов, ассоциируемых с лимфоидными клетками, на бластных клетках с относительно высоким передним и боковым светорассеянием, соответствующим нормальным миелоидным клеткам) [2, 6–9];
5. Отсутствие линейно-специфических антигенов (отсутствие экспрессии таких антигенов как CD13 и CD33 на миелоидных бластах).

MRD is a leukemic population undetectable by morphologic methods and therefore more sensitive techniques such as QPCR and MFC are useful to quantify the degree of both response to therapy and MRD. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) identifies fusion transcripts and antigen-receptor gene rearrangements and benefits of high detection sensitivity (one target cell per 10^4 – 10^6 cells).

However, not all leukemia patients have specific genetic mutations that are suitable for MRD detection. MFC assesses five or more parameters simultaneously allowing the specific detection of aberrant phenotypes of leukemic cells that can be applied for quantification of MRD in most cases.

Detection of MRD by MFC

Detection of MRD by MFC in AML presents some specific difficulties owing to immunophenotypic heterogeneity[1]. AML cells usually spread across many areas of the dot plot instead of forming a tight cluster when compared with ALL, which is usually homogeneous. For this reason, the immunophenotypic detection of MRD in AML requires a larger panel of antibodies than in ALL. The combination of these markers can define the aberrant marker expression, denoted as LAPs on malignant cells at diagnosis [2–7]. Therefore, our team as others has studied these LAPs in AML. We have shown that these LAPs are not present or only very infrequently present on normal blood or BM cells and the most relevant aberrations includes:

1. asynchronous antigen expression (simultaneous expression of early and late markers in single cell, such as coexpression of the CD34/ HLA-DR/ CD117/ CD33 / CD15 antigens);
2. lineage infidelity (expression of the lymphoid-associated markers, i.e., CD2, CD3, CD5, CD7, CD10, and CD19 on myeloid blast cells);
3. antigen overexpression (abnormally increased expression of a certain antigens per cell);
4. aberrant light-scatter properties (the expression of lymphoid-associated antigens in blast cells displaying a relatively high forward scatter and side scatter, corresponding to normal myeloid cells)[2;6–9];
5. absence of lineage-specific antigens (absence of antigen expression such as CD13 and CD33 on myeloid blasts).

Современные иммунологические стратегии определения МОБ основаны на выявлении комбинаций лейкоцитарных маркеров, которые отсутствуют в нормальных периферической крови и КМ [8]. Эти ЛАФ можно определить, используя окрашивание 6 и более цветами при помощи антител, конъюгированных с различными флюорохромами.

Аберрации при постановке диагноза:

Определены следующие характерные иммунофенотипы, связанные с присутствием повторяющихся генетических аномалий, при ОМЛ:

1. ОМЛ с t(8;21) характеризуется сильной экспрессией CD34, HLA-DR, MPO и CD13, а также наличием аберрантной экспрессии лимфоидных маркеров CD19, cCD79a и CD56.
2. ОМЛ inv (16) и t(16;16) характеризуется высоким уровнем экспрессии CD34 и CD117 на незрелых бластах параллельно с асинхронным созреванием гранулоцитов и моноцитов.
3. ОМЛ с t(15;17) с очень низкой экспрессией или отсутствием экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR.
4. ОМЛ с мутацией NPM1 является CD34⁺ и демонстрирует сильную экспрессию CD33.
5. ОМЛ с мутацией CEBRA является CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺ HLA-DR⁺, CD14⁺, CD15⁺, CD7⁺.

Прогностическое значение МОБ при ОМЛ

Опубликовано несколько сообщений, доказывающих, что определение МОБ при ОМЛ является ценным инструментом прогноза рецидива заболевания [9–14].

В работе San Miguel et al. [9] изучается прогностическая роль определения МОБ у 53 больных ОМЛ с ЛАФ при постановке диагноза. В результате проведения стандартной терапии по поводу ОМЛ у больных была зарегистрирована полная морфологическая ремиссия (ПР), уровни МОБ определяли после окончания индукционной и интенсифицирующей терапии. Авторы показали, что уровень МОБ в конце указанного периода был непосредственно связан с БРВ. Показано, что в подгруппе больных с уровнем МОБ 0,5% и более после индукционной терапии процент рецидивов (67%) был выше, чем у больных с уровнем остаточных клеток менее 0,5% (20%), также в группе с уровнем МОБ 0,5% и более была ниже БРВ.

В конце интенсификации пороговый уровень остаточных лейкозных клеток 0,2% позволил разделить больных на две категории с показателями рецидивирования 69% и 32% соответственно; БРВ была ниже у больных с уровнем остаточных лейкозных клеток 0,2% и более. Уровни МОБ 0,5% клеток и более после индукции и 0,2% после интенсификации также коррелировали с более короткой ОВ.

Current immunologic strategies for detecting MRD rely on combinations of leukocyte markers normally not seen in peripheral blood and BM [8]. These LAPs can be identified by 6 or more-color staining techniques performed with antibodies conjugated to different fluorochromes.

Aberrancies at diagnosis:

Characteristic immunophenotypes have been associated with the presence of recurrent genetic abnormalities in AML:

1. AML with t(8;21) shows strong expression of CD34, HLA-DR, MPO and CD13 and the presence of aberrant expression of lymphoid markers CD19, cCD79a and CD56.
2. AML inv (16) or t(16;16) presents a high level of expression for CD34 and CD117 on immature blasts, along with granulocytic and monocytic maturation asynchrony.
3. APL with t(15;17) displays very low expression or absence of expression for CD34 and HLA-DR antigens.
4. AML with mutated NPM1 is CD34⁻ and has strong expression of CD33.

AML with mutated CEBPA is CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD15⁺, CD7⁺

Prognostic impact of MRD in AML

Several reports have been published providing evidence that study of MRD in AML is a valuable tool for predicting relapse.[9–14]

San Miguel et al [9] have studied the prognostic role of MRD detection in 53 AML patients with LAPs at diagnosis. The patients had achieved morphologic CR after standard AML therapy, and the levels of MRD were studied after completion of induction and intensification therapy. The authors showed that the level of MRD at the end of this period was directly correlated with relapse and RFS. They found that patients showing a MRD level of 0.5% or more after induction therapy had a higher rate of relapse (67%) compared with patients with less than 0.5% residual cells (20%) and a shorter RFS.

At the end of intensification, the cut-off value of 0.2% residual leukemic cells allowed to separate patients into 2 categories with relapse rates of 69% and 32%, respectively; the patients presenting 0.2% or more residual leukemic cells having lower RFS. An incidence of 0.5% MRD cells or more after induction and 0.2% after intensification was also correlated with a shorter duration of OS.

Venditti et al. [11] провели исследование у 56 больных ОМЛ и показали, что уровень МОБ после консолидационной терапии является наилучшим фактором прогноза исхода. Уровень МОБ 0,035% после консолидации статистически значимо коррелировал с высоким процентом рецидивов (77 и 17%). Этот уровень МОБ также наблюдался у больных из групп промежуточного и высокого цитогенетического риска с коротким периодом БРВ и ОВ. Авторы показали также, что аутотрансплантация стволовых клеток не изменяет неблагоприятный прогноз, обусловленный высокими уровнями МОБ после консолидации. Частота рецидивирования после трансплантации составила 70% по сравнению с 28% у больных с отрицательным результатом определения МОБ в конце консолидации.

В исследовании Al Mawali [15] применяли 5-цветную МПЦ для определения МОБ у 54 больных ОМЛ, из которых у 25 зарегистрирована морфологическая ПР после индукционной химиотерапии и у 22 после консолидации. Порог, позволяющий разделить больных на МОБ⁻ и МОБ⁺ группы, составил по оценке авторов 0,15% остаточных лейкозных клеток, и этот уровень является оптимальным для разделения больных ОМЛ по категориям риска. Кроме того, определение МОБ после индукции позволяло более точно прогнозировать исход по сравнению с определением после консолидации, также уровень МОБ после индукции влиял как на БРВ, так и на ОВ.

Несмотря на то, что выводы авторов этих работ совпадают, результаты исследований Venditti et al. [11] и Al Mawali [15] все же различаются. Так, Al Mawali [15], как и San Miguel et al. [10], показал корреляцию между рецидивированием и уровнем МОБ после индукции; тогда как Venditti et al. [11] установили, что важным фактором прогноза является уровень МОБ после консолидации, а не после индукции. Это различие может быть обусловлено применением разных режимов химиотерапии в этих двух исследованиях.

В более поздней работе San Miguel et al. [10] подтверждена значимость определения уровня МОБ после индукционной терапии. Авторы установили, что ранний ответ на химиотерапию по данным иммунофенотипирования первого образца КМ у больных с морфологической ПР после индукции позволяет определить группу больных низкой степени риска рецидива. Это исследование проводили у 126 больных ОМЛ с aberrантными фенотипами при постановке диагноза. На основании уровней МОБ после индукционной терапии было выделено 4 группы больных:

1. Очень низкий риск рецидива (10^{-4} клеток),
2. Низкий риск рецидива (10^{-4-3} клеток),
3. Промежуточный риск рецидива (10^{-3-2} клеток)
4. Высокий риск рецидива ($> 10^{-2}$ клеток).

Авторы сделали вывод, что определение МОБ после первого цикла химиотерапии при морфологической ПР является важным инструментом стратификации больных ОМЛ по группам риска.

Venditti et al, [11] in a study comprising 56 patients with AML finds that the level of MRD after consolidation therapy was the best predictor of outcome. The MRD level of 0.035% after consolidation therapy was significantly correlated with a high relapse rate (77% vs 17%). This MRD level was also coincident with intermediate or poor-risk cytogenetics and short duration of RFS and OS. Moreover, the authors show that autologous stem cell transplantation not changes the negative prognostic of high MRD levels after consolidation. Indeed, the relapse rate after transplantation was 70% vs 28% in patients with a negative result at the end of consolidation.

Al-Mawali,[15] using 5-color MFC studied MRD in 54 AML patients; 25 reaching morphologic CR after induction therapy and 22 after consolidation chemotherapy. The threshold discriminating MRD-negative from MRD-positive cases was set at 0.15% residual leukemic cells and this would be the optimal value for discriminating risk categories in AML. In addition, postinduction MRD assessment has able to better predict disease outcome than consolidation and the level of post-induction MRD influences both RFS and overall survival (OS).

Although the concluding message is the same, the findings of Venditti et al[11] and of Al- Mawali study[15] are discrepant. In fact, Al-Mawali as San Miguel et al[10] have shown a correlation between relapse with the level of MRD after induction; in contrast, Venditti et al[11] found that the level of MRD after consolidation, but not after induction, was the important as prognostic factor. The different therapeutic regimens used in the 2 studies may explain this variance.

San Miguel et al,[10] in a further report, confirmed the importance of the level of MRD after induction therapy. The authors found that early response to chemotherapy, as determined by immunophenotyping in the first BM sample in the morphologic CR cases after induction therapy, might identify patients at low risk of relapse. This study included 126 patients with AML who had aberrant phenotypes at diagnosis. Based on the level of MRD after induction therapy, 4 categories of risk were identified:

1. very low risk ($< 10^{-4}$ cells),
2. low risk (10^{-4} to 10^{-3} cells),
3. intermediate risk (10^{-3} to 10^{-2} cells),
4. high risk ($> 10^{-2}$ cells).

The conclusion of this study was that MRD detection after first cycle of chemotherapy under morphologic CR is an important tool for risk stratification in patients with AML.

В исследовании Al Malawi [15], несмотря на небольшое число больных, удалось показать, что значения МОБ выше 0,15% после индукционной химиотерапии могут быть независимым фактором неблагоприятного прогноза. Наши исследования подтверждают значение определения МОБ как прогностического индикатора в клинической практике.

Kem et al. [10] анализировали уровни МОБ в группе неотобранных больных ОМЛ с ПР после индукционной (58 больных) и консолидационной (62 больных) терапии. Авторы установили, что степень снижения числа ЛАФ⁺, которую определяли по РЛ между постановкой диагноза и ПР, статистически значимо коррелировала с безрецидивной выживаемостью как после индукционной, так и после консолидационной терапии. Значение РЛ после консолидационной терапии являлось единственным показателем, связанным с ОВ.

Rubnitz et al. [17] определяли МОБ у 232 детей, страдающих ОМЛ. Уровень МОБ 1% и более при первой ремиссии после индукционной терапии оказался единственным независимым негативным фактором прогноза как в отношении бессобытийной (отношение рисков 2,41), так и общей (отношение рисков 2,11) выживаемости.

В работе Feller et al. [18] проведено определение остаточных лейкозных клеток в КМ 72 больных ОМЛ после 3 разных циклов химиотерапии и в продуктах СКПК. Процент МОБ в КМ после первого (n = 51), второго (n = 52) и третьего (n = 30) циклов, а также в продуктах СКПК, сильно коррелировал с БРВ. Медиана порогового значения составила 1% клеток МОБ после первого цикла, 0,14% после второго, 0,11% после третьего цикла и 0,13% для продуктов СКПК. Также авторы установили, что высокой прогностической значимостью для определения клинического исхода обладает абсолютное число клеток МОБ на миллилитр. После окончания лечения повышение процентного содержания МОБ может являться признаком развития рецидива в том случае, если определение МОБ проведено в пределах 3 мес. и менее. Таким образом, Feller et al. [22] сделали вывод, что оценка МОБ на разных этапах заболевания является надежным фактором прогноза риска рецидива и выживаемости даже после окончания химиотерапии, кроме того, последовательное определение процента МОБ можно использовать для прогноза вероятности рецидива.

Walter et al. [19] провели исследование у 99 больных ОМЛ после достижения морфологической ремиссии в результате миелоаблативной аллоТГК. До аллоТГК 88 больных отвечали морфологическим критериям ПР и 11 достигли ПР с неполным восстановлением клеточного уровня крови (ПРн), из числа этих больных у 24 также было зафиксировано отсутствие МОБ по данным МПЦ. В результате обследований в течение 2 лет установлено, что ОВ у МОБ⁻ больных была выше, чем у МОБ⁺ (30,2 и 76,6% соответственно), оценки риска в этих двух группах составили соответственно 64,9 и 17,6%. В заключение указано, что наличие МОБ перед ТГК ассоциируется с повышением риска рецидива и смертью больного после миелоаблативной ТГК у больных ОМЛ с первичной морфологической ПР даже после учета остальных факторов риска.

The Al-Malawi study, [15] despite the smaller cohort of patients, shows that MRD values upper of 0.15% could be an independent predictor of poor prognosis after induction chemotherapy. Our studies support the relevance of MRD detection as a prognostic indicator in clinical practice.

Kern et al [10] analyzed the MRD levels in unselected patients with AML who have achieved the complete remission after induction (58 patients) and consolidation (62 patients) therapies. They note that the degree of reduction in LAP-positive cells, evaluated as log difference (LD) between diagnosis and CR was significantly correlates with the relapse-free survival, both after induction and consolidation therapies. The value of LD after consolidation therapy was the single parameter related to OS.

Rubnitz et al [17] performed a MRD evaluation in 232 children with AML. A level of 1% or more of MRD after first induction cure was the sole independent adverse prognostic factor for both event-free (hazard ratio 2.41) and overall survival (hazard ration 2.11).

Feller et al [18] evaluated the residual leukemic cells in BM of 72 AML patients after 3 different cycles of chemotherapy and from autologous peripheral blood stem cell (PBSC) products. The percentage of MRD in BM after the first cycle ($n = 51$), second cycle ($n = 52$), and third cycle ($n = 30$) and in PBSC products ($n = 39$) strongly has correlated with RFS. The median cutoff level was set to 1% MRD cells after the first cycle, 0.14% after the second cycle, 0.11% after the third cycle, and 0.13% for PBSC products. In addition, the authors show that the absolute number per milliliter of MRD cells was highly predictive of the clinical outcome. Once the treatment has been completed, an increase of the percentage of MRD cells could predict impending relapse, if the MRD assessment intervals is performed of 3 months or less. Thus, Feller et al [22] concluded that MRD assessment at different stages of disease is highly reliable in predicting relapse risk and survival even after the completion of chemotherapy, and sequential evaluation of MRD frequencies can be used to predict relapse.

Walter et al [19] studied 99 AML patients who have achieved the morphologic remission after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). Before HCT, 88 patients have met morphologic criteria for CR and 11 had CR with incomplete blood count recovery (CRi), and among them, 24 have also absence of MRD in MFC. An evaluation during two-years estimates an OS superior in MRD-negative patients compared to those MRD-positive (30.2% versus 76.6%), and a rank of relapse at 64.9% versus 17.6% when compare these two groups. In conclusion, pre-HCT MRD is associated with increased risk of relapse and decease after myeloablative HCT in AML with initial morphologic CR, even after controlling for other risk factors.

Diaz Campelo et al. [20] проводили определение МОБ у 41 больного ОМЛ и миелодисплазией на сутки +100 после трансплантации. Пороговое значение 10^{-3} позволило разделить больных на две группы с разными значениями безрецидивной (74 и 17%) и общей (73 и 25%) выживаемости через 4 года.

И, наконец, Hwang et al. [21] провели анализ пропорций $CD34^+CD38^-$ ЛСК у 63 больных ОМЛ. Авторы установили, что относительное число ЛСК было статистически значимо ниже в группе с ПР, чем в группе без ПР. Определение пропорции остаточных ЛСК позволяет прогнозировать исход при ОМЛ.

Эти исследования показали, что определение ОМЛ методом МПЦ обладает прогностической значимостью и может оказывать существенное влияние на клиническое ведение больных ОМЛ. Помимо всего прочего, основной задачей для исследователей МОБ является упрощение методов изысканий и повышение их надежности, что еще более умножит потенциальные преимущества мониторинга МОБ у всех больных.

Технические требования для определения МОБ

1. Маркер должен присутствовать на всех злокачественных клетках или на большинстве из них; он должен отличаться стабильностью и индивидуальностью или уникальностью.
2. Метод должен обладать специфичностью (способностью выделять остаточные злокачественные клетки среди нормальной популяции клеток), чувствительностью, воспроизводимостью результатов, являться количественным и стандартизованным.

Преимущества МПЦ

Метод может применяться в большинстве случаев (более 90%), является относительно простым, позволяет легко проводить количественное определение, анализ единичных клеток и оценку жизнеспособности клеток; является информативным относительно нормальных клеток и более дешевым по сравнению с молекулярно-биологическими методами.

Недостатки определения МОБ методом МПЦ

Как фенотипы ОМЛ, ЛАФ являются крайне гетерогенными и могут формировать лишь небольшие клоны. Между временем постановкой диагноза и дебютом рецидива возможны иммунофенотипические сдвиги, и по этой причине метод является менее специфичным, чем ПЦР. Предел определения составляет 10^{-4} .

Потенциальные ограничения МПЦ обусловлены большим разнообразием реагентов и методик подготовки образцов, регистрации и анализа данных. Поэтому большинство исследований МОБ при ОМЛ проводилось в одном центре. В связи с этим крайне важно выработать **стандарты** интерпретации данных. Также необходимо определить потенциальный источник ошибок, которые могут возникать в преаналитической и аналитической фазах оценки МОБ.

Diaz Campelo et al [20] studied MRD in 41 AML or myelodysplasia patients in day 100 posttransplant. The cutoff level of 10^{-3} allowed splitting the patients into two groups with different relapse-free survival (74% versus 17%) and overall survival (73% versus 25%) at 4 years.

Finally, Hwang et al [21] analyzed the proportions of $CD34^+CD38^-$ LSCs in 63 patients with AML and they found that the proportions of LSCs were significantly lower in the CR group compared with non-CR group. The measurement of the proportion of residual LSCs could predict the prognosis of AML.

These studies showed that the evaluation of MRD by MFC has prognostic significance and may have an important impact in the clinical management of patients with AML. Above all, the main challenge for the MRD investigators is to simplify methods and yet to maintain or better to increase their reliability, thereby multiplying the potential benefits of MRD monitoring to all patients.

Technical requirements for detection of MRD

1. The marker must be present in all or the majority of malignant cells; it has to be stable and individual or unique.
2. The technique has to be specific (ability to distinguish residual malignant cells among a normal population of cells), sensitive, repetitious, quantitative, standardize.

Advantages of MFC:

The method is applicable in the majority of cases (> 90%), is relatively easy and the quantification is easy, allows a single cell analysis and evaluation of the cell viability, it is informative regarding normal cells, and less expensive than molecular biology.

Disadvantages for MRD detection by MFC

As AML phenotypes, the LAPs are very heterogeneous and could concern only the small clones. Immunophenotypic shifts can occur between diagnosis and relapse, for this reason this method is less specific as PCR. Limit of detection is 10^{-4} .

Potential limitations of MFC derived from the higher diversity of reagents and methods used for sample preparation, data acquisition and analysis. Thereafter, the most MRD studies in AML are monocentric. For this reason is imperious necessary to standardize criteria of data interpretation. And also to manage the potential source of errors that may occur in preanalytical and analytical phase of MRD evaluation.

Собственный опыт

Мы определили [7] ряд комбинаций антигенов, которые полностью отсутствуют или присутствуют в очень малых концентрациях в нормальном костном мозге, затем исследовали их экспрессию в аспиратах КМ у больных ОМЛ. В данном исследовании проводили сравнительный анализ 6- и 4-цветной проточной цитометрии; показано, что 6-цветная комбинация позволяет определять больше aberrантных фенотипов, которые можно использовать для оценки МОБ. Во второй части исследования мы проверили выявленные ЛАФ на новой группе больных ОМЛ при постановке диагноза и у больных с ПР после химиотерапии.

Материалы и методы

Все образцы отбирали в гепарин-литиевые пробирки, исследование проводили на цельных образцах после лизиса эритроцитов и прямого окрашивания конъюгированными МКАТ.

В качестве контроля в исследовании использовали 10 образцов нормального КМ от здоровых доноров и больных, получивших лечение по поводу НХЛ или ЛХ, после цитологического исключения всех возможных патологий и 20 образцов КМ больных после химиотерапии миелоидных лейкозов.

В группу больных включали в первой серии 53 случая ОМЛ при постановке диагноза и во второй серии 60 случаев ОМЛ при постановке диагноза и при морфологической ПР. Аналогично, с использованием 6-цветных комбинаций антигенов исследовали 10 образцов продуктов СКПК перед пересадкой.

Для анализа методом МПЦ во всех случаях отбирали по 200–500 000 клеток из каждой пробирки после подавления неспецифического окрашивания человеческой сывороткой крови IV (AB) группы и ФТС.

Использованные МКАТ и их комбинации представлены в табл. 1. Антитела отбирались таким образом, чтобы максимизировать возможность идентификации антигенных aberrаций в пределах популяции миелоидных бластов, как описано в литературе [10; 22].

Кроме этого, в последней серии больных проведена проверка некоторых маркеров для оценки ЛАФ (CD123 FITC/ CD90 PE/ CD34 PerCP-Cy5.5/ CD117 PE-Cy7/ CD133 APC/ CD38 APC-H7/ HLA-DR PB/ CD45 V500).

Учет событий осуществляли при помощи прибора FACS Canto II (Becton Dickinson), данные анализировали с использованием программы FACSDiva (Becton Dickinson).

Стратегия гейтирования

Гейтирование популяций бластных клеток и их отделение от других популяций КМ проводили на основе экспрессии CD45 в комбинации со свойствами SSC. Популяцию бластов идентифицировали по низкой экспрессии CD45 и свойствам SSC.

Our experience

We have defined [7] several antigen combinations that are totally absent or present at very low levels in normal bone marrow (BM) and thereafter we have studied their expression on AML BM aspirates. In this study we have compared 6 and 4-color flow cytometry and we have shown that 6-color combination identified more aberrant phenotypes which could be utilized for MRD study. In a second time we have tested these LAPs in a new series of AML patients at diagnosis and at morphologic CR after chemotherapy.

Material and methods

All specimens were collected into heparin–lithium tubes and the study was performed on erythrocyte-lysed whole samples after staining with directly conjugated monoclonal antibodies (moAbs).

The study has included as controls 10 normal BM from healthy donors and from treated patients with non-Hodgkin's or Hodgkin's lymphoma after cytological exclusion of all possible pathologies and 20 regenerating BM samples after myeloid postchemotherapy.

The patients group included in the first series 53 cases of AML at diagnosis and in second one 60 AML cases at diagnosis and in morphological CR. Likewise, 10 PBSC products were studied with the 6-color antigen combinations before the graft.

For FCM analysis, among 200 000 – 500 000 cells were acquired in all cases from each tube after the inhibition of unspecific staining with human serum blood type AB and fetal calf serum (FCS).

The moAb used and their combination are described in Table1. The antibodies were chosen to maximize our ability to identify antigenic aberrations within the myeloid blasts population as the literature data describes[10; 22].

In addition, in the last series of patients we have tested some markers for LSC evaluation (CD123 FITC/ CD90 PE/ CD34 PerCP-Cy5.5/ CD117 PE-Cy7/ CD133 APC/ CD38 APC-H7/ HLA-DR PB/ CD45 V500).

The events acquisition was performed with a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson) and data analysis using FACSDiva Software (Becton Dickinson).

Gating strategy

The intensity of CD45 expression in combination with side scatter (SSC) properties was used to gate the blast cell population and to separate it from the other BM populations. The blast population was then identified by a low expression of CD45 and SSC properties [16].

Интенсивность экспрессии исследуемых антигенов выражали в виде соотношения MFI (MFI антитела/ MFI изотипического контроля), в качестве порога положительного результата установили значение 20%. Затем реализовали все возможные комбинации выявленных гейтов: для 6-цветной панели это составило для каждой пробирки 32 возможных комбинации (всего 192 комбинации поверхностных антигенов), а для 4-цветной панели всего 8 комбинаций (общее число 112 комбинаций).

В образцах больных ОМЛ определяли относительное содержание клеток с фенотипом, выявляемым каждой комбинацией, и сравнивали их с аналогичными значениями в нормальном КМ.

Сравнение средних относительных значений положительных клеток проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Иммунофенотип образцов нормального костного МОБ

Медиана содержания популяции бластов на точечном графике CD45/SSC в образцах нормального КМ при 6-цветном окрашивании составила 4,25% (диапазон 3,8–5,3%). Медиана относительного содержания СВ34⁺ клеток составила 0,88% (от 0,3 до 1,5%). Различий в этих значениях при окрашивании в 4 и 6 цветов не выявлено.

Из 192 комбинаций, возможных при 6-цветном иммуноокрашивании, 47 фенотипов полностью отсутствовали в бластном гейте во всех образцах нормального КМ, другие фенотипы [41] присутствовали с частотой менее 0,05% общего числа клеток [7]. Остальные 104 комбинации присутствовали с частотами от 0,05 до 3,58% общего числа клеток.

Иммунофенотип ОМЛ при постановке диагноза в первой серии

Фенотип определяли как лейкоз-ассоциированный, если он экспрессировался не менее чем на 1% клеток общей популяции. Пятьдесят один фенотип из 88 (58%), которые считают отсутствующими или встречающимися редко в нормальном КМ (менее 0,05% от общего числа клеток), определялся хотя бы на одном образце ОМЛ при средней частоте 8,7% от общего числа клеток. Все случаи ОМЛ представляли хотя бы один ЛАФ, однако часто в одном и том же образце присутствовало несколько ЛАФ (данные не показаны).

Чаще всего при ОМЛ определялись следующие ЛАФ:

CD34⁺CD33⁺CD13⁺CD19⁻CD7⁺;
CD34⁺CD65⁺CD56⁻CD4⁻CD16⁻;
CD34⁺CD65⁻CD56⁺CD4⁻CD16⁻;
CD34⁺CD38⁺CD33⁺CD56⁺CD19⁻;
CD34⁺HLA⁻DR⁻CD117⁺CD33⁺CD15⁻;
CD34⁺HLA⁻DR⁻CD117⁺CD33⁻CD15⁻.

The intensity of the antigens of interest was expressed as MFI ratio (antibody MFI/isotypic control MFI) and the cut-off of positivity was set at 20%. Next, all logical combinations of these gates were realized: for six-color moAb panel, there were 32 combinations possible on each tube (so a total of 192 combinations of surface antigens) and for four-color panel, only eight combinations (a total of 112 combinations).

The frequencies of cells carrying the phenotype targeted by each combination were determined in AML samples compared to the normal BM.

The mean percentages of positive cells in each phenotype were compared by the Student's *t* test.

Results

Immunophenotype of Normal Bone Marrow Samples

The median percentage of blast population defined on CD45/SSC dot plot within the normal BM samples analyzed with six-color staining was 4.25% (range 3.8%–5.3%). The median percentage of CD34⁺ cells was 0.88% (range 0.3%–1.5%). No difference was found between these percentages in four-color or six-color staining.

From the 192 combinations possible with six-color immunostaining, 47 phenotypes were totally absent from blast gate in all normal BM and another 41 phenotypes were present at a frequency < 0.05% of total cells[7]. The rest of 104 combinations were present at a frequency ranging between 0.05% and 3.58% of total cells.

Immunophenotype of AML at diagnosis in the first series

We considered a phenotype as leukemia associated when it was expressed on at least 1% of the total population. Fifty-one of eighty-eight (58%) of the phenotypes described as absent or infrequent in normal BM (< 0.05% of total cells) were found in at least one AML, at a mean percentage of 8.7% of total cells. All AML cases displayed at least one LAP, but frequently several LAPs were observed in the same sample (data not shown).

The most frequent LAPs found in AML are:

CD34+CD33+CD13+CD19–CD7+,
CD34+CD65+CD56–CD4–CD16–,
CD34+CD65–CD56+CD4–CD16–,
CD34+CD38+CD33+CD56+CD19–,
CD34–HLA-DR–CD117+CD33+CD15–,
CD34+HLA-DR–CD117+CD33–CD15–.

Иммунофенотипирование ОМЛ при постановке диагноза и морфологической ПР во второй серии

Из числа всех комбинаций антигенов идентифицировано 6 фенотипов, присутствовавших во всех 60 случаях ОМЛ при постановке диагноза. Эти фенотипы также присутствовали в случаях ОМЛ с морфологической ПР и последующим рецидивом [12]. На эти 6 фенотипов были проанализированы 10 аутологичных СКПК, оказалось, что в 3 случаях СКПК пациентов, у которых болезнь рецидивировала, экспрессировали более одного из этих фенотипов.

И, наконец, были охарактеризованы более примитивные субпопуляции этих ОМЛ: установлено, что большинство ОМЛ были $CD34^+CD38^+CD133^+$, а $CD34^-$ случаи ОМЛ можно было определить среди незрелых клеток с экспрессией $CD133$. Популяция незрелых клеток содержала несколько субпопуляций в зависимости от экспрессии $CD90$; $CD120$. Сравнительный анализ между группами больных с ПР и без таковой показал, что число примитивных ЛСК является более важным показателем, чем отсутствие ПР.

Обсуждение

В нашем первом исследовании КМ в норме и после химиотерапии с использованием 6-цветного окрашивания были определены новые ЛАФ, присутствующие при постановке диагноза ОМЛ, которые можно также применять для выявления МОБ.

Это окрашивание позволило идентифицировать больше комбинаций аберрантных фенотипов, чем 4-цветное, при использовании того же числа поверхностных антигенов и меньшего числа пробирок. Во всех случаях ОМЛ определялась хотя бы одна субпопуляция клеток, имеющих антигенный профиль, полностью отсутствующий или встречающийся крайне редко в нормальном КМ (рис. 1; см. вклейку).

Во второй серии среди всех 6-цветных антигенных комбинаций мы определили 6 фенотипов (показаны выше), которые представляют особую важность для мониторинга МОБ при ОМЛ и могут использоваться для прогноза риска рецидива.

Кроме того, они могут применяться для оценки аутологичных продуктов СКПК (рис. 2).

Наши результаты согласуются с большим количеством данных литературы, свидетельствующих о большом интересе к применению МПЦ для выявления МОБ. Однако, для того чтобы внедрить этот метод в стандартную клиническую практику и использовать его для выбора метода лечения, предстоит решить ряд вопросов, таких как

1. специфичность;
2. стандартизация;
3. фенотипический сдвиг;
4. характеристика лейкозных стволовых клеток.

***Immunophenotyping of AML
at diagnosis and morphological CR in the second series***

We have identified between all antigen combinations, 6 phenotypes which were present in all 60 AML at diagnosis. These phenotypes were also found in morphologic CR marrows of AML that relapse (12). Ten autologous PBSC were analyzed with these 6 phenotypes and found that the 3 PBSC from patients who relapsed expressed more than one of these phenotypes.

Finally, we have characterized the more primitive compartment in these AML: we found that the majority of AML were $CD34^+CD38^-CD133^+$, and that the $CD34^-$ AML cases could be determined within the immature compartment with CD133 expression. The immature compartment has several subpopulations depending on the expression of CD90, CD123. We compared the CR and non-CR group and found that the number of primitive LSCs were more important in the non-CR group.

Discussion

Our first study of normal and postchemotherapy BMs using a 6-color staining allowed us to define new LAPs present at diagnosis of AML and useful for the detection of MRD.

With the same number of surface antigens studied and a more limited number of tubes we identified more unusual phenotype combinations utilizing 6-color rather than four-color combinations. We described in all AML cases at least one subpopulation of cells carrying an antigen profile absent or extremely infrequent in normal BM (Fig. 1).

In the second series, we found that among all the 6-color antigen combinations, 6 phenotypes (as listed above) are specially valuable to follow-up MRD in AML patients and useful to predict relapse.

They are also useful for the evaluation of autologous PBSC products (Fig. 2).

Our studies are in line with a large number of published data demonstrating the interest of MFC for detection of MRD. However, some issues remain to be solved before this technique can be used routinely to monitor patients and eventually help to choose the best treatment:

1. specificity
2. standardization;
3. phenotype shift;
4. leukemic stem cells characterisation.

1. **Специфичность.** Первые публикации по проблеме МОБ свидетельствовали о низкой частоте aberrантных фенотипов, что сильно затрудняло дифференциацию остаточных лейкозных и нормальных незрелых клеток. Эта проблема, по-видимому, возникла в связи с применением 3–4-цветных панелей моАТ. Увеличение числа флуорохромов приводит к повышению специфичности. Применение 6-цветной МПЦ позволяет с большей уверенностью идентифицировать aberrантные фенотипы. В настоящее время для выявления МОБ используют подходы с 8 и более цветами. Таким образом, по мере идентификации новых aberrантных фенотипов потребуются мониторинг более мелких субпопуляций.
2. **Стандартизация.** Общим недостатком является отсутствие стандартизированных критериев для интерпретации данных, что становится причиной большой вариабельности данных публикаций. Большинство исследований МОБ при ОМЛ проведено в одном центре. Для преодоления этого недостатка Европейский консорциум предложил принять методику, которая позволяла бы ставить диагноз на более объективных основаниях. В рамках программы Консорциума был разработан протокол диагностики злокачественных заболеваний крови на основе 8-цветного окрашивания при проведении многоцентровых исследований. Новые компьютерные программы, например, *Infinicyt*, позволяют проводить сравнение и интерпретацию конкретных случаев на основе большого числа нормальных профилей КМ [23].
3. **Фенотипический сдвиг.** ЛАФ могут претерпевать фенотипические сдвиги. При развитии заболевания экспрессия маркеров ОМЛ в большинстве случаев (до 80%) может изменяться. Особенно часто происходит снижение экспрессии маркеров [24; 25]. Обусловлен ли этот феномен истинным изменением фенотипов или ростом при рецидиве более мелких субклонов, уже присутствовавших при постановке диагноза, еще предстоит установить. В связи с этим очень важно использовать широкие панели антител при постановке диагноза с тем, чтобы выявлять максимальное число ЛАФ.
4. И, наконец, ЛСК представляют небольшую субпопуляцию **лейкозных бластов**, которая поддерживает лейкозную популяцию благодаря своей способности пролиферировать бесконечно [26]. ЛСК определяются как линейно-негативная, $CD34+CD38^-$ популяция лейкозных бластов. В нашем исследовании проанализирована экспрессия $CD34^+CD38^-CD133^+$ и $CD34^-CD38^-CD133^+$. Маркеры CD34 и CD133 позволяют идентифицировать примитивный компонент во всех случаях ОМЛ. Мы также определяли экспрессию CD90, CD123 на ЛСК и установили вариабельность экспрессии этих маркеров. Таким образом, популяция ЛСК характеризуется гетерогенностью, и необходимо определить несколько субпопуляций.

1. **Specificity:** the first published studies in MRD showed a lower incidence of aberrant phenotypes making it difficult to specifically identify residual leukemic cells from normal immature cells. This issue seems to be due to the limitations related to the use of three-four color panels of moAbs. Increasing the number of fluorochromes improves specificity. We have found a better identification of aberrant phenotypes using 6-color MFC. At present, 8 or more-color approaches are being used to detect MRD. Thus, as more aberrant phenotypes are identified, it becomes necessary to follow-up minor subpopulations.
2. **Standardization:** a lack of standardized criteria for data interpretation is a common finding that introduces variability in the published reports. Most MRD studies in AML are monocentric. In order to overcome this, a European consortium has set out to implement an approach that allows diagnostics to be performed in a more objective way. In their program an 8-color protocol for the diagnosis of hematological malignancies in a multicenter fashion has been developed. New softwares as Infinicyt allow the comparison and interpretation of specific diagnosis cases against a background of many normal BM patterns [23].
3. **Phenotype shift:** LAPs may undergo phenotypic shifts. During the disease, marker expression in AML may change in up to 80% of the patients. Especially, diminution of expression of markers is susceptible to be observed [24–25]. It remains to be demonstrated whether this phenomenon corresponds to a true phenotypic change or to the emergence at relapse of minor sub-clones already present at diagnosis. Therefore it is important to use an extensive panel at diagnosis to identify a large number of LAPs.
4. Finally, LSCs constitute a minor subpopulation of **leukemic blasts** that maintain the leukemic population through their ability to propagate indefinitely [26]. LSC have been defined as the lineage negative, CD34⁺CD38⁻ population of leukemic blasts. In our study, we have analyzed the CD34⁺CD38⁻ CD133⁺ and CD34⁻CD38⁻CD133⁺ expression. Both CD34 and CD133 markers allow identifying the primitive compartment in all AML. Moreover, we measured the expression of CD90, CD123 on LSCs and we observed that their expression is variable. Thus, the LSC compartment is heterogeneous and we should detect several subpopulations.

Учитывая применимость и чувствительность МПЦ можно сделать вывод, что этот метод хорошо подходит для специфического определения МОБ и позволяет сделать более точную оценку статуса ремиссии у больных ОМЛ. Благоприятный клинический исход при отсутствии МОБ повышает значимость определения МОБ для идентификации больных, у которых может быть снижена интенсивность терапии. И наоборот, больные с персистирующим МОБ являются кандидатами для назначения более агрессивных методов, в том числе трансплантации стволовых клеток. По-видимому, ЛСК устойчивы к химиотерапии и являются причиной рецидива. Выявление этих популяций представляется важным этапом лечения и фактором прогноза влияния МОБ.

References

1. *Campana D.* Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003, 121:823-838.
2. *Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M, Caballero MD, Ramos F, Martinez M, Fernandez-Calvo J, Martinez A, San Miguel JF.* Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol.* 1995, 70:189-194.
3. *Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Martinez A, San Miguel JF.* Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia* 1995, 9:993-998.
4. *Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez E, Terstappen W, O'Brien MC, Baron S, Deisseroth AB.* Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood.* 1993, 81:3083-3090.
5. *Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb HJ, Ludwig WD, Hiddemann W, Haferlach T.* Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003,88:646-653.
6. *Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I.* Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008, 129:934-945.
7. *Olaru D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Duval A, Chautard S, Guyotat D.* Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008, 74:17-24.

Based on its applicability and sensitivity, it can be concluded that MFC is a well-suited approach for the specific detection of MRD and, hence, could help obtain a more precise evaluation of remission status in patients with AML. The favorable clinical outcome of MRD-negative cases raises the possibility of using MRD assays to identify patients in whom treatment intensity could be reduced. On the contrary patients with persisting MRD are candidates for more aggressive treatments including stem cell transplantation. Finally, detection of AML stem cells offers advantages in terms of specificity. LSCs seem to survive chemotherapy, and to be responsible for relapse. Identification of these populations is an important parameter and contributes to the prognostic impact of MRD.

Таблица / Table

MoAb панель, используемая для поверхностного окрашивания антигена в шесть и четыре цветовых сочетаний / MoAb panel used for surface antigen staining in six- and four-color combinations

Tube number		FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
Six-color	1	CD15	CD117	CD45	CD34	CD33	HLA-DR
	2	CD7	CD13	CD45	CD34	CD33	CD19
	3	CD65	CD56	CD45	CD34	CD4	CD16
	4	CD14	CD64	CD45	CD4	CD11b	HLA-DR
	5	CD38	CD56	CD45	CD34	CD33	CD19
	6	CD61	CD235a	CD45	CD33	CD36	HLA-DR
Four-color	1	CD15	CD117	CD45	CD34		
	2	CD15	CD33	CD45	CD34		
	3	CD15	HLA-DR	CD45	CD34		
	4	HLA-DR	CD33	CD45	CD34		
	5	CD7	CD33	CD45	CD19		
	6	CD13	CD33	CD45	CD34		
	7	HLA-DR	CD13	CD45	CD34		
	8	CD56	CD33	CD45	CD34		
	9	CD65	CD14	CD45	CD34		
	10	CD11b	CD117	CD45	CD34		
	11	CD65	CD11b	CD45	CD4		
	12	CD71	CD11b	CD45	CD34		
	13	CD38	CD19	CD45	CD34		
	14	CD14	CD33	CD45	CD2		

8. *Campana D, Pui CH.* Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995, 85:1416-1434.
9. *San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M, Caballero D, Garcia Marcos MA, Fernandez Calvo J, Calmuntia MJ, az-Mediavilla J, Orfao A.* Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997, 90:2465-2470.
10. *San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo C, Ramos E, Calmuntia MJ, Pérez JJ, Gonzalez M, Orfao A.* Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood*. 2001, 98:1746–1751.
11. *Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, Battaglia A, atalano G, Del Moro B, Cudillo L, Postorino M, Masi M, Amadori S.* Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3948–3952.
12. *Venditti A, Tamburini A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Panetta P, Scornajenghi KA, Cox C, Amadori S.* Clinical relevance of minimal residual disease detection in adult acute myeloid leukemia. *J Hematother Stem Cell Res* 2002, 11:349–357.
13. *Feller N, van der Pol MA, van Stijn A.* MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004, 18:1380-1390.
14. *Venditti A, Maurillo L, Buccisano F.* Multidimensional flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003, 44:445-450.
15. *Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I.* The use of receiver operating characteristic analysis for detection of minimal residual disease usinf five-colour multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse. *Cytometry B Clin Cytom* 2009, 76:91-101.
16. *Kern W, Voskova D, Schnittger S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T.* Four-fold staining including CD45 gating improves the sensitivity of multiparameter flow cytometric assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia. *Hematol J* 2004, 5: 410–41.
17. *Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, Pounds S, Razzouk BI, Lacayo NJ, Cao X, Meshinchi S, Degar B, Airewele G, raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Downing JR, Leung W, Pui CH, Campana D.* Minimal residual disease directed-therapy for childhood acute myeloid leukemia results of the AML02 multicentre trial. *The Lancet Oncology* 2012, 11:543:552.

18. *Feller N, Schuurhuis GJ, van Stijn A, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ.* High percentage of CD34-positive cells in autologous AML peripheral blood stem cell products reflects inadequate in vivo purging and low chemotherapeutic toxicity in a subgroup of patients with poor clinical outcome. *Leukemia* 2003, 17:68-75.
19. *Walter RB, Gooley TA, Wood BL, Milano F, Fang M, Sorror ML, Estey EH, Salter AI, Lansverk E, Chien JW, Gopal AK, Appelbaum FR, and Pagel JM.* Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on Outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011, 29: 1190-1197.
20. *Diez-Campelo M, Pérez-Simon JA, Pérez J, Alcoceba M, Richtmon J, Vidriales B, San Miguel J.* Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies. *Am J Hematol* 2009, 84:149-152.
21. *Hwang K, Park CJ, Jang S, Chi HS, Kim DY, Lee JH, Lee JH, Lee KH, Im HJ, Seo JJ.* Flow cytometry quantification and immunophenotyping of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2012, 91:1541-1546.
22. *Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Martinez A, Landolfi C, Canizo C, San Miguel JF.* Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995, 9:1896-1901.
23. *Pedreira CE, Costa ES, Arroyo ME, Almeida J, Orfao A.* Multidimensional classification approach for the automated analysis of flow cytometry data. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2008, 55: 1155-1162.
24. *Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrozek K, Schiffer CA, Powel BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD.* High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implication for residual disease detection. *Blood* 2001, 97:3574-3580.
25. *Thomas X, Campos L, Archimbaud E, Shi ZH, Treille-Ritouet D, Anglaret B, Fièrè D.* Surface marker expression of acute myeloid of acute myeloid leukemia at first relapse. *Br H Haematol* 1992, 81:40-44.
26. *Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG.* The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 2009, 114:1150-1157.

Т.В. Горбунова¹, В.Г. Поляков¹, Т.В. Шведова¹, И.Н. Серебрякова¹,
В.В. Тимошенко², Н.Н. Тупицын²

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ ПРИ РАБДОМИОСАРКОМЕ И ОССЮ

¹ НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН Москва, Россия

² НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва, Россия

Резюме

В последние годы открыта важная роль TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов, NK-клеток, а также некоторых особых субпопуляций лимфоцитов (CD28⁺, CD57⁺-клеток и т.д.) в противоопухолевом иммунитете.

Целью работы явилось изучение клинически значимых особенностей субпопуляционного состава зрелых лимфоцитов костного мозга у детей больных рабдомиосаркомой и опухолями семейства саркомы Юинга (ОССЮ).

Материалы и методы

В исследование включено 49 детей от 1 года до 17 лет. У 34 пациентов диагноз рабдомиосаркома или ОССЮ подтвержден морфологическими и иммуногистохимическими методами. У 15 детей в ходе проведенного комплексного обследования диагноз злокачественной опухоли был отвергнут (группа сравнения). Всем пациентам выполнены цитологическое и иммунологическое исследования костного мозга.

Результаты. Характерным для субпопуляционного состава костного мозга при рабдомиосаркоме у детей при сопоставлении с группой сравнения является повышение уровней активированных Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) – 37,1 % и 12,2 %, $p = 0,001$; повышение популяции зрелых $\gamma\delta$ T-клеток – 15,8 и 9,2 %, $p = 0,007$, а также выявлено снижение в два раза популяции Т-хелперных клеток (CD4⁺), экспрессирующих молекулу адгезии CD62L (Leu 8) – 17,6 и 33,5 %, $p = 0,015$. Субпопуляционный состав костного мозга при ОССЮ у детей отличался от значений в группе сравнения, повышением уровня зрелых Т-цитотоксических лимфоцитов – 68,5 и 50,5 %, $p = 0,000$ и снижением CD4⁺ Т-хелперных клеток – 26,9 и 39,3 %, $p = 0,01$, что отразилось на более низких уровнях иммунорегуляторного индекса. В группе детей с ОССЮ цитотоксическая субпопуляция зрелых Т-лимфоцитов отличалась признаками активации на основании экспрессии HLA-DR ($p = 0,001$), но не на основании экспрессии CD25 в сравнении с контрольной группой. Снижение уровней экспрессии молекулы адгезии CD62L (Leu 8) на Т-лимфоцитах костного мозга больных саркомой Юинга в сравнении с нормой было обусловлено в основном достоверными различиями в субпопуляции CD4⁺CD62L⁺ Т-клеток – $13,7 \pm 2,4$ % и $30,5 \pm 5,2$ %; $p = 0,005$.

*T.V. Gorbunova¹, V.G. Polyakov¹, T.V. Shvedova¹, I.N. Serebryakova¹,
V.V. Timoshenko², N.N. Tupitsyn²*

**ANALYSIS OF CLINICALLY SIGNIFICANT SUBSETS
OF BONE MARROW LYMPHOCYTES IN CHILDREN
WITH RHABDOMYOSARCOMA AND ESFT**

¹Pediatric Oncology and Hematology Research Institute, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

²Clinical Oncology Research Institute, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Abstract

TCR $\gamma\delta$ lymphocytes, NK-cells and some lymphocyte subsets (CD28⁺, CD57⁺ cells etc.) were recently found to play a significant role in anticancer immunity.

The purpose of this study was to analyze clinically significant specificity of composition of mature lymphocyte subsets in bone marrow from children with rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT).

Materials and methods

A total of 49 children aged 1 to 17 years were enrolled in this study. The diagnosis of rhabdomyosarcoma or ESFT was verified morphologically or immunohistochemically in 34 cases. Malignancy was excluded basing on complex assessment in 15 cases (comparator group). All patients underwent cytological and immunological study of bone marrow.

Results. Children with rhabdomyosarcoma as compared with the comparator group demonstrated elevated levels of activated T-cytotoxic cells (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) (37.1% vs. 12.2%, $p=0.001$), increased proportion of mature $\gamma\delta$ T-cells (15.8% vs. 9.2%, $p=0.007$) and 2-fold decreased population of T-helpers (CD4⁺) expressing adhesion molecule CD62L (Leu8) (17.6 vs. 33.5%, $p=0.015$) in their bone marrow. Bone marrow subset composition in patients with ESFT was different from that of the comparator group by elevated levels of mature T-cytotoxic lymphocytes (68.5% vs. 50.5%, $p=0.000$) and decreased proportion of CD4⁺ T-helpers (26.9% vs. 39.3%, $p=0.01$) as also reflected by lower levels of immunoregulatory index. In children with ESFT the cytotoxic mature T-lymphocyte subset was characterized by activation signs basing on HLA-DR expression ($p=0.001$) rather than on CD25 expression as compared with the control. Significant differences in CD4⁺CD62L⁺ T-cell subset mainly accounted for the decreased expression of adhesion molecule CD62L (Leu8) on bone marrow T-lymphocytes ($13.7 \pm 2.4\%$ vs. $30.5 \pm 5.2\%$, $p=0.005$).

Содержание Т-цитотоксических лимфоцитов $CD3^+CD8^+CD57^+$ костного мозга при ОССЮ у детей было повышено при сопоставлении с результатами в группе сравнения ($p = 0,028$). На основании проведенного анализа установлены достоверные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме от результатов при ОССЮ у детей. При ОССЮ выявлено преобладание Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$) – 68,5 % и 50,5 %, $p = 0,001$ и более низкие уровни $TCR\gamma\delta$ -лимфоцитов – 10,0 и 15,8 %, $p = 0,01$. При сопоставлении субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме с факторами прогноза установлены достоверные взаимосвязи. При распространенных стадиях рабдомиосаркомы у детей по сравнению с локализованными опухолями выявлено повышение уровня $CD62L^+$ зрелых Т-лимфоцитов – 69,8 и 35,5 %, $p = 0,016$, снижение НК-клеток – 18,6 и 6,9 %, $p = 0,039$, и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов – 18,5 и 11,0 %, $p = 0,019$. Сопоставительный анализ уровня субпопуляций лимфоцитов костного мозга при ОССЮ показал снижение количества активированных ($CD3^+CD8^+CD38^+$) Т-цитотоксических клеток – 41,7 и 63,2 %, $p = 0,024$ и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов 7,6 и 12,9 %, $p = 0,016$ у пациентов из группы высокого риска.

Вывод: проведенное нами исследование выявило различия субпопуляционного состава лимфоидных клеток у детей при рабдомиосаркоме и ОССЮ от показателей в группе детей, без признаков злокачественной опухоли. Нами установлены основные эффекторные клетки костного мозга при рабдомиосаркоме и ОССЮ у детей. Полученные данные свидетельствуют о возможности формирования групп пациентов для применения иммуномодулирующих препаратов.

Ключевые слова: субпопуляции лимфоцитов, нормальный костный мозг, Т-лимфоциты, НК-клетки, $TCR\gamma\delta$ -лимфоциты, рабдомиосаркома, ОССЮ.

Введение

Саркомы мягких тканей и костей составляют 12 % от всех злокачественных опухолей детского возраста. Несмотря на достижения последнего десятилетия в области лечения сарком у детей, прогноз при распространенных стадиях опухолевого процесса остается неблагоприятным и 5-летняя ОВ больных не превышает 25–30 % [15; 25].

До сих пор не изучены иммунологические факторы прогноза при солидных опухолях у детей. Особое место в этих исследованиях занимает изучение иммунной системы костного мозга. В последние годы доказано, что костный мозг играет важную роль в канцерогенезе и метастазировании. Иммунные клетки костного мозга могут выполнять защитную противоопухолевую функцию.

Children with ESFT presented with elevated levels of bone marrow T-cytotoxic lymphocytes $CD3^+CD8^+CD57^+$ as compared to the control ($p = 0.028$). The analysis discovered significant differences in bone marrow lymphocyte subsets between children with rhabdomyosarcoma and with ESFT. Cases with ESFT were characterized by predominance of T-cytotoxic cells $CD3^+CD8^+$ (68.5% vs. 50.5%, $p = 0.001$) and lower levels of $TCR\gamma\delta$ lymphocytes (10.0% vs. 15.8%, $p = 0.01$). Significant correlation was discovered between bone marrow lymphocyte subset composition and prognostic factors in rhabdomyosarcoma. Children with advanced rhabdomyosarcoma as compared with localized disease had elevated levels of $CD62L^+$ mature T-lymphocytes (69.8% vs. 35.5%, $p = 0.016$), decreased levels of NK-cells (18.6% vs. 6.9%, $p = 0.039$) and $\gamma\delta T$ lymphocytes (18.5% vs. 11.0%, $p = 0.019$). ESFT patients at high risk demonstrated decreased levels of activated ($CD3^+CD8^+CD38^+$) T-cytotoxic cells (41.7% vs. 63.2%, $p = 0.024$) and $\gamma\delta T$ lymphocytes (7.6% vs. 12.9%, $p = 0.016$).

Conclusion. Our findings showed that lymphoid cell subset composition in children with rhabdomyosarcoma or ESFT differed from that in children free from malignancy. Principal bone marrow effector cell subsets were identified in children with rhabdomyosarcoma and ESFT. Our analysis provides basis for stratification of patients for immunomodulating therapy.

Key words: lymphocyte subsets, normal bone marrow, T-lymphocytes, NK-cells, $TCR\gamma\delta$ lymphocytes, rhabdomyosarcoma, ESFT.

Introduction

Soft tissue and bone sarcomas account for more than 12% of all childhood malignancies. Notwithstanding the progress in the treatment of childhood sarcoma over the last decade, prognosis in advanced disease remains poor and 5-year overall survival is not more than 25 to 30% [15; 25].

Immunological factors of prognosis in children with solid tumors have not been properly studied yet. Study of bone marrow immunity is of much significance because bone marrow was recently shown to play an important role in carcinogenesis and metastasis processes. Bone marrow immunity cells may have a defensive anti-cancer function.

Показано, что зрелые Т-лимфоциты костного мозга способны сдерживать в течение длительного времени развитие костномозговых метастазов из диссеминированных опухолевых клеток. Напротив, присутствие выраженной пропорции Т-регуляторных клеток ($CD4^+$; $CD25^+$) ассоциируется с развитием метастазов при саркоме Юинга [8].

Возможности использования клеток костного мозга с лечебной целью при саркомах были впервые продемонстрированы в экспериментальных работах Г.И. Дейчман и соавт. (1982). Введение суспензии клеток нормального костного мозга хомячкам с метастатическими опухолями приводило к уменьшению количества и размера легочных метастазов или к их полной редукции [1]. Дальнейшие исследования проведены на собаках: выявлена регрессия легочных метастазов при введении клеток костного мозга животным при остеосаркоме и увеличение общей выживаемости животных [3].

Н.Н. Трапезников и соавт. (1993) провели клиническое исследование у 24 больных остеосаркомой, которым после радикальной операции, была выполнена трансфузия суспензии клеток аллогенного костного мозга. Период наблюдения за пациентами составил 8 лет. Более чем у 50 % пациентов не выявлено метастазов через 4 года наблюдения.

В этих работах сделано предположение, что клетки естественной резистентности играют роль эффекторов противоопухолевого иммунитета [13].

В последние годы открыта важная роль $TCR\gamma\delta$ -лимфоцитов, естественных киллерных клеток (NK-клеток), а также некоторых особых субпопуляций лимфоцитов (например, $CD57^+$ клеток) в противоопухолевом иммунитете. Анализ этих субпопуляций в костном мозге детей с саркомами мягких тканей и костей не проводился.

В литературе встречаются лишь единичные работы по сравнительной характеристике иммунокомпетентных клеток костного мозга здоровых детей и детей с солидными опухолями. Углубленный анализ лимфоцитарных субпопуляций костного мозга при саркомах у детей, несомненно, представляет актуальную задачу, так как в перспективе может быть использован для разработки и совершенствования иммунотерапевтических подходов у этих больных.

Целью работы является изучение клинически значимых особенностей субпопуляционного состава зрелых лимфоцитов костного мозга у детей больных рабдомиосаркомой и опухолями семейства саркомы Юинга.

Материалы и методы

Изучение субпопуляций лимфоцитов костного мозга проведено у 49 детей, проходивших обследование и лечение в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН в период с декабря 2005 по февраль 2011 года. По результатам комплексного обследования больные распределены на 3 группы:

Mature T-lymphocytes can delay for a long time development of bone marrow metastasis from disseminated tumor cells. On the opposite, detection of a marked subset of T-regulatory cells ($CD4^+CD25^+$) is associated with metastasis in Ewing's sarcoma [8].

G.I. Deutcham et al. (1982) were the first to demonstrate therapeutic potential of bone marrow cells. Injection of normal bone marrow cell suspension to hamsters with metastatic lesions reduced the number and size of pulmonary metastases or led to their complete regression [1]. Further experiments on dog models of osteosarcoma showed that the treatment with bone marrow cells resulted in regression of pulmonary metastases and improvement in overall survival of animals [3]. N.N. Trapeznikov et al. (1993) conducted a clinical trial in 24 patients with osteosarcoma receiving transfusion of allogeneic bone marrow cell suspension after radical surgery. Within a follow-up of 8 years more than 50% of patients were alive free from metastases for 4 years. Basing on these findings the conclusion was made that natural resistance cells played the role of effectors of antitumor immunity [13].

TCR $\gamma\delta$ lymphocytes, NK-cells and some lymphocyte subsets ($CD28^+$, $CD57^+$ cells etc.) were recently found to play a significant role in anticancer immunity. However these bone marrow subsets have not been analyzed in children with soft tissue sarcoma.

There are few reports comparing immunocompetent bone marrow cells between normal children and pediatric patients with solid tumors. In-depth analysis of bone marrow lymphocyte subsets in pediatric sarcoma is of much interest since it may be further used for development and improvement of immunotherapeutic approaches in this setting. The purpose of this study was to analyze clinically significant specificity of mature lymphocyte subsets in bone marrow from children with rhabdomyosarcoma and ESFT.

Materials and methods

We studied bone marrow lymphocyte subsets in 49 children managed at the Pediatric Oncology Research Institute, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, during December 2005 through February 2011. Basing on complex examination the patients were divided into 3 groups:

- страдающие рабдомиосаркомой,
- страдающие ОССЮ,
- дети, у которых в ходе комплексного обследования диагноз злокачественной опухоли был исключен.

У 34 больных подтвержден диагноз злокачественной опухоли (рабдомиосаркома – 18, опухоли семейства саркомы Юинга – 16). У 15 детей, проходивших обследование в НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН по поводу подозрения на онкологическую патологию, в ходе комплексного обследования диагноз злокачественной опухоли был исключен. Мы использовали результаты исследования субпопуляций лимфоцитов костного мозга у этих детей (группа сравнения) для сопоставления с результатами, полученными у больных злокачественными опухолями. Средний возраст детей в группе сравнения составил 8,4 года (медиана – 9 лет, 1÷17 лет). В анализируемой группе преобладали мальчики – 11 (73,3%). Причинами обращения родителей с детьми в поликлинику НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН были воспалительные заболевания, доброкачественные опухоли, пороки развития органов и тканей. Всем детям проведено комплексное обследование, включающее визуализирующие и лабораторные методы.

Больным было проведено стандартное общее клиническое обследование, включающее современные методы диагностики онкологических заболеваний. Диагноз во всех случаях был верифицирован на основании морфологического или иммуногистохимического исследования материала первичной опухоли в отделе патологической анатомии опухолей человека. Всем больным проведено морфологическое и иммунологическое исследование костного мозга.

Математические расчеты проведены с помощью программы SPSS 15 и включали корреляционный анализ (коэффициент Пирсона), сравнение средних (критерий Стьюдента), и точный критерий Фишера с ДИ 95 %. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (95 % точности).

Иммунологические исследования субпопуляций лимфоцитов костного мозга

Объем костного мозга для иммунологического исследования, во избежание контаминации периферической кровью, составлял не более 0,5 мл. Сбор клеток осуществляли на проточном цитометре FACScan (BD), последующий анализ проводили с использованием программы WinMDI 2.8.

Ядродержащие клетки костного мозга выделяли путем стандартного лизиса эритроцитов (использован FACS Lysing solution, BD). Окраску лимфоидных популяций костного мозга проводили с использованием широкой панели МКА (трехцветная флуоресценция), производитель Becton Dickinson, USA. Панель антител представлена в табл. 1. Определяли проточно-цитометрически процент Т-клеток, В-клеток и НК-клеток среди зрелых лимфоцитов (CD45⁺), рис. 1А; см. вклейку. Субпопуляции Т-лимфоцитов определяли среди зрелых CD3⁺ Т-клеток, рис. 1Б.

- rhabdomyosarcoma,
- ESFT,
- children free from malignancy.

The diagnosis of malignancy (18 rhabdomyosarcomas, 16 ESFT) was confirmed in 34 patients and excluded in 15 patients undergoing complex examination at the PORI, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS. Results of study of bone marrow lymphocyte subsets in the latter (control group) were used for comparison with those in patients with malignancy. Mean age of the control patients was 8.4 years (median 9 years, range 1 to 17 years). Most patients (11, 73.3%) in the study group were boys. Reasons for referral to the out-patient clinic of the PORI, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, included inflammatory disease, benign tumor, organ or tissue defect. All children underwent complex examination including standard up-to-date visualization and laboratory tests for cancer diagnosis. The diagnosis was verified morphologically or immunohistochemically at the Human Tumor Pathologic Anatomy Department in all cases. All the patients underwent morphological and immunological study of bone marrow.

Mathematical calculations were made using a SPSS 15 program and included correlation analysis (Pearson's coefficient), comparison of means (Student's test) and Fisher's exact test with a 95% confidence interval. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (95% accuracy).

Immunological study of bone marrow lymphocyte subsets

Volume of bone marrow samples was not more than 0.5 ml to avoid dilution with peripheral blood. Cells were collected using a FACScan (BD) flow cytometer, further analysis was made using a WinMDI 2.8 software.

Bone marrow nucleated cells were isolated by standard erythrocyte lysis (using a FACS Lysing solution, BD). Staining of bone marrow lymphocytes was performed using a broad monoclonal antibody panel (three-color fluorescence) supplied by Becton Dickinson, USA. Table 1 demonstrates the antibody panel.

Proportions of T-cells, B-cells and NK-cells among mature lymphocytes ($CD45^{++}$) were determined by flow cytometry (fig. 1A). T-lymphocyte subsets were identified among mature $CD3^{+}$ T-cells (fig. 1B).

Таблица 1

Панель МКА для изучения субпопуляций лимфоцитов КМ детей

Пробирка	FITC	PE	PE/Cy5 (PerCP)	Примечание
1	IgG2a	IgG1	IgG1	Контроль
2	IgG2a	IgG1	CD45	Контроль
3	CD3	CD56	CD45	Т-клетки и НК-клетки
4	CD19	CD5	CD45	В-лимфоциты
5	IgG2a	IgG1	CD3	Контроль в пределах Т-к-к
6	CD4	CD62L	CD3	Т-хелперы, в т.ч. CD62L
7	CD8	CD38	CD3	Т-цитотокс. к-ки, т.ч. CD38
8	CD8	HLA-DR	CD3	Т-цитотокс. лимф., т.ч. HLA-DR+
9	CD57	CD8	CD3	Т-цитотокс. лимф., в т.ч. CD57
10	CD8	CD28	CD3	Т-цитотокс. лимф., в т.ч. CD28
11	TCR $\alpha\beta$	CD25	CD3	TCR $\alpha\beta$ Т-лимф., в т.ч. CD25
12	TCR $\gamma\delta$	CD2	CD3	TCR $\gamma\delta$ Т-лимф.

Таблица 2

Результаты лечения больных рабдомиосаркомой

Результаты*	Пациенты, n(%)
Полный эффект	8(44,5)
Частичный эффект	5(27,8)
Стабилизация	3(16,7)
Отказ от лечения	1(5,5)
Прогрессирование на лечении	1(5,5)
Всего	18(100)
*Рецидив после окончания лечения наступил у 1 больного, † 4 случая.	

Таблица 3

Распределение больных ОССЮ в зависимости от наличия факторов риска

Факторы риска	Пациенты, n(%)
Метастазы	4(25)
Аксиальные опухоли	8(50)
Возраст старше 15 лет	4(25)
Низкий ответ на индуктивную химиотерапию	4(25)
V оп. > 100 см ³ /1 пораж. дл. трубчатой кости > 8 см	7(43,8)
Наличие мягкотканного компонента	8(50)
Повышение уровня ЛДГ	3(18,8)

Table 1

MCA panel for study of bone marrow lymphocyte subsets in children

Tube	FITC	PE	PE/Cy5 (PerCP)	Comment
1	IgG2a	IgG1	IgG1	Control
2	IgG2a	IgG1	CD45	Control
3	CD3	CD56	CD45	T-cells and NK-cells
4	CD19	CD5	CD45	B-lymphocytes
5	IgG2a	IgG1	CD3	Control within T-cells
6	CD4	CD62L	CD3	T-helpers incl. CD62L ⁺
7	CD8	CD38	CD3	Cytotoxic T-cells incl. CD38 ⁺
8	CD8	HLA-DR	CD3	Cytotoxic T-lymph. incl. HLA-DR ⁺
9	CD57	CD8	CD3	Cytotoxic T-lymph. incl. CD57 ⁺
10	CD8	CD28	CD3	Cytotoxic T-lymph. incl. CD28 ⁺
11	TCRαβ	CD25	CD3	TCRαβ T-lymph. incl. CD25 ⁺
12	TCRγδ	CD2	CD3	TCRγδ T-lymph.

Table 2

Treatment outcomes in children with rhabdomyosarcoma

Outcomes*	Patients n, (%)
Complete response	8(44.5)
Partial response	5(27.8)
Stable disease	3(16.7)
Refusal of treatment	1(5.5)
Progression on therapy	1(5.5)
Total	18(100)

*Relapse after treatment cessation in 1 case, death in 4 cases

Table 3

Distribution of ESFT patients with respect to risk factors

Факторы риска	Patients n, (%)	
Metastasis	4	(25)
Axial tumors	8	(50)
Age above 15 years	4	(25)
Poor response to induction chemotherapy	4	(25)
Tumor vol. more than 100 cm ³ or long bone lesion more than 8 cm	7	(43.8)
Soft tissue component	8	(50)
LDH elevation	3	(18.8)

В исследование включены 18 детей с рабдомиосаркомой от 1 года до 15 лет, ср. 7 лет; м – 8 (44,4 %), д – 10 (55,6 %). Первичная локализация опухоли: область головы и шеи – 10 (параменингеальная локализация – 8, в т.ч. 4 с интракраниальным ростом; орбита – 1, мягкие ткани лица – 1), малый таз – 4 (предстательная железа – 1), конечности – 2, паравертебральная локализация – 1, не выявлена первичная локализация опухоли – 1.

Стадии заболевания в соответствии с классификацией TNM: I – 3, II – 7, III – 3 и IV – 5 пациентов. Наличие метастазов: в регионарные лимфатические узлы – 7 (38,9 %) больных, отдаленные (легкие, костный мозг, мягкие ткани спины) – 5 пациентов (26,6 %).

Лечение пациентов проведено по международным протоколам и протоколам, утвержденным на ученых советах НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Последний пациент включен в исследование 21.02.2011. Анализ результатов лечения проведен на 24.05.2011. Эффективность лечения оценивалась соответственно стандартным критериям эффективности лечения (табл. 2).

В исследование включены 16 детей с ОССЮ в возрасте от 2 до 16 лет, средний возраст 10,5 лет, м – 11 (68,7 %), д – 5 (31,2 %).

Диагноз ОССЮ устанавливали на основании иммуногистологических и молекулярно-генетических исследований. Преобладала классическая саркома Юинга – 12 пациентов (75 %), примитивная нейроэктодермальная опухоль (ПНЭО) выявлена в 3 случаях (18,7 %) и опухоль Аскина – в 1 (6,2 %) случае (табл. 3).

По протоколу терапии больных группы высокого риска ОССЮ лечение проведено 13 пациентам. Лечение больных группы стандартного риска ОССЮ проведено 3 (протокол СЮ–Стандарт–2000) пациентам (табл. 4).

Результаты исследования

В литературе отсутствует единство мнений относительно нормального содержания различных субпопуляций лимфоцитов в костном мозге ребенка. По этой причине субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга у 15 детей, у которых в ходе комплексного обследования диагноз злокачественной опухоли был исключен, может быть рассмотрен как «группа сравнения», то есть – показатели при отсутствии онкологической патологии. Результаты иммунологического исследования костного мозга этих детей представлены в табл. 5.

В костном мозге детей, не имеющих злокачественной опухоли, преобладают зрелые Т-клетки (в среднем 60,8 %; табл. 5). Количество CD3⁺ и CD5⁺ лимфоцитов практически совпадает. Содержание CD7⁺ клеток, изученное у трех детей, не было более высоким (в ср. 57,1 %), чем количество CD3⁺ и CD5⁺ лимфоцитов, что свидетельствует об отсутствии Т-клеточных предшественников в гейте CD45⁺⁺ лимфоцитов.

The study was performed in 18 children with rhabdomyosarcoma aged 1 to 15 years (mean 7 years) including 8 (44.4%) boys and 10 (55.6%) girls. Primary tumor sites were head and neck in 10 (8 parameningeal tumors including 4 with intracranial growth, 1 orbital and 1 facial soft tissue tumors), small pelvis in 4 (1 prostate tumor), limbs in 2, paravertebral region in 1 and unknown in 1 cases.

Distribution of patients by TNM stage was as follows: 3 with stage I, 7 with stage II, 3 with stage III and 5 with stage IV. Regional lymph node involvement was found in 7 (38.9%) and distant metastasis (lung, bone marrow, soft tissues of the back) in 5 (26.6%) patients.

The patients received treatment by protocols approved by international organizations and scientific councils of the PORI, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS. The last patient was enrolled on the 21st of February, 2011. Analysis of treatment outcomes was made on the 24th of May, 2011. Response was assessed by standard criteria (table 2).

A total of 16 patients aged 2 to 16 years (mean 10.5 years) with ESFT were enrolled including 11 (68.7%) boys and 5 (31.2%) girls.

The diagnosis of ESFT was made basing on immunohistological and molecular genetic studies. Classical Ewing's sarcoma was predominant 12 (75%), primitive neuroectodermal tumor (PNET) was found in 3 (18.7%) and Askin tumor in 1 (6.2%) cases. Frequency of detection of risk factors in children with ESFT is demonstrated in table 3.

Treatment by the protocols for high risk ESFT was given to 13 and for standard risk ESFT (protocol ES-Standard, 2000) to 3 patients; the outcomes are summarized in table 4.

Results

Literature data concerning relatively normal composition of lymphocyte subsets in bone marrow of children are equivocal. Therefore the 15 children in whom the diagnosis of malignancy was excluded formed a comparator group and their bone marrow lymphocyte subset composition was considered characteristic of patients free from malignancy. Table 5 summarizes bone marrow immunological findings in these children.

Bone marrow from malignancy-free children demonstrated preponderance of mature T-cells (mean 60.8%) (table 5). Counts of CD3⁺ and CD5⁺ lymphocytes were similar. Proportions of CD7⁺ cells in 3 children were not higher (mean 57.1%) than those of CD3⁺ and CD5⁺ lymphocytes which was evidence of the absence of T-cell precursors among CD45⁺⁺ lymphocytes.

Таблица 4

Результаты лечения больных ОССЮ

Результат	n пациентов(%)	
Полный эффект	11	(68,8)
Частичный эффект	3	(18,8)
Стабилизация заболевания	1	(6,2)
Прогрессия на лечении	1	(6,2)

Таблица 5

Субпопуляция лимфоцитов костного мозга детей группы сравнения

№	Маркер	%, $M \pm m$	n пациентов*
1	CD3	$60,8 \pm 5,0$	15
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	$50,5 \pm 2,4$	14*
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	$39,3 \pm 2,8$	14*
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	$0,8 \pm 0,09$	14*
5	CD5	$59,2 \pm 5,4$	13*
6	CD19	$27,8 \pm 4,5$	15
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	$14,6 \pm 4,2$	13*
8	CD20 ⁺	$25,3 \pm 3,8$	15
9	CD3–CD56 ⁺	$9,4 \pm 1,7$	12*
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	$12,6 \pm 5,5$	13*
11	TCR $\alpha\beta$	$86,4 \pm 1,5$	13*
12	TCR $\gamma\delta$	$9,2 \pm 1,4$	11*
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	$8,9 \pm 1,4$	11*
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	$12,2 \pm 1,9$	13*
15	CD25 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	$5,6 \pm 1,1$	10*
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	$66,0 \pm 7,3$	11*
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	$34,6 \pm 3,7$	10*
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	$49,1 \pm 10,3$	11*
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	$16,9 \pm 5,6$	11*
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	$11,6 \pm 5,0$	10*
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	$47,9 \pm 7,5$	11*
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	$17,6 \pm 3,5$	10*

*Иногда обследовано < 15 детей, т.к. кол-во клеток КМ было недостаточным для изучения всех маркеров.

Table 4

Treatment outcomes in ESFT patients

Outcomes	Patients, n(%)
Complete response	11(68.8)
Partial response	3(18.8)
Stable disease	1(6.2)
Progression on therapy	1(6.2)

Table 5

Bone marrow lymphocyte subsets in malignancy-free children (comparator group)

No	Marker	Percentage, mean $\pm$ SD	Patient, n *
1	CD3	60.8 $\pm$ 5.0	15
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50.5 $\pm$ 2.4	14*
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	39.3 $\pm$ 2.8	14*
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0.8 $\pm$ 0.09	14*
5	CD5	59.2 $\pm$ 5.4	13*
6	CD19	27.8 $\pm$ 4.5	15
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	14.6 $\pm$ 4.2	13*
8	CD20 ⁺	25.3 $\pm$ 3.8	15
9	CD3 ⁻ CD56 ⁺	9.4 $\pm$ 1.7	12*
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	12.6 $\pm$ 5.5	13*
11	TCR $\alpha\beta$	86.4 $\pm$ 1.5	13*
12	TCR $\gamma\delta$	9.2 $\pm$ 1.4	11*
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	8.9 $\pm$ 1.4	11*
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	12.2 $\pm$ 1.9	13*
15	CD25 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	5.6 $\pm$ 1.1	10*
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	66.0 $\pm$ 7.3	11*
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	34.6 $\pm$ 3.7	10*
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	49.1 $\pm$ 10.3	11*
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	16.9 $\pm$ 5.6	11*
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	11.6 $\pm$ 5.0	10*
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47.9 $\pm$ 7.5	11*
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17.6 $\pm$ 3.5	10*

*Less than 15 children were examined in some cases due to insufficient BM cell number for study of all markers

Таблица 6

Субпопуляции лимфоцитов КМ детей, больных РМС и не имеющих ЗНО

№	Маркер	Группа сравнения		Рабдомиосаркома,		Р
		% М ± m	n пац.	%, М ± m	n пац.	
1	CD3 ⁺	60,8 ± 5,0	15	59,9 ± 4,3	18	0,89
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50,5 ± 2,4	14	50,5 ± 3,9	16	0,99
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,3 ± 2,8	14	33,0 ± 2,7	15	0,12
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,8 ± 0,09	14	0,7 ± 0,09	15	0,39
5	CD5 ⁺	59,2 ± 5,4	13	62,8 ± 5,1	15	0,63
6	CD19 ⁺	27,8 ± 4,5	15	21,4 ± 4,4	18	0,4
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	14,6 ± 4,2	13	8,5 ± 2,4	14	0,17
8	CD20 ⁺	25,3 ± 3,8	15	22,9 ± 6,2	5	0,52
9	CD3 ⁻ CD56 ⁺	9,4 ± 1,7	12	14,2 ± 3,5	14	0,26
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	12,6 ± 5,5	13	8,6 ± 3,3	17	0,19
11	TCRαβ	86,4 ± 1,5	11	83,1 ± 1,9	11	0,19
12	TCRγδ	9,2 ± 1,4	11	15,8 ± 1,6	11	0,007
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	8,9 ± 1,4	11	28,7 ± 6,1	10	0,004
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	12,2 ± 1,9	13	37,1 ± 6,3	14	0,001
15	CD25 ⁺ TCRαβ ⁺	5,6 ± 1,1	10	10,6 ± 2,7	10	0,77
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	66,0 ± 7,3	11	60,0 ± 7,9	14	0,6
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	34,6 ± 3,7	10	46,0 ± 4,8	9	0,08
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	49,1 ± 10,3	11	17,8 ± 4,9	9	0,32
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	16,9 ± 5,6	11	19,6 ± 8,3	8	0,78
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	11,6 ± 5,0	10	12,2 ± 6,2	7	0,94
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47,9 ± 7,5	11	35,5 ± 7,7	11	0,08
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17,6 ± 3,5	10	13,6 ± 2,5	10	0,015

Table 6

Comparison of BM lymphocyte composition in children with rhabdomyosarcoma and malignancy-free children

№	Marker	Comparator group		Rhabdomyosarcoma		P
		%, mean±SD	Pat., n	%, mean±SD	Pat., n	
1	CD3	60.8±5.0	15	59.9±4.3	18	0.89
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50.5±2.4	14	50.5±3.9	16	0.99
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	39.3±2.8	14	33.0±2.7	15	0.12
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0.8±0.09	14	0.7±0.09	15	0.39
5	CD5	59.2±5.4	13	62.8±5.1	15	0.63
6	CD19	27.8±4.5	15	21.4±4.4	18	0.4
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	14.6±4.2	13	8.5±2.4	14	0.17
8	CD20 ⁺	25.3±3.8	15	22.9±6.2	5	0.52
9	CD3 ⁻ CD56 ⁺	9.4±1.7	12	14.2±3.5	14	0.26
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	12.6±5.5	13	8.6±3.3	17	0.19
11	TCRαβ	86.4±1.5	11	83.1±1.9	11	0.19
12	TCRγδ	9.2±1.4	11	15.8±1.6	11	0.007
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	8.9±1.4	11	28.7±6.1	10	0.004
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	12.2±1.9	13	37.1±6.3	14	0.001
15	CD25 ⁺ TCRαβ ⁺	5.6±1.1	10	10.6±2.7	10	0.77
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	66.0±7.3	11	60.0±7.9	14	0.6
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	34.6±3.7	10	46.0±4.8	9	0.08
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	49.1±10.3	11	17.8±4.9	9	0.32
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	16.9±5.6	11	19.6±8.3	8	0.78
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	11.6±5.0	10	12.2±6.2	7	0.94
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47.9±7.5	11	35.5±7.7	11	0.08
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17.6±3.5	10	13.6±2.5	10	0.015

Таблица 7

Субпопуляции лимфоцитов КМ детей, больных ОССЮ и не имеющих ЗНО

№	Маркер	Группа сравнения		ОССЮ, %, $M \pm m$	п пац.	Р
		% $M \pm m$	п пац.			
1	CD3 ⁺	60,8 ± 5,0	15	54,3 ± 4,6	16	0,3
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50,5 ± 2,4	14	68,5 ± 3,1	16	0,000
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,3 ± 2,8	14	26,9 ± 3,5	16	0,01
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,8 ± 0,09	14	0,4 ± 0,08	16	0,002
5	CD5 ⁺	59,2 ± 5,4	13	48,7 ± 4,7	14	0,16
6	CD19 ⁺	27,8 ± 4,5	15	21,8 ± 3,5	16	0,3
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	14,6 ± 4,2	13	13,2 ± 2,4	14	0,78
8	CD20 ⁺	25,3 ± 3,8	15	11,9	1	–
9	CD3 [–] CD56 ⁺	9,4 ± 1,7	12	18,0 ± 3,7	14	0,049
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	12,6 ± 5,5	13	7,5 ± 2,0	15	0,38
11	TCRαβ	86,4 ± 1,5	13	85,1 ± 2,4	12	0,65
12	TCRγδ	9,2 ± 1,4	11	10,0 ± 1,2	11	0,69
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	8,9 ± 1,4	11	33,8 ± 5,4	14	0,001
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	12,2 ± 1,9	13	37,5 ± 6,3	15	0,001
15	CD25 ⁺ TCRαβ ⁺	5,6 ± 1,1	10	11,0 ± 3,7	12	0,8
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	66,0 ± 7,3	11	75,0 ± 5,3	15	0,32
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	34,6 ± 3,7	10	55,5 ± 4,8	14	0,004
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	49,1 ± 10,3	11	22,4 ± 5,5	14	0,27
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	16,9 ± 5,6	11	38,4 ± 6,4	14	0,022
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	11,6 ± 5,0	10	25,8 ± 3,7	14	0,03
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47,9 ± 7,5	11	36,0 ± 7,4	14	0,04
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17,6 ± 3,5	10	13,6 ± 2,5	14	0,005

Table 7

Comparison of BM lymphocyte composition in children with Ewing's sarcoma and malignancy-free children

№	Marker	Normal		ESFT		P
		%, mean±SD	Patient, n	%, mean±SD	Patient, n	
1	CD3	60.8±5.0	15	54.3±4.6	16	0.3
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50.5±2.4	14	68.5±3.1	16	0.000
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	39.3±2.8	14	26.9±3.5	16	0.01
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0.8±0.09	14	0.4±0.08	16	0.002
5	CD5	59.2±5.4	13	48.7±4.7	14	0.16
6	CD19	27.8±4.5	15	21.8±3.5	16	0.3
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	14.6±4.2	13	13.2±2.4	14	0.78
8	CD20 ⁺	25.3±3.8	15	11.9	1	-
9	CD3 ⁺ CD56 ⁺	9.4±1.7	12	18.0±3.7	14	0.049
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	12.6±5.5	13	7.5±2.0	15	0.38
11	TCRαβ	86.4±1.5	13	85.1±2.4	12	0.65
12	TCRγδ	9.2±1.4	11	10.0±1.2	11	0.69
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	8.9±1.4	11	33.8±5.4	14	0.001
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	12.2±1.9	13	37.5±6.3	15	0.001
15	CD25 ⁺ TCRαβ ⁺	5.6±1.1	10	11.0±3.7	12	0.8
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	66.0±7.3	11	75.0±5.3	15	0.32
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	34.6±3.7	10	55.5±4.8	14	0.004
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	49.1±10.3	11	22.4±5.5	14	0.27
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	16.9±5.6	11	38.4±6.4	14	0.022
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	11.6±5.0	10	25.8±3.7	14	0.03
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47.9±7.5	11	36.0±7.4	14	0.04
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17.6±3.5	10	13.6±2.5	14	0.005

Таблица 8

Сопоставление субпопуляций лимфоцитов КМ при рабдомиосаркоме и ОССЮ

№	Маркер	Рабдомиосаркома		ОССЮ, %, М ± m	Пац.,n	Р
		%, М ± m	Пац.,n			
1	CD3 ⁺	59,9 ± 4,3	18	54,3 ± 4,6	16	0,38
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50,5 ± 3,9	16	68,5 ± 3,1	16	0,001
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	33,0 ± 2,7	15	26,9 ± 3,5	16	0,18
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,7 ± 0,09	15	0,4 ± 0,08	16	0,024
5	CD5 ⁺	62,8 ± 5,1	15	48,7 ± 4,7	14	0,054
6	CD19 ⁺	21,4 ± 4,4	18	21,8 ± 3,5	16	0,95
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	8,5 ± 2,4	14	13,2 ± 2,4	14	0,18
8	CD20 ⁺	22,9 ± 6,2	5	11,9	1	—
9	CD3–CD56 ⁺	14,2 ± 3,5	14	18,0 ± 3,7	14	0,45
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	8,6 ± 3,3	17	7,5 ± 2,0	15	0,8
11	TCRαβ	83,1 ± 1,9	11	85,1 ± 2,4	12	0,54
12	TCRγδ	15,8 ± 1,6	11	10,0 ± 1,2	11	0,01
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	28,7 ± 6,1	10	33,8 ± 5,4	14	0,55
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	37,1 ± 6,3	14	37,5 ± 6,3	15	0,96
15	CD25 ⁺ TCRαβ ⁺	10,6 ± 2,7	10	11,0 ± 3,7	12	0,9
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	60,0 ± 7,9	14	75,0 ± 5,3	15	0,12
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	46,0 ± 4,8	9	55,5 ± 4,8	14	0,19
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	17,8 ± 4,9	9	22,4 ± 5,5	14	0,57
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	19,6 ± 8,3	8	38,4 ± 6,4	14	0,09
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	12,2 ± 6,2	7	25,8 ± 3,7	14	0,06
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47,5 ± 7,9	11	36,0 ± 7,4	14	0,28
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17,6 ± 3,5	10	13,6 ± 2,5	14	0,36

Table 8

Comparison of BM lymphocyte composition in children with rhabdomyosarcoma and ESFT

№	Marker	Rhabdomyosarcoma		ESFT		P
		%, mean±SD	Patient, n	%, mean±SD	Patient, n	
1	CD3	59.9±4.3	18	54.3±4.6	16	0.38
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺	50.5±3.9	16	68.5±3.1	16	0.001
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	33.0±2.7	15	26.9±3.5	16	0.18
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	0.7±0.09	15	0.4±0.08	16	0.024
5	CD5	62.8±5.1	15	48.7±4.7	14	0.054
6	CD19	21.4±4.4	18	21.8±3.5	16	0.95
7	CD19 ⁺ CD5 ⁺	8.5±2.4	14	13.2±2.4	14	0.18
8	CD20 ⁺	22.9±6.2	5	11.9	1	—
9	CD3 ⁺ CD56 ⁺	14.2±3.5	14	18.0±3.7	14	0.45
10	CD3 ⁺ CD56 ⁺	8.6±3.3	17	7.5±2.0	15	0.8
11	TCRαβ	83.1±1.9	11	85.1±2.4	12	0.54
12	TCRγδ	15.8±1.6	11	10.0±1.2	11	0.01
13	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	28.7±6.1	10	33.8±5.4	14	0.55
14	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	37.1±6.3	14	37.5±6.3	15	0.96
15	CD25 ⁺ TCRαβ ⁺	10.6±2.7	10	11.0±3.7	12	0.9
16	CD3 ⁺ CD38 ⁺	60.0±7.9	14	75.0±5.3	15	0.12
17	CD8 ⁺ CD38 ⁺	46.0±4.8	9	55.5±4.8	14	0.19
18	CD8 ⁺ CD28 ⁺	17.8±4.9	9	22.4±5.5	14	0.57
19	CD3 ⁺ CD57 ⁺	19.6±8.3	8	38.4±6.4	14	0.09
20	CD8 ⁺ CD57 ⁺	12.2±6.2	7	25.8±3.7	14	0.06
21	CD3 ⁺ Leu8 ⁺	47.5±7.9	11	36.0±7.4	14	0.28
22	CD4 ⁺ Leu8 ⁺	17.6±3.5	10	13.6±2.5	14	0.36

Интересно отметить, что наименьшее содержание Т-клеток (по маркерам CD3 и CD5) отмечено у ребенка в возрасте 1 год. Это хорошо согласуется с данными литературы [2; 4]. Второй по величине субпопуляцией лимфоцитов костного мозга детей являются В-клетки ($CD19^+$) – 26,7 %. Такой же процент В-клеток определен у четверых обследованных по маркеру CD20 детей ($25,3 \pm 3,8$ %). Это свидетельствует об отсутствии В-линейных предшественников ($CD19^+CD20^-$) в пределах изучаемых зрелых ($CD454^+$) лимфоцитов костного мозга детей. Третью по величине популяцию зрелых лимфоцитов костного мозга составляют NK-клетки ($CD56^+CD3^-$) – в среднем 9,4 %. Сумма средних процентов Т-, В- и NK-клеток в пределах зрелых лимфоцитов равна 96,1 %, что свидетельствует о методической правильности проточно-цитометрического обнаружения этих популяций.

Дальнейший анализ субпопуляций Т-лимфоцитов проведен нами в гейте $CD3^+$ клеток. Изучены Т-хелперные ($CD4^+$) и Т-киллерные ($CD8^+$) лимфоциты, $TCR\alpha\beta$ и $TCR\gamma\delta$ Т-клетки, активированные лимфоциты ($CD25$, $HLA-DR$, $CD38$), а также некоторые особые субпопуляции – $CD57$, $CD28$ – как показано на рис. 2.

Субпопуляции лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме у детей

Сопоставление иммунологических данных у детей при рабдомиосаркоме с показателями в группе сравнения представлено в табл. 6.

Выявлены достоверные различия в уровнях активированных Т-клеток ($CD3^+HLA-DR^+$), активированных Т-киллерных клеток ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$), Т-клеток ($CD3$), коэкспрессирующих $CD4$ и $Leu8$ ($CD62L$), а также Т-клеток ($CD3$), имеющих $\gamma\delta$ Т-клеточные рецепторы. Различия состояли, в первую очередь, в значимом увеличении при рабдомиосаркоме субпопуляции активированных Т-клеток и Т-цитотоксических клеток, а также в увеличении пропорции зрелых Т-клеток, экспрессирующих на мембране $TCR\gamma\delta$. При рабдомиосаркоме отмечено снижение почти в два раза процентного содержания зрелых Т-клеток, коэкспрессирующих $CD4$ (Т-хелперы/индукторы) и адгезионную молекулу $CD62L$ ($Leu8$). Повышение (в три раза) процента $HLA-DR^+$ Т-цитотоксических клеток следует рассматривать как проявление активации клеток иммунной системы костного мозга при рабдомиосаркоме.

Еще один интересный результат связан с установлением факта увеличения субпопуляции $TCR\gamma\delta$ -позитивных клеток у больных рабдомиосаркомой.

При сопоставлении субпопуляций лимфоцитов костного мозга с факторами прогноза при рабдомиосаркоме у детей значимые различия отмечены лишь для одной Т-клеточной субпопуляции ($Leu8$, $CD62L$). Клетки этого типа преобладали при наличии метастазов в регионарные лимфатические узлы – $69,8 \pm 8,0$ и $35,5 \pm 7,7$ % соответственно, $p = 0,016$.

Of interest, the lowest T-cell content (by CD3 and CD5 markers) was found in a 1-year old infant. This is consistent with literature data [2; 4]. B-cells (CD19⁺) are the second most common (26.7%) lymphocyte subset in bone marrow of the children. A similar B-cell percentage was found in 4 children examined for CD20 marker ($25.5 \pm 3.8\%$). This is evidence of the absence of B-cell precursors (CD19⁺CD20⁻) within the mature (CD45⁺⁺) lymphocyte pool. NK-cells (CD56⁺CD3⁻) are the third most common subset of mature bone marrow lymphocytes (mean 9.4%). Ms of T-, B- and NK-cells make a total of 96.1% of mature lymphocytes, therefore use of flow cytometry may be considered methodologically reasonable.

We continued analysis of T-lymphocyte populations in the CD3⁺ cell gate. As shown in figure 2 T-helper (CD4⁺) and T-killer (CD8⁺) lymphocytes, TCR $\alpha\beta$ and TCR $\gamma\delta$ T-cells, activated lymphocytes (CD25, HLA-DR, CD38) and some specific subsets, such as CD57, CD28.

Bone marrow lymphocyte subsets in children with rhabdomyosarcoma

Table 6 compares immunological findings in children with rhabdomyosarcoma and the comparator group.

The comparison discovered statistically significant differences between levels of activated T-cells (CD3⁺HLA-DR⁺), activated T-killers (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺), T-cells (CD3) coexpressing CD4 and Leu8 (CD62L) and T-cells (CD3) bearing $\gamma\delta$ T-cell receptors. Children with rhabdomyosarcoma demonstrated a significantly increased proportions of activated T-cells, T-cytotoxic cells and mature T-cells expressing TCR $\gamma\delta$. This patient group also had almost a 2-fold lower percentage of mature T-cells coexpressing CD4 (T-helpers/inducers) and adhesion molecule CD62L (Leu8). The observed increase (3-fold) in percentage of HLA-DR⁺ T-cytotoxic cells should be considered a manifestation of activation of bone marrow immunity cells in rhabdomyosarcoma.

Another interesting finding is an increase in proportion of TCR $\gamma\delta$ -positive subset in rhabdomyosarcoma.

Study of bone marrow lymphocyte subsets with respect to risk factors in rhabdomyosarcoma discovered significant differences only for a single T-cell subset (Leu8, CD62L). This cell type subset was greater in patients with regional lymph node metastases ($69.8 \pm 8.0\%$ vs. $35.5 \pm 7.7\%$ respectively, $p = 0.016$).

Та же тенденция сохранялась и в отношении $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих CD62L: $27,0 \pm 9,2$ и $13,6 \pm 2,5$ % соответственно, $p = 0,08$. Важно отметить, что Т-лимфоциты костного мозга с маркером Leu8 (в особенности, $CD4^+$) были существенно снижены при сопоставлении групп РМС и сравнения. Проведенный нами анализ показал, что это обусловлено, в первую очередь, показателями у больных, не имеющих поражения регионарных лимфатических узлов. Не менее интересные данные получены и при анализе отдаленного метастазирования (индекс М). В этом случае значимыми оказались три субпопуляции костномозговых лимфоцитов: NK-клетки ($CD56^+CD3^-$), TCR $\alpha\beta$ -лимфоциты и TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты.

Количество NK-клеток костного мозга при наличии отдаленных метастазов было значимо более низким – $6,9 \pm 1,9$ и $18,6 \pm 4,8$ % соответственно, $p = 0,039$. Эти данные могут иметь важное практическое значение, так как позволяют выявить NK-клеточный иммунодефицит при прогрессировании РМС.

Повышенное содержание уровня $\gamma\delta$ Т-клеток, в костном мозге больных при диагностике РМС в сравнении с аналогичными показателями у детей, не имеющих онкологической патологии, по-видимому, отражает компенсаторный механизм иммунитета у больных. При развитии отдаленных метастазов содержание TCR $\gamma\delta$ -клеток падает: $18,5 \pm 1,7$ % ($n = 7$) и $11,0 \pm 1,7$ % ($n = 4$), $p = 0,019$.

Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у детей с опухолями семейства саркомы Юинга

Сопоставляя результаты исследования субпопуляций лимфоцитов костного мозга при ОССЮ с группой сравнения, не установлено различий в уровнях содержания зрелых Т-клеток, оцениваемых по маркерам CD3 и CD5, а также в уровнях В-лимфоцитов ($CD19^+$). Не было различий и в некоторых особых популяциях В-клеток ($CD19^+CD5^+$) и Т-клеток ($CD3^+CD56^+$), а также в уровнях Т-клеток, экспрессирующих $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-клеточные рецепторы. Сравнительная характеристика субпопуляций лимфоцитов костного мозга у детей при ОССЮ и в группе сравнения представлена в табл. 7.

Субпопуляционный состав зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$) костного мозга больных саркомой Юинга существенно отличался от результатов в группе сравнения значительным повышением пропорции $CD8^+$ цитотоксических лимфоцитов ($68,5 \pm 3,1$ и $50,5 \pm 2,4$ %; $p = 0,000$) и снижением $CD4^+$ Т-хелперных клеток ($26,9 \pm 3,5$ и $39,3 \pm 2,8$ %; $p = 0,01$). Это, в свою очередь, отразилось на вдвое более низких значениях иммунорегуляторного индекса – соотношения $CD4/CD8$ – у больных саркомой Юинга при сопоставлении с группой сравнения: $0,4 \pm 0,08$ и $0,8 \pm 0,09$; $p = 0,002$.

Нами детально изучена структура пула Т-цитотоксических клеток костного мозга ($CD3^+CD8^+$) у больных саркомой Юинга в сравнении с детьми, не имеющими онкологической патологии, и установлен ряд важных различий.

The same trend was seen for CD4-positive T-cells expressing CD62L ($27.0 \pm 9.2\%$ vs. $13.6 \pm 2.5\%$ respectively, $p = 0.08$). Important, Leu8⁺ (in particular CD4⁺) T-lymphocyte subset was considerably smaller in rhabdomyosarcoma than in the control. Our analysis demonstrated that node-negative patients mainly accounted for this effect. Analysis of distant metastasis (M) also resulted in interesting findings. Three bone marrow lymphocyte subsets appeared significant in this respect, that is NK-cells (CD56⁺CD3⁻), TCR $\alpha\beta$ and TCR $\gamma\delta$ T-lymphocytes. Patients with distant metastases demonstrated a significantly lower content of NK-cells ($6.9 \pm 1.9\%$ vs. $18.6 \pm 4.8\%$ respectively, $p = 0.039$). These findings are of much practical significance since they are indicative of NK-cell immunodeficiency in children with progressing rhabdomyosarcoma.

The greater levels of $\gamma\delta$ TCR-cells in bone marrow from rhabdomyosarcoma vs. malignancy-free children seem to reflect a compensatory immune mechanism in the former group. Development of distant metastasis is associated with a fall in TCR $\gamma\delta$ -cells ($18.5 \pm 1.7\%$ [$n = 7$] vs. $11.0 \pm 1.7\%$ [$n = 4$], $p = 0.019$).

Bone marrow lymphocyte subsets in children with Ewing's sarcoma family of tumors

Comparison of bone marrow lymphocyte subsets in children with ESFT and from the comparator group failed to find differences in mature T-cells as detected by CD3 and CD5 markers and in B-lymphocytes (CD19⁺). There were no differences in some specific B- (CD19⁺CD5⁺) and T- (CD3⁺CD56⁺) cells or in T-cells expressing $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell receptors. Table 7 compares bone marrow lymphocyte subsets in children with ESFT and from the comparator group.

Mature T-lymphocyte (CD3⁺) subsets in bone marrow of children with ESFT differed significantly from those in the comparator group by a marked increase in proportion of CD8⁺ cytotoxic lymphocytes ($68.5 \pm 3.1\%$ vs. $50.5 \pm 2.4\%$, $p = 0.000$) and a decrease in CD4⁺ T-helpers ($26.9 \pm 3.5\%$ vs. $39.3 \pm 2.8\%$, $p = 0.01$). This in turn accounted for lower immunoregulatory indices (CD4/CD8) in children with ESFT than in the control ($0.4 \pm 0.08\%$ vs. $0.8 \pm 0.09\%$, $p = 0.002$).

We analyzed in detail composition of T-cytotoxic cells (CD3⁺CD8⁺) in bone marrow from children with ESFT vs. controls to discover several important differences.

В первую очередь, отмечены более высокие уровни активации Т-клеток ($CD3^+$) и, в частности, Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$), результат получен на основании возрастания более чем в три раза HLA-DR⁺ фракции ($p = 0,001$).

Специфической особенностью Т-цитотоксических лимфоцитов костного мозга больных саркомой Юинга явилось достоверное возрастание в сопоставлении с группой сравнения пропорции $CD8^+CD38^+$ клеток среди $CD3^+$ лимфоцитов – $55,5 \pm 4,8$ и $34,6 \pm 3,7$ %; $p = 0,004$. Важно отметить, что процент $CD38^+$ клеток среди всех зрелых лимфоцитов ($CD3^+$) не отличался от такового в группе сравнения, то есть отклонения касались лишь $CD8^+$ субпопуляции.

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживает увеличение количества $CD57^+$ Т-клеток ($p = 0,022$) и, в частности, Т-цитотоксических ($CD3^+CD8^+$) клеток ($p = 0,028$) в костном мозге больных саркомой Юинга в сравнении с нормой. Данной субпопуляции придается важное значение у больных солидными опухолями, и возрастание количества этих клеток, как правило, ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [22].

У больных саркомой Юинга увеличено процентное содержание НК-клеток ($CD3^-CD56^+$) среди лимфоцитов костного мозга при сопоставлении с результатами в группе сравнения ($18,0 \pm 3,7$ и $9,4 \pm 1,7$ %), различия статистически значимы, $p = 0,049$. Особое значение имеют достоверные различия в функционально значимых субпопуляциях зрелых ($CD3^+$) Т-лимфоцитов. Так, снижение уровней экспрессии молекулы адгезии $CD62L$ (Leu8) на Т-лимфоцитах костного мозга больных саркомой Юинга при сопоставлении с уровнями в группе сравнения было обусловлено в основном достоверными различиями в субпопуляции $CD4^+CD62L^+$ Т-клеток – $13,7 \pm 2,4$ и $30,5 \pm 5,2$ %; $p = 0,005$. Молекула L-селектина ($CD62L$) играет важную роль в хоминге Т-лимфоцитов, и ее снижение при саркоме Юинга может препятствовать проникновению зрелых Т-клеток в периферические лимфоидные органы, а также в костный мозг.

При сопоставлении уровней субпопуляций лимфоцитов костного мозга при ОССЮ с клиническими факторами прогноза мы выявили, что при нарастании объема опухолевой массы (более 100 см^3 или протяженности поражения кости более 8 см) отмечалось снижение количества активированных Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+CD38^+$) в сравнении с больными, у которых опухолевая масса была меньшего размера: $41,7 \pm 8,2$ ($n = 5$) и $63,2 \pm 4,3$ % ($n = 9$) соответственно ($p = 0,024$).

Следовательно, повышение уровней активированных Т-цитотоксических клеток при саркоме Юинга можно, вероятно, рассматривать как реакцию на опухоль на ранних стадиях ее роста, а при большом размере опухоли этот показатель снижается.

Children with ESFT had higher levels of activation of T-cells ($CD3^+$), in particular T-cytotoxic cells ($CD3^+CD8^+$) as manifested by a more than 3-fold rise in HLA-DR positive fraction ($p = 0.001$).

T-cytotoxic lymphocytes from bone marrow of ESFT children demonstrated a specific significant rise in proportion of $CD8^+CD38^+$ cells in the $CD3^+$ fraction as compared to malignancy-free children ($55.5 \pm 4.8\%$ vs. $34.6 \pm 3.7\%$, $p = 0.004$). Importantly, percentages of $CD38^+$ cells among all mature lymphocytes ($CD3^+$) were similar in the two groups, which meant that the difference was due to the $CD8^+$ fraction.

Of importance in our opinion is an increase in $CD57^+$ T-cell fraction ($p = 0.022$) and in particular of T-cytotoxic ($CD3^+CD8^+$) cells ($p = 0.028$) in bone marrow from ESFT children as compared to normal ones. This subset is considered of much value in patients with solid tumors, and its elevation is as a rule associated with poor prognosis [22].

Patients with ESFT had elevated levels of NK-cells ($CD3-CD56^+$) among bone marrow lymphocytes as compared with the comparator group ($18.0 \pm 3.7\%$ vs. $9.4 \pm 1.7\%$), the difference being statistically significant ($p = 0.049$). Of especial importance are statistically significant differences in functionally important subsets of mature ($CD3^+$) T-lymphocytes. For instance, the decrease in expression of adhesion molecule $CD62L$ (Leu8) on T-lymphocytes in bone marrow from ESFT children was mainly due to significant differences in $CD4^+CD62L^+$ T-cell fraction ($13.7 \pm 2.4\%$ vs. $30.5 \pm 5.2\%$, $p = 0.005$). L-selectin ($CD62L$) molecule plays an important role in T-lymphocyte homing, and depletion of this cell subset in Ewing's sarcoma may be a reason for mature T-cells failing to penetrate into peripheral lymphoid organs and bone marrow.

Analysis of bone marrow lymphocyte subset compositions in ESFT with respect to prognosis factors demonstrated that increase in tumor volume (more than 100 cm^3 or length of bone lesion more than 8 cm) was associated with decrease in activated T-cytotoxic cells ($CD3^+CD8^+CD38^+$) as compared to patients with smaller tumor burden ($41.7 \pm 8.2\%$ [$n = 5$] vs. $63.2 \pm 4.3\%$ [$n = 9$] respectively, $p = 0.024$).

Therefore increased levels of activated T-cytotoxic cells in Ewing's sarcoma may be considered a response to the tumor at early stages of its growth, while a greater tumor burden is associated with lower levels of these cells.

Интересное наблюдение получено в отношении низких уровней TCR $\gamma\delta$ -клеток костного мозга у больных саркомой Юинга с поражением осевого скелета в сравнении с больными, у которых были поражены конечности: $7,6 \pm 0,9$ (n = 6) и $12,9 \pm 1,6$ % (n = 5) соответственно (p = 0,016). В целом по группе саркомы Юинга уровни Т-клеток с $\gamma\delta$ -рецептором не отличались от нормы. Известно, что опухоли семейства саркомы Юинга с локализацией в области осевого скелета имеют менее благоприятный прогноз. При сопоставительном анализе уровней субпопуляций костного мозга при ОССЮ с клиническими признаками мы отметили две субпопуляции. Субпопуляция Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD38⁺) снижалась при увеличении объема опухолевой массы более 100 см³ или нарастании протяженности поражения длиной трубчатой кости более 8 см. Уровень TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов был ниже у пациентов с поражением осевого скелета по сравнению с их уровнем при поражении конечностей.

Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов костного мозга у детей при рабдомиосаркоме и опухолях семейства саркомы Юинга

Сопоставив уровни субпопуляций лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме и опухолях семейства саркомы Юинга у детей, мы выявили, что содержание Т-цитотоксических клеток (CD3⁺, CD8⁺) было достоверно более высоким у больных с саркомой Юинга по сравнению с уровнем этих клеток у больных рабдомиосаркомой – $68,5 \pm 3,1$ (n = 16) и $50,5 \pm 3,9$ % (n = 16), p = 0,001. Наличие на клетках саркомы Юинга выраженной экспрессии молекул HLA-I и связывание с ними CD8⁺ цитотоксических клеток может объяснять высокий уровень этих клеток в костном мозге.

Уровень TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов был выше при рабдомиосаркоме – $15,8 \pm 1,6$ %; по сравнению с больными ОССЮ – $10,0 \pm 1,2$ %, p = 0,01. Отсутствие прямого тесного взаимодействия мягкотканой опухоли (рабдомиосаркомы) с клетками костного мозга обуславливает иные иммунологические механизмы взаимодействия организма с опухолью, что, по-видимому, отражает различия в эффекторах противоопухолевого иммунитета при этих заболеваниях.

Интересное наблюдение повышения уровня маркеров активации Т-клеток (HLA-DR) как при рабдомиосаркоме, так и при саркоме Юинга по сравнению с нормой – $37,1 \pm 6,3$ и $37,5 \pm 6,3$ % против $12,2 \pm 1,9$ % соответственно, p = 0,001. При этом по нашим результатам, отмечено снижение уровня CD3⁺CD4⁺ при ОССЮ по сравнению с данными в группе сравнения – $26,9 \pm 3,5$ и $39,3 \pm 2,8$ % соответственно, p = 0,01. Также отмечено, снижение вдвое иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 у пациентов с ОССЮ по сравнению с результатами в группе сравнения – $0,4 \pm 0,08$ и $0,8 \pm 0,09$ % соответственно, p = 0,002. Результаты сопоставления лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме и ОССЮ представлены в табл. 8.

Interestingly, in children with Ewing's sarcoma lower levels of bone marrow TCR $\gamma\delta$ -cells were associated with axial lesion as compared to limb ones ($7.6 \pm 0.9\%$ [n = 6] vs. $12.9 \pm 1.6\%$ [n = 5], respectively, $p = 0.016$). In the ESFT group, as a whole, levels of T-cells bearing $\gamma\delta$ -receptors were similar to those in normal children. Axial ESFT are known to have a poorer prognosis. Analysis of bone marrow subsets in ESFT with respect to clinical signs identified two subsets. T-cytotoxic cell subset ($CD3^+CD8^+CD38^+$) was decreasing with increase in tumor volume to more than 100 cm^3 or length of the long bone lesion to more than 8 cm. Levels of TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes were lower in patients with axial tumors than in patients with limb lesions.

Comparison of bone marrow lymphocyte subsets in children with rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma family of tumors

Comparison of bone marrow lymphocyte subsets in children with rhabdomyosarcoma vs. ESFT demonstrated that T-cytotoxic cells ($CD3^+$, $CD8^+$) made a significantly greater fraction in Ewing's sarcoma as compared with rhabdomyosarcoma ($68.5 \pm 3.1\%$ [n = 16] vs. $50.5 \pm 3.9\%$ [n = 16], respectively, $p = 0.001$). As known, Ewing's sarcoma cells as a rule express HLA-1 molecule presenting antigen peptides to $CD8^+$ cytotoxic cells [5]. Therefore the elevated level of $CD8^+$ cells in bone marrow from ESFT patients may be of pathogenetic significance.

Levels of TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes were higher in rhabdomyosarcoma ($15.8 \pm 1.6\%$) than in ESFT ($10.0 \pm 1.2\%$) ($p = 0.01$). Different immunological mechanisms of interaction between the body and the tumor which seem to be manifested in differences in anticancer immunity effectors may be due to the absence of close interaction between the soft tissue tumor (rhabdomyosarcoma) and bone marrow cells.

Of interest is increase in T-cell activation markers (HLA-DR) both in rhabdomyosarcoma and ESFT as compared with normal levels ($37.1 \pm 6.3\%$ and $37.5 \pm 6.3\%$ vs. $12.2 \pm 1.9\%$, respectively, $p = 0.001$). Levels of $CD3^+CD4^+$ were decreased in ESFT as compared to the controls ($26.9 \pm 3.5\%$ vs. $39.3 \pm 2.8\%$, respectively, $p = 0.01$). Patients with ESFT demonstrated 2-fold lower immunoregulatory indices ($CD4/CD8$) than the control children (0.4 ± 0.08 vs. 0.8 ± 0.09 , respectively, $p = 0.002$). Table 8 compares bone marrow lymphocyte subsets in rhabdomyosarcoma and ESFT.

Обсуждение полученных результатов

Приведенные иммунологические исследования выявили ряд характерных особенностей, отличающих субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга детей, больных мелкокруглоклеточными саркомами, от лимфоцитов костного мозга детей, не имеющих онкологической патологии. Остановимся на анализе каждого из выявленных сдвигов, рассматривая их как с позиций противоопухолевого иммунитета, так и клинической значимости.

Костный мозг уже давно привлекает внимание исследователей как орган, иммунные клетки которого способны обеспечить противоопухолевое действие. При этом большое значение придается врожденному иммунитету. В числе костномозговых клеток – кандидатов на роль эффекторов противоопухолевого иммунитета обсуждались, в первую очередь, НК-клетки, моноциты/макрофаги и Т-цитотоксические лимфоциты.

В научных публикациях обсуждается роль НК-клеток, как врожденных эффекторных агентов способных уничтожать опухолевые клетки. *Cho D. et al.* (2010) сообщили о высокой чувствительности клеточной линии саркомы Юинга к аллогенным НК-клеткам [12].

В течение последнего десятилетия проводятся попытки интеграции иммунотерапии в схемы лечения онкологических заболеваний. Предпосылками для этого служат повреждения опухолевых клеток в результате воздействия химиотерапии или облучения, что было продемонстрировано на клетках множественной миеломы. К сожалению, «чувствительность» клеточной линии саркомы Юинга не повышается в результате воздействия химиотерапевтических агентов (доксорубицина или винкристина), но облучение клеточной линии саркомы Юинга с последующим введением НК-клеток, достоверно улучшает выживаемость больных [5; 12]. Последующие результаты *Gasser S.* (2007) выявили взаимосвязь между облучением, повреждением клеток химиотерапевтическими агентами (генотоксический стресс), «арестом» клеточного цикла и регуляцией NKG2D лигандами.

Для успешной элиминации опухолевых клеток необходимо взаимодействие клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы. В работах *Fan Z. et al.* (2006), *Shanker A. et al.* (2007) показано, что в опухоли происходит «перекрест» между НК-клетками и CD8⁺ Т-лимфоцитами. По мнению авторов, недостаточно прямого действия НК-клеток на опухоль, но необходимо вовлечение CD8⁺ Т-клеток [14; 23]. При опухолевой прогрессии происходит как истощение НК-клеток, так и нарушение CD8⁺ Т-клеточного ответа [14]. Наши данные подтверждают взаимосвязь между НК-клетками и CD8⁺ Т-лимфоцитами. В нашей работе мы выявили при ОССЮ значимое повышение по сравнению с нормой субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ ($68,5 \pm 3,1$ и $50,5 \pm 2,4$ %; $p = 0,000$) и НК-клеток CD56⁺CD3⁺ ($18,0 \pm 3,7$ и $9,4 \pm 1,7$ %; $p = 0,049$).

Discussion

Our immunologic study discovered several characteristic features helping to differentiate bone marrow lymphocyte subset composition of patients with small-cell -sarcomas from those free from malignancy. Let us consider in a greater detail each of the discovered differences in terms of both anticancer immunity and clinical significance.

For a long time bone marrow with its immunity cells capable of anticancer activities was in the focus of investigators' attention. Innate immunity plays an important role here. Potential candidates for anticancer immunity effectors among bone marrow cells include NK-cells, monocytes/macrophages and T-cytotoxic lymphocytes.

Scientific publications discuss the role of NK-cells as innate effectors able to kill tumor cells. Cho et al. (2010) reported of high sensitivity of Ewing's sarcoma cell line to allogeneic NK-cells [12].

Over the recent decade investigators attempted to integrate immunotherapy into therapeutic regimens in cancer patients. Rationale for this approach is based on tumor cell damage as a result of chemotherapy or radiotherapy as demonstrated on multiple myeloma cells. Unfortunately chemotherapy (doxorubicin, vincristin) fails to increase response of Ewing's sarcoma cell line, while irradiation of Ewing's sarcoma cell line supplemented with NK-cell treatment improved significantly patient survival [5; 12]. S. Gasser (2007) discovered relationship between irradiation and cell damage due to chemotherapy (genotoxic stress), cell cycle arrest and ligand regulation of NKG2D.

Interaction of both innate and adaptive immune systems is needed for successful elimination of tumor cells. Fan et al. (2006), A. Shanker et al. (2007) demonstrated that direct effect of NK-cells on the tumor is not sufficient and contribution of CD8⁺ T-cells is needed [14; 23]. Tumor progression is associated with depletion of NK-cells and impairment of CD8⁺ T-cell response [14]. We found a significant increase in CD3⁺CD8⁺ T-cytotoxic lymphocytes ($68.5 \pm 3.1\%$ vs. $50.5 \pm 2.4\%$, $p = 0.000$) and NK-cells CD56⁺CD3⁻ ($18.0 \pm 3.7\%$ vs. $9.4 \pm 1.7\%$, $p = 0.049$) against normal level.

В последние годы как эффекторные субпопуляции противоопухолевого иммунитета рассматриваются TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты – это зрелые Т-клетки, которые составляют небольшую популяцию среди CD3⁺-лимфоцитов крови (2–5#%) и распознают антигены (в том числе и опухолевые) с помощью иных механизмов, нежели те, что используются Т-клетками с $\alpha\beta$ -лимфоцитами. Именно по этим причинам исследованию противоопухолевого иммунитета, опосредуемого TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитами, и способам его стимулирования, активации в последнее время уделяется большое внимание. К сожалению, следует отметить, что это звено иммунитета при мелкоклеточных саркомах детально не изучалось.

TCR $\gamma\delta$ -клетки так же, как и клетки врожденного иммунитета, относятся к первой линии защиты, и установление нами их роли при мелкоклеточных саркомах, а также взаимосвязи с гематогенным метастазированием представляет интерес в понимании биологических основ данной проблемы. TCR $\gamma\delta$ -клетки являются одной из популяций опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов при колоректальном раке, раке молочной железы, раке предстательной железы, раке яичников и почечно-клеточном раке [19; 24]. Из них получены линии и клоны, которые распознают и убивают не только аутологичные опухоли, но и широкий спектр родственных опухолей, возможно, вследствие распознавания общих лигандов. **Очень важно то, что $\gamma\delta$ Т-клетки преимущественно уничтожают опухолевые клетки и практически не проявляют реактивности в отношении нетрансформированных клеток – эта их черта вызывает большой интерес с точки зрения терапевтического потенциала.** Возможно, в этом и есть ключ к разгадке высокоэффективного протективного действия аллогенного костного мозга на развитие метастазов мелкоклеточных сарком в легких.

Существуют две основные субпопуляции TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов, различающиеся используемыми в них V-областями δ -цепей – V δ 1 и V δ 2. Обе эти субпопуляции лимфоцитов распознают антигены эпителиальных опухолей [6]. V δ 1 Т-клетки распознают молекулы, родственные антигенам I класса HLA, называемые MICA и MICB, а также UL-16-связывающие белки 1-3 (ULBP1-3) [17].

В крови большинства здоровых людей V δ 2 Т $\gamma\delta$ -клетки имеются V γ 9-вариабельную область γ -цепей, и клетки с этим типом TCR составляют 50–90 % от всех $\gamma\delta$ -Т-клеток. Эти лимфоциты распознают фосфоантигены и эктопически экспрессированную митохондриальную АТФ-азу. Хорошо известно, что эта популяция V δ 2 V γ 9 периферических TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов сильно активируется разнообразными бактериями и паразитами [18]. Эти антигены идентифицированы как непептидные метаболиты (intermediates) немевалонатного пути бактериального изопреноидного биосинтеза (фосфоантигены). Были синтезированы соответствующие аналоги с мощной и стимулирующей $\gamma\delta$ -Т-клетки способностью, такие как бромогидрин пирогосфат (фосфостим) [11; 21; 24].

Over recent years investigators focused on TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes as an effector subset of anticancer immunity. TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes are mature T-cells making a small fraction (2 to 5%) of blood CD3⁺ lymphocytes and recognize antigens (including tumor antigens) using mechanisms other than those used by T-cells with $\alpha\beta$ -lymphocytes. That is why there was an increasing research in anticancer immunity mediated by TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes and ways to increase and activate these cells. Unfortunately this immunity component has not been studied in detail in patients with small-cell sarcomas.

TCR $\gamma\delta$ -cells as well as innate immunity cells make the front defense line, and our establishing of their role in small-cell sarcomas and association with hematogenic metastasis is of much interest for better understanding of this problem. TCR $\gamma\delta$ -cells are a subset of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal, breast, prostate, ovary and renal-cell carcinomas [19; 24]. They are used as a source of cell lines and clones able to recognize and kill not only autologous tumors but also a broad range of related tumors possibly due to recognition of common ligands. Importantly, $\gamma\delta$ T-cells kill mainly tumor cells while demonstrating practically no reactivity to non-transformed cells and therefore are of much interest as to their therapeutic potential. This may explain the highly effective suppression of lung metastasis from small-cell sarcoma by allogeneic bone marrow.

There are two main subsets of TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes that differ by use of V-regions of δ -chains, that is V δ 1 and V δ 2. Both of these subsets recognize antigens of epithelial tumors [6]. V δ 1 T-cells recognize molecules related to class I HLA antigens referred to as MICA and MICB or UL-16-binding proteins 1 to 3 (ULBP1-3) [17].

In blood of most healthy individuals V δ 2T-cells have a V γ 9-variable region of γ -chains, and cells with this TCR type are 50 to 90% of all $\gamma\delta$ T-cells. These lymphocytes recognize phosphoantigens and ectopically expressed mitochondrial ATPase. This subset of V δ 2 V γ 9 peripheral TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes is effectively activated by various bacteria and parasites [20]. These antigens are identified as non-peptide intermediates of the nonmevalonate pathway of bacterial isoprenoid biosynthesis (phosphoantigens). Their analogs with powerful and $\gamma\delta$ T-cell-stimulating capacity have been synthesized, such as bromohydrin pyrophosphate (phosphostim) [11; 21; 24].

В противоположность многим бактериям эукариотические клетки используют мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов. В результате образуется IPP, который также активирует V δ 2 V γ 9-T-клетки, однако, лишь в очень высоких нефизиологических концентрациях. Однако определенные опухолевые клетки синтезируют высокие концентрации IPP, которые могут быть распознаны TCR V δ 2V γ 9 как опухолевые антигены [7; 9; 16].

Особенностью лимфоцитов костного мозга детей, больных рабдомиосаркомой, в сравнении с детьми, не страдающими злокачественными заболеваниями, является повышение особой популяции зрелых T-клеток, экспрессирующих T-клеточные рецепторы $\gamma\delta$ -типа: 15,8 и 9,2 % соответственно, $p = 0,007$. Отличия субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга детей больных рабдомиосаркомой от лимфоцитов костного мозга детей с опухолями семейства саркомы Юинга также состояли в преобладании TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов 15,8 и 10,0 % соответственно, $p = 0,01$.

Внимательное рассмотрение иммунологических данных с клинических позиций указывает на то, что пик подъема TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов при рабдомиосаркоме наблюдается у группы больных с локализованными стадиями болезни, а при развитии отдаленных метастазов уровни этих клеток достоверно снижаются. Вероятно, при ранних стадиях опухолевого процесса эти клетки выполняют функцию сдерживания, однако с ростом опухолевой массы защитные резервы истощаются и необходимы иные механизмы реагирования. В частности, в обход молекул главного комплекса гистосовместимости. Это выражается в снижении TCR- $\gamma\delta$ у пациентов с неблагоприятными локализациями опухоли, которые в целом не отличались от нормы. Эти факты не могут быть полностью объяснены различиями в строении костного мозга длинных трубчатых и губчатых костей.

Подобная динамика клеток-эффекторов отличается от таковой при инфекционном процессе. Например, при вирусных инфекциях количество CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов возрастает в десятки раз, по мере освобождения организма от инфицированных клеток уровни ЦТЛ приходят к норме, иногда в течение очень длительного периода (месяцы) [9; 10; 20]. В рассматриваемом нами случае рабдомиосаркомы у детей наблюдается принципиально иное соотношение патологических клеток и уровней эффекторных лимфоцитов. Заболевание прогрессирует (развиваются отдаленные метастазы), а уровни TCR $\gamma\delta$ -клеток снижаются. Следовательно, первичная стимуляция гамма/дельта клеток опухолевыми антигенами ведет к активации и пролиферации, однако, данного варианта T-клеточного ответа не достаточно для элиминации опухоли.

Логично предположить, что повышение уровня этих клеток может благоприятно сказаться на течении заболевания, так как к традиционной химиотерапии будет добавлен иммунотерапевтический компонент – цитотоксическое действие TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов на опухоль.

Unlike many bacteria, eukaryotic cells use mevalonate pathway for biosynthesis of isoprenoids resulting in generation of isopentenyl pyrophosphate (IPP) also able to activate V δ 2 V γ 9-T-cells, but only at very high non-physiological concentrations. However certain tumor cells synthesize high concentrations of IPP that may be recognized by V δ 2 V γ 9 TCR as tumor antigens [7; 9; 16].

Bone marrow lymphocytes in children with rhabdomyosarcoma are characterized by elevation in a specific subset of mature T-cells expressing $\gamma\delta$ T-cell receptors as compared to malignancy-free children (15.8% vs. 9.2% respectively, $p = 0.007$). Bone marrow lymphocyte subset composition in children with rhabdomyosarcoma also differ from that of children with ESFT by higher levels of TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes (15.8% vs. 10.0%, $p = 0.01$).

Careful analysis of immunological findings from the clinical point of view also demonstrates that peak elevation in TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes in rhabdomyosarcoma occurs in patients with localized disease, while development of distant metastases is associated with a significant decrease in this subset. These cells seem to function as factors of containment at early stage disease, but lose their protective reserves with growth of tumor burden other defensive mechanisms become needed. This is manifested as decrease in TCR $\gamma\delta$ -cells in patients with poor prognosis tumor site.

Infection is associated with certain changes in effector cells, for example, viral infections are associated with a several ten-fold increase in CD8⁺ cytotoxic lymphocytes, and the CTL levels come to normal as the body frees itself from infected cells, sometimes a very long (several months) [9; 10; 20]. However, we observed other proportions of pathological cells and effector lymphocytes in children with rhabdomyosarcoma. The disease progresses (distant metastasis) while levels of TCR $\gamma\delta$ -cells decrease. It may be supposed therefore that primary stimulation of $\gamma\delta$ -cells by tumor antigens leads to activation and proliferation of TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes, though this type of T-cell response is not sufficient for tumor elimination.

Такие подходы в настоящее время существуют для лечения метастазов почечноклеточного рака, остеосаркомы [19; 24]. Возможно, также влиять на внутриклеточный уровень ИРР (мишени действия $\text{TCR}\gamma\delta$) с помощью терапевтических препаратов. Аминобифосфонаты, используемые в клинике для лечения остеопороза и костных метастазов, являются мощными ингибиторами ИРР-процессирующего энзима фарнезил пирофосфат синтетазы, использование этих средств приводит к внутриклеточному накоплению ИРР и мощной активации $\text{V}\delta 2\text{V}\gamma 9$ Т-клеток, перспективным является применение синтетических фосфоантигенов (фосфостим) и аминобифосфонатов для активации и увеличения количества $\text{V}\delta 2\text{V}\gamma 9$ Т-клеток.

В анализируемой нами группе больных рабдомиосаркомой подобный лечебный подход мог бы быть реализован у диссеминированных больных, у которых уровни $\text{TCR}\gamma\delta$ Т-клеток достоверно снижаются в сравнении с уровнями у больных, не имеющих отдаленных метастазов (11,0 и 18,5 %, $p = 0,019$). Нельзя исключить подобные исследования у больных саркомой Юинга с поражением осевого скелета, так как именно у этих больных отмечались более низкие уровни $\text{TCR}\gamma\delta$ -лимфоцитов в сравнении с больными, у которых были поражены конечности: 7,6 и 12,9 % ($p = 0,016$).

Обсуждая результаты наших исследований, полученные при изучении $\text{TCR}\gamma\delta$ -лимфоцитов костного мозга у больных рабдомиосаркомой, нельзя не остановиться и на диагностическом аспекте. При развитии отдаленных метастазов уровни $\gamma\delta$ Т-клеток резко снижались. Следовательно, в случаях значительного падения пропорции этих лимфоцитов у больных рабдомиосаркомой необходимо детальное обследование больного на предмет исключения отдаленных метастазов. В клинике зачастую бывают и иные ситуации, когда тот или иной очаг поражения (в легких, печени и т.д.) трудно однозначно расценить как метастатический. Проведение исследования $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов может быть полезным для ответа на этот вопрос.

В своей работе мы впервые изучили уровни ко-стимуляционных и активационных молекул – как в группе сравнения, так и при саркомах у детей. Небольшое количество наблюдений в нашей работе и недостаток информации об активационных маркерах не позволяют сделать однозначное заключение о роли $\text{CD}25^+$, $\text{CD}28^+$, $\text{CD}38^+$, $\text{CD}57^+$ и $\text{CD}62\text{L}^+$ при рабдомиосаркоме и ОССЮ у детей. Однако уточнение времени появления этих маркеров на Т-лимфоцитах в ходе развития опухоли может быть полезным, для изучения корреляции со стадией заболевания.

Заключение

Нами установлены особенности клеточного иммунитета – субпопуляций лимфоцитов костного мозга – у больных рабдомиосаркомой и ОССЮ при сопоставлении с важными факторами риска при этих заболеваниях.

It seems logical that elevation in these cells may produce a positive effect on disease course since conventional chemotherapy is supplemented with an immunotherapeutic component that is cytotoxic effect of TCR $\gamma\delta$ -lymphocytes on the tumor [19; 24]. Intracellular levels of IPP (TCR $\gamma\delta$ target) also may be controlled with therapeutic agents. Aminobiphosphonates used in the treatment of osteoporosis and bone metastases are powerful inhibitors of IPP-processing enzyme, farnesyl pyrophosphate synthase; the treatment with these agents leads to intracellular accumulation of IPP and strong activation of V δ 2V γ 9 T-cells. It seems promising to use synthetic phosphoantigens (phosphostim) and aminobiphosphonates to activate and elevate the V δ 2V γ 9 T-cell subset.

In the analyzed population of rhabdomyosarcoma patients this therapeutic approach could be used in cases with disseminating disease who demonstrated significantly decreased levels of TCR $\gamma\delta$ T-cells as compared to patients free from distant metastases (11.0% vs. 18.5%, $p = 0.019$). Such study may be carried out in patients with axial Ewing's sarcoma because it is these patients that presented with lower levels of TCR $\gamma\delta$ T-lymphocytes as compared to patients with limb lesions (7.6% vs. 12.9%, $p = 0.016$).

When discussing our findings concerning TCR $\gamma\delta$ T-lymphocytes in bone marrow from patients with rhabdomyosarcoma it seems reasonable to focus also on diagnostic aspects. Development of distant metastases is associated with a dramatic fall in $\gamma\delta$ T-cells. Therefore rhabdomyosarcoma patients with a considerable fall in this lymphocyte subset should be examined carefully for distant metastases. It is sometimes difficult to identify surely a tumor (in lung, liver etc.) as metastatic. Measuring of $\gamma\delta$ T-lymphocytes may help in such situations.

We were the first to study levels of costimulating and activating molecules both in control individuals and children with sarcoma. No definite conclusion could be made yet about the role of CD25⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD57⁺ and CD62L⁺ in pediatric rhabdomyosarcoma or ESFT due to too small patient population in our analysis and lacking information about activation markers. However, accurate detection of time of appearance of these markers on T-lymphocytes in the course of disease progression may be useful for study of their correlation with disease stage.

Conclusion

We established specific features of cell-mediated immunity, i.e. bone marrow lymphocyte subsets in patients with rhabdomyosarcoma and ESFT with respect to important risk factors.

Анализируя полученные результаты можно сделать заключение, что TCR $\gamma\delta$ -лимфоциты, обеспечивающие элиминацию злокачественных клеток вне контекста классических молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, осуществляют цитотоксическое действие в отношении опухоли и, по нашим данным, отражают напряжение иммунной системы при локализованных стадиях рабдомиосаркомы у детей. При наличии отдаленных метастазов отмечалось значительное снижение NK-клеток, что позволяет выявить NK-клеточный иммунодефицит при рабдомиосаркоме у детей.

Мы отметили снижение уровня Т-цитотоксических клеток при увеличении объема опухоли более 100 см³ или протяженности поражения длинной трубчатой кости более 8 см у пациентов при ОССЮ. У пациентов с поражением осевого скелета выявлено снижение уровня TCR $\gamma\delta$ -лимфоцитов по сравнению с группой больных, у которых поражены конечности.

Полученные данные свидетельствуют о возможности формирования групп пациентов для применения иммуномодулирующих препаратов.

Литература / Reference

1. Дейчман Г.И., Кашкина Л.М., Ключарева Т.Е. и др. Влияние клеток костного мозга, селезенки и перитонеального экссудата на метастазирование опухолевых клеток в легкие сибирских хомячков / Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1982. – Т. XCIV, №10. – С. 102–5.
1. Deichman G.I., Kashkina L.M., Kluchareva T.E. et al. Influence of bone marrow, spleen and peritoneal exudate cells on metastasing of tumor cells into lungs of hamsters /Buleteny experimentalnoi biologii I meditsini. - 1982. –V.XCIV, №10. – P. 102–5.
2. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике / М.: Триада-Х – 1998. – 104 с.
2. Kozinets G.I., Makarova V.A. Study of blood system in clinical practice /М.: Triada-X. -1998. -104 P.
3. Козловская Н.Г. Профилактика легочных метастазов остеосаркомы у собак путем предоперационной трансфузии костного мозга здоровых доноров: Автореферат дис. канд. биол. наук: 14.00.14. – М., 2002. – 21 с.

3. *Kozlovskaya N.G.* Prophylactics of osteosarcoma lung metastases in dogs by pre-operational transfusion of bone marrow from healthy dogs: autoreferat of PhD thesis. – M. – 2002. – 21 P.
4. *Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е. и др.* Лабораторная гематология / М.: Кафедра КЛД, 2006. – 214 с.
4. *Lugovskaya S.A., Morozova V.T., Pochtary M.E. et al.* Laboratory haematology /M.: Kafedra KLD. – 2006. – 214 P.
5. *Ahn Y. Weigel B., Verneris M.* Killing the killer: natural killer cell to treat Ewing's sarcoma / Clin. Cancer Res. – 2010. – Vol. 16 – P. 3819–21.
6. *Allison J.* The immunobiology of gamma delta + T cells / Semin Immunol. – 1990. – Vol. 2., №1 – P. 59–65
7. *Bonneville M., Scotet E.* Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors / Curr. Opin. Immunol. – 2006. – Vol.18, №5. – P. 539–46.
8. *Brinkrolf P., Landmeier S., Altwater B. et al.* A high proportion of bone marrow T cells with regulatory phenotype (CD4+CD25hiFoxP3+) in Ewing sarcoma patients is associated with metastatic diseases. / Int. J. Cancer. – 2009. – Vol. 125, №4. – P. 879–86.
9. *Caccamo N., Dieli F., Meraviglia S. et al.* T $\gamma\delta$ cell modulation in anticancer treatment / Cur. Cancer Drug Targets. – 2010. – V.10. – P. 27–36.
10. *Caccamo N., La Mendola C., Orlando V. et al.* Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells / Blood – 2011. – Vol. 118, №1. – P. 129–38.
11. *Chiplunkar S., Dha S., Wesch D. et al.* Gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects / Immunotherapy. – 2009. – Vol. 1, №4. – P. 663–78.
12. *Cho D., Shook D., Shimasak N. et al.* Cytotoxicity of activated natural killer cell against pediatric solid tumors / Clin. Cancer Res. – 2010. – Vol.16. – P. 3901–9.

13. *Esartia H.T., Deichman G.I., Kluchareva T.E. et al.* Allogeneic bone-marrow transfusion suppresses development of lung metastases in osteogenic sarcoma patients after radical surgery / *Int. J. Cancer.* – 1993. – Vol. 54. – P. 907–10.
14. *Fan Z., Yu P., Wang Y. et al.* NK-cell activation by LIGT triggers tumor-specific CD8 + T-cell immunity to reject established tumors / *Bllood.* – 2006. – Vol. 107, №4. – P. 1342–51.
15. *Galindo C., Tiebin L., Krasin M. et al.* Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma family of tumors / *Cancer.* – 2007. – V. 110, №2 – P. 375–8.
16. *Gober H.J., Kistowska M., Angman L. et al.* Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells / *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 197, №2. – P. 163–8.
17. *Groh V., Rhienehart R., Secrist H. et al.* Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ -T cells of MIC-A and MIC-B / *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P.6879–84.
18. *Hayday A., Roberts C., Ramsburg E.* Gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses / *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol.162. – P. 161–3.
19. *Li Z., Xu Q., Peng R. et al.* IFN- γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to $\gamma\delta$ T cell-mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway / *Int. Immunopharmacol.* – 2011. – Vol.11, №4. – P. 496–503.
20. *Meraviglia S., Caccamo N., Salerno A. et al.* Partial and ineffective activation of V gamma 9V delta 2 T cells by Mycobacterium tuberculosis-infected dendritic cells / *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, №3. – P. 1770–6.
21. *Risher M., Pscherer S., Duwe S.* Human gammadelta T cells as mediators of chimaericreceptor redirected antitumor immunity / *Br. J. Hematol.* – 2004. – Vol.126, №4. – P. 583–92.

22. *Serrano D., Monteiro J., Allen S. et al.* Clonal expansion within the CD4 + CD57 + and CD8 + CD57 + T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia / *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158, №3. – P. 1482–9
23. *Shanker A., Verdeil G., Buferne M. et al.* CD8 T cell help for innate anti-tumor immunity / *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 6651–6662.
24. *Viey E., Fromont G., Escudier B. et al.* Phosphostim-activated $\gamma\delta$ T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma / *J. Immunology.* – 2005. – Vol. 174. – P. 1338–1347.
25. *Walterhous D.* Optimal management strategies for rhabdomyosarcoma in children / *Pediatric Drags.* – 2007. – Vol. 9, №6. – P. 391–400.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



И.Г. Маркина, Н.Н. Тупицын, Л.В. Демидов

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (ЦОК)
ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ**

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Метастазирование – основная причина смертности больных со злокачественными новообразованиями, поскольку современные методы лечения, как правило, обеспечивая излечение от первичной опухоли, являются недостаточно эффективными для контроля за развитием метастазов. Метастазирование представляет собой сложный и динамический процесс, в результате которого опухолевые клетки диссеминируют из первичной опухоли к отдаленным органам и тканям [11]. Метастатический каскад предусматривает последовательную смену следующих этапов – инвазии опухолевых клеток, их миграции и интравазации в сосудистое русло, циркуляции в кровотоке в составе клеточных кластеров, экстравазации в местах вторичного метастазирования, стабилизации в специфическом микроокружении и собственно реализации их в макроскопические метастазы [17; 24; 46].

Принципиальная возможность метастазирования появляется уже с началом ангиогенеза в опухоли. Ранее считалось, что ангиогенез начинается после того, как количество опухолевых клеток превысит 10^3 , а диаметр опухоли составит 0,5 мм. В настоящее время установлено, что процесс формирования в опухоли сосудов может начинаться ещё раньше – при числе клеток равном 100–200, и с этого момента злокачественные клетки уже могут попадать в кровяное русло.

Судьба этих клеток различна. Около 85% из них погибают в течение первых 5 минут, попадая в «капиллярную ловушку», и превращаются в апоптотические тельца в результате гемодинамического стресса или же вследствие взаимодействия с клетками иммунной системы [21; 53]. Выжившие в кровотоке клетки в результате активизации антиапоптотических программ меняют свои гемодинамические и метаболические свойства [53] и представляют собой гетерогенную популяцию, которую ожидает три варианта событий.

Большинство опухолевых клеток демонстрируют «феномен коллективной миграции», формируя комплексы с тромбоцитами и между собой, и образуют тем самым циркулирующие опухолевые микроэмболы. Опухолевые микроэмболы обладают высоким пролиферативным потенциалом, но они не могут покидать просвет сосуда путем экстравазации и приводят к опухолевой эмболии и к разрыву стенок капилляров.

Единичные или циркулирующие опухолевые клетки не контактируют со стенками сосудов и лимфатических синусов и не пенетрируют их. Часть этих клеток колонизирует отдаленные органы и ткани с последующим развитием гематогенных метастазов.

I.G. Markina, N.N. Tupitsyn, L.V. Demidov

**CLINICAL SIGNIFICANCE
OF CIRCULATING TUMOR CELLS
IN CUTANEOUS MELANOMA**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

Metastatic disease is the main cause of cancer death since current treatments while providing cure of primary tumors as a rule fail to control metastasis. Metastasis is a very complicated and dynamic process resulting in dissemination of the primary to distant sites [11]. Metastatic cascade involves the following sequential stages: tumor cell invasion, migration and intravasation into and circulation in blood stream as cell clusters, extravasation in sites of secondary metastasis, stabilization in specific microenvironment and formation of micrometastases [17; 24; 46].

Principal potential for metastasis is present already at the beginning of tumor angiogenesis. It was thought earlier that angiogenesis started when the number of tumor cells became greater than 10^3 and tumor diameter is 0.5 mm. However it is known today that generation of vessels in the tumor may start earlier, i.e. when the number of cells reaching 100 or 200, and from this moment malignant cells may penetrate into blood stream.

These cells have different fate. About 85% of them die within the first 5 minutes after getting into the so called capillary trap where they turn into apoptotic bodies as a result of hemodynamic stress or interaction with immunity cells [21; 53]. While surviving cells change their hemodynamic and metabolic properties as a result of activation of antiapoptotic programs [53] and form a heterogeneous population with three types of events to follow.

Most tumor cells demonstrate a «collective migration phenomenon» by forming complexes with platelets and between themselves resulting in development of circulating tumor microemboli. The tumor microemboli have a high proliferative potential, but cannot leave the vascular lumen by extravasation and cause tumor embolism and disruption of capillary walls.

Solitary or circulating tumor cells (CTC) do not contact with or penetrate from vascular or lymphatic walls. A part of these cells colonize distant sites and further develop into hematogenic metastases.

Другие клетки, обогащенные во время циркуляции цитокинами и факторами роста, возвращаются в первичную опухоль, т.е. метастазируют «в себя» и тем самым стимулируют рост первичной опухоли. И, наконец, некоторые ЦОК, перейдя в фазу « метастатического покоя» (G_{0-1} клеточного цикла), могут циркулировать в кровотоке в течение длительного времени, сохранив при этом способность при определенных условиях запускать механизмы, приводящие к появлению истинного метастазирования. Так, например, солитарные злокачественные клетки нередко обнаруживаются в крови больных раком молочной железы спустя 5; 10 и более лет после хирургического лечения, и при этом у 20% женщин выявляется прогрессирование в сроки от 7 до 25 лет после радикальной мастэктомии [17]. Поздние метастатические рецидивы после «радикального излечения» задокументированы при раке простаты, раке щитовидной железы, почечных карциномах, а также меланоме [63]. В литературе описан уникальный случай гематогенного распространения метастазов увеальной меланомы через 35 лет после удаления первичной опухоли [56].

В экспериментальных моделях было установлено, что ежедневно из первичной опухоли могут отделяться и поступать в кровоток от нескольких тысяч до 4 миллионов клеток на 1 г ткани [10; 20]. Из всей массы ЦОК только 1 клетка из 40 может достигать преметастатической ниши, и не более 0,01% циркулирующих опухолевых клеток дают начало метастазам [69]. Таким образом, неэффективный с точки зрения биологии процесс определяет прогрессию онкологических заболеваний, приводящую, в конечном итоге, к смерти от метастатического процесса.

Впервые ЦОК были обнаружены в крови больного с прогрессирующим метастатическим раком в 1869 году Thomas Ashworth, который предположил, что «...клетки, похожие на клоны клеток из первичной опухоли, будучи выявленными в периферической крови, могут проливать некоторый свет на способ происхождения множественных опухолей, существующих в том же самом человеке». Тщательное сравнение морфологии циркулирующих клеток и клеток из различных метастатических очагов, привели австралийского патологоанатома к выводу, что «одно можно сказать наверняка, что если они (ЦОК) произошли из одной существующей структуры рака, они, должно быть, прошли через большую часть кровеносной системы» [5].

Опухолевые клетки циркулируют в кровотоке в чрезвычайно низких концентрациях. В 1 мл цельной крови единичные раковые клетки окружены примерно 10 миллионами лейкоцитов и 5 миллиардами эритроцитов [40; 67], поэтому их выделение и визуализация представляет собой крайне сложную задачу. До недавнего времени поиск ЦОК осуществлялся только традиционными методами световой микроскопии, которые в большинстве случаев оказывались неэффективными.

Исследования по выявлению ЦОК при различных злокачественных новообразованиях ведутся чуть более 20 лет.

Other cells enriched with cytokines and growth factors during the circulation period return into the primary tumor, that is metastasize into themselves and thus enhance growth of the primary. And finally some CTC enter a phase of metastatic dormancy (G0-G1 phase of cell cycle) and can circulate in the blood stream for a long time preserving the ability to trigger mechanisms leading to true metastasis under certain conditions. For instance, solitary malignant cells are often found in blood of breast cancer patients at 5, 10 and more years after surgical treatment and 20% of the women develop progressive disease within 7 to 25 years after curative mastectomy [17]. Late metastatic recurrence after curative treatment is reported in prostate, thyroid, renal cancer and melanoma [63]. There is a unique case report of hematogenic metastasis of uveal melanoma at 35 years following removal of the primary tumor [56].

It was shown in experimental models that from several thousand to 4 million cells per 1 g tissue may separate daily from the primary tumor and penetrate into blood stream [10; 20]. Only 1 of 40 CTC may reach a premetastatic niche and not more than 0.01% of CTC give rise to metastasis [69]. Thus the biologically ineffective process plays a definitive role in progression of cancer eventually leading to death from metastatic disease.

The CTC were first found in blood of a patient with progressive cancer in 1869 by Thomas Ashworth who suggested that cells similar to cell clones from the primary might cast some light on the way of generation of coexisting multiple tumors in a single person. Careful comparison of morphological features of the CTC and cells from various metastatic lesions led the Australian pathologist to the conclusion that one thing might be stated for sure that if the CTC had originated from a single existing cancer lesion they must have passed a most portion of the circulation [5].

Tumor cell circulate at an extremely low concentration. Solitary cancer cells are surrounded by about 10 million leukocytes and 5 billion erythrocytes in 1 ml of whole blood [40; 67], therefore it is very difficult to detect and visualize them. Until recently CTC finding was made only by common light microscopy which was inefficient in most cases.

Study involving CTC detection in various cancer types have been carried out for a little more than two decades.

Совершенствование и внедрение в практику высокочувствительных молекулярно-биологических технологий детекции опухолевых клеток, которые обычно являются комбинацией процедур обогащения и процедур обнаружения, сделало возможным не только определять ЦОК в периферической крови и сделать их предметом количественных измерений, но и при их сохранении использовать в дальнейшем для морфологического, иммунофенотипического и молекулярного анализа [2]. Сегодня уже не вызывает сомнений, что ЦОК являются ключом к пониманию биологии метастазов и биологическим маркером, позволяющим неинвазивно изучать эволюцию опухоли во время ее прогрессии.

ЦОК были выявлены при солидных опухолях различных локализаций, в частности, таких как рак молочной железы [59], рак простаты [15], колоректальный рак [44] и мелкоклеточный рак легкого [60]. Меланома, как и многие другие злокачественные новообразования, является системным заболеванием, и даже при клинически ранних стадиях высока вероятность скрытой диссеминации опухолевого процесса.

Меланома кожи является одним из самых агрессивных, непредсказуемых и наиболее трудно поддающихся лечению злокачественных новообразований. Статистические данные последних лет свидетельствуют о неуклонном и интенсивном росте заболеваемости меланомой в различных странах. В Российской Федерации в 2010 году было выявлено 8416 новых случаев меланомы кожи [1], абсолютный прирост заболеваемости по сравнению с 2005 годом составил 11,7% у мужчин и 19,2% у женщин [1], что является одним из самых высоких среди всех онкологических заболеваний.

Составляя около 3% всех диагностированных случаев злокачественных новообразований кожи, меланома, обладая высоким метастатическим потенциалом уже на ранних стадиях, становится причиной более 80% смертельных исходов, приходящихся на данную группу опухолей кожи [37]. В структуре смертности за 2010 год от диссеминации меланомы умерло около 3500 человек [1].

На сегодняшний день первоочередной прогноз и лечебную тактику при меланоме кожи оценивают с помощью классификации TNM (AGCC/UICC, 7-е издание, 2009 г.) [12], которая включает в себя наиболее важные прогностические факторы – толщину опухоли, уровень инвазии, изъязвление, митотический индекс, наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы и их количество и/или отдаленные метастазы. Дополнительные факторы прогноза, такие как пол, возраст, уровни ЛДГ и S100, анатомическая локализация первичной опухоли и метастазов, нерадикальность хирургического лечения и молекулярные особенности первичной опухоли, оказывают незначительное влияние на планы лечения [42–44].

При IA стадии 5-летняя выживаемость приближается к 95%, а вероятность пережить 10-летний рубеж составляет только 85% [7]. Из этого следует, что лечение меланомы кожи даже на самой ранней стадии не дает 100% излечения, и более 15% больных погибают от прогрессирования болезни.

Improvement and practical application of high-sensitivity molecular biological assays to detect tumor cells mainly as combinations of enrichment and detection procedures allowed not only detection and quantification of CTC in peripheral blood, but also their preservation with morphological, immunophenotypic and molecular analysis to follow [2]. It is no doubt today that CTC are a key to understanding biology of metastasis and a biological marker permitting non-invasive study of tumor evolution during progression.

CTC were found in cases with solid tumors of various sites, in particular breast [59], prostate [15], colorectal [44] cancers and non small cell lung cancer [60]. Like other malignant neoplasms melanoma is a systemic disease with a high probability to disseminate even at clinically early stage.

Cutaneous melanoma is one of the most aggressive, unpredictable and difficult to treat malignant tumors. Melanoma incidence is increasingly rises worldwide over recent years. In 2010 in the Russian Federation there were 8416 new cases of cutaneous melanoma [1]; as compared to 2005 the absolute rise in the incidence was 11.7% in men and 19.2% in women [1] which was one the highest rates among all cancer types.

Accounting for about 3% of all diagnosed cutaneous cancers melanoma with its high metastatic potential already at early stages is a cause of more than 80% of all deaths due to skin cancer [37]. In 2010 about 3500 patients died from melanoma dissemination in Russia [1].

Primary prognosis and treatment strategy in cutaneous melanoma are currently determined according to TNM (AGCC/UICC, 7th edition, 2009) classification [12] including most important prognostic factors such as tumor thickness, level of invasion, ulceration, mitotic index, the presence and number of metastases to regional lymph nodes and/or distant sites. Additional factors such as gender, age, LDH and S100 levels, anatomic site of the primary and metastases, non-curative surgical treatment and molecular features of the primary exert but marginal effect on the treatment plan [42; 43; 44].

The 5-year survival in stage IA is close to 95%, while only 85% of patients survive 10 years [7]. It follows then that the treatment for cutaneous melanoma even at the earliest stage fails to ensure a 100% cure and more than 15% of the patients die from progressive disease.

Меланома кожи толщиной менее 2 мм считается потенциально излечимым заболеванием в результате удаления первичной опухоли, но до 44% из этих пациентов умирают от метастатических поражений различных органов [39; 51].

Несмотря на совершенствование адъювантного лечения меланомы, приблизительно у 50–75% больных, относящихся к группам промежуточного (IIB и IIIA стадии) или высокого (IIC, IIIB и IIIC стадии) риска прогрессирования, метастазы развиваются в первые 2 года [7], причем у 40% из них обнаруживается поражение внутренних органов без поражения регионарных зон.

В большинстве случаев причиной неудовлетворительных результатов лечения, несмотря на радикально удаленную опухоль, частично выступает раннее поступление опухолевых клеток в периферическую кровь. Назначение клиницистами адъювантной терапии, ставящей перед собой цель предотвратить развитие метастазов, основывается сегодня на статистическом риске метастазирования без четкого знания того, имел ли место выход опухолевых клеток в периферическую кровь, и произошла ли их колонизация в отдаленных органах и тканях.

При обнаружении метастазов шансы 5-летней выживаемости резко снижаются и составляют не более 5% [6]. Логичной лечебной тактикой в этом случае является как можно более раннее начало лечения, поскольку на любую злокачественную опухоль легче воздействовать при ее минимальном размере. Решение проблемы можно было бы найти в выявлении определенных маркеров опухолевой прогрессии, влияние которых на прогноз в ряде случаев было бы сопоставимо со стадией, что может стать эффективным дополнением к системе стадирования по TNM. В связи с этим имеющиеся в мировой литературе немногочисленные публикации, свидетельствующие о попытках выявить и охарактеризовать ЦОК в крови больных меланомой кожи, представляют большой клинический интерес в плане возможной стратификации пациентов по группам риска и назначения терапии в зависимости от индивидуальной степени риска в каждом конкретном случае.

Первое сообщение о ЦОК при меланоме было опубликовано в начале 1990-х гг. В. Smith с соавторами при помощи ОТ-ПЦР выделили из периферической крови больных меланомой транскрипт гена тирозиназы. Высокая экспрессия белкового продукта данного гена, играющего ключевую роль в биосинтезе меланина, определяется только в меланоцитах, злокачественных клетках меланомы и шванновских клетках. Поскольку гемопоэтические клетки не экспрессируют данный фермент, а меланоциты и клетки меланомы в норме не циркулируют в сосудистом русле, обнаружение транскрипта гена тирозиназы в периферической крови пациентов исследователи посчитали косвенным признаком циркулирующих клеток меланомы [58].

Несколько позже ряд других исследовательских групп подтвердили доказательства наличия ЦОК при меланоме кожи, однако ни в одном из этих наблюдений не было продемонстрировано влияния молекулярного антигена тирозиназы на прогноз пациентов.

Cutaneous melanoma less than 2 mm thick is thought to be potentially curable by removal of the primary, however up to 44% of such patients die from metastatic lesions of various sites [39; 51].

In spite of improvement in adjuvant treatment for melanoma about 50 to 75% of patients at intermediate (stage IIB and IIIA) and high (stage IIC, IIIB and IIIC) risk of progression develop metastases within the first two years [7] with 40% presenting with internal lesions without regional involvement.

In most cases the poor outcome in spite of curative primary tumor dissection is in part due to penetration of tumor cells into peripheral blood. Prescription of adjuvant therapy aimed to prevent metastasis development is currently based on statistical risk of metastasis without clear knowledge whether tumor cells have penetrated into peripheral blood and colonized distant sites.

In metastatic disease the 5-year survival decreases dramatically and is not more than 5% [6]. In this case it seems logical to start treatment as early as possible since the treatment effect on any cancer is greater if the tumor size is minimal. A solution of the problem may be detection of certain markers of disease progression whose prognostic value may be compatible with disease stage in some cases which might be an effective supplement to the TNM staging. It is therefore of much clinical interest to analyze the few publications describing attempts to detect and characterize CTC in blood of patients with cutaneous melanoma that would help stratify patients by risk groups and prescribe therapy with respect to individual risk in each individual case.

The first report on CTC in melanoma was published in early 1990s. B. Smith et al. used RT-PCR to detect tyrosinase gene transcript in peripheral blood from melanoma patients. High expression of protein product of the gene playing a key role in melanin biosynthesis is detectable only on melanocytes, malignant melanoma cells and Schwann's cells. Since hemopoietic cells do not express this enzyme and melanocytes and melanoma cells do not circulate in normal individuals, the investigators believed that the presence of tyrosinase gene transcript in peripheral blood from melanoma patients was an indirect sign of circulating melanoma cells [58].

Later some other study groups confirmed the presence of CTC in cases with cutaneous melanoma, however none of them could demonstrate relationship of the tyrosinase molecular antigen and prognosis.

В связи с тем, что использование одиночного маркера в ряде случаев может быть ненадежным из-за гетерогенности и вариабельности на уровне индивидуальной генной маркерной экспрессии, (особенно на поздних стадиях опухолевой прогрессии) различные группы ученых стали доказывать потенциальную применимость ОТ-ПЦР с другими генами, чье выражение ограничено меланоцитами и/или клетками меланомы. В настоящее время обнаружение ЦОК меланомы основывается на экспрессии генов тирозиназы, MART-1, Melan-A, MAGE-3, gp100, MIA, p97, MUC-18, GalNAc-T и PAX-3.

Следует признать, что ЦОК являются гетерогенной популяцией клеток. Поэтому в зависимости от применяемых для их поиска и анализа маркеров могут наблюдаться значительные колебания количества ЦОК даже при определении на одних и тех же стадиях заболевания. По данным разных исследований частота выявления опухолевых клеток в периферической крови у больных I стадией меланомы кожи составляет от 8 до 34%. При II стадии ЦОК обнаруживаются у 13-51% пациентов. При локорегионарных стадиях ЦОК были выявлены в 17–75% случаев. При метастатической меланоме процент выявления ЦОК колеблется от 45 до 86% [9; 35; 41; 62; 65].

Важной ступенью в понимании процесса метастазирования стало признание того факта, что ЦОК в периферической крови больных меланомой кожи являются показателем гематогенной диссеминации опухолевого процесса, и многими учеными расцениваются как фактор, приводящий к формированию метастазов.

S. Gkalpakiotis с соавт. в 2010 г. опубликовали данные о том, что у подавляющего большинства пациентов с меланомой кожи с локальными и локорегионарными стадиями с определяемыми ЦОК после радикального хирургического лечения развивается прогрессирование заболевания, причем, чаще всего, в течение первых двух лет после операции. В данном исследовании образцы периферической крови 65 пациентов со II–III стадиями заболевания были исследованы каждые 3 месяца течение 2 лет с момента операции методом мультипраймерной ОТ-ПЦР к мРНК Melan-A, gp 100, MAGE-3, MIA и тирозиназы. За время наблюдения 5 лет у 27(41,5%) отмечено прогрессирование заболевания. У 26 (96,3%) из этих пациентов в образцах крови выявлен как минимум один положительный маркер. Прогрессия на первом году наблюдения была зафиксирована в 40,7% случаев, на втором году – в 25,9%, на третьем – в 18,6%, на четвертом и пятом – и в 7,4% случаев соответственно [26].

Похожее исследование было проведено на базе нескольких зарубежных медицинских центров. C.R. Scoggins с соавт. [12] сопоставили наличие ЦОК и отдаленные результаты лечения больных меланомой IIА–IIС стадий. Были проанализированы образцы периферической крови 820 прооперированных больных меланомой кожи возрасте от 18 до 71 года с толщиной опухоли более 1 мм без гистологически доказанных регионарных метастазов. ЦОК определялись с помощью мультипраймерной ОТ-ПЦР к мРНК тирозиназы, MART-1, MAGE-3 и gp 100.

Since the use of a single marker is sometimes not reliable due to heterogeneity and variability of individual gene marker expression (especially at late stages of tumor progression), various study groups tried to prove potential feasibility of RT-PCR with other genes expressed only by melanocytes and/or melanoma cells. Currently CTC detection in melanoma is based on expression of tyrosinase gene, MART-1, Melan-A, MAGE-3, gp100, MIA, p97, MUC-18, GalNAc-T and PAX-3.

It should be noted that CTC are a heterogeneous cell population. Therefore a significant variability in CTC counts may be seen even at the same disease stage depending on markers used to find and analyze them. According to different investigators tumor cells are detected in peripheral blood from 8 to 34% of patients with stage I cutaneous melanoma. In stage II disease CTC are found in 13 to 51% of patients. Frequency of CTC detection in locoregional disease reaches 17 to 75%. In metastatic melanoma CTC are found in 45 to 86% of cases [9; 35; 41; 62; 65].

An important contribution to understanding of metastasis was the finding that CTC in peripheral blood from cutaneous melanoma patients were a marker of hematogenic tumor cell dissemination that was thought by many investigators a factor leading to metastasis.

In 2010 S. Gkalpakiotis et al. reported that an overwhelming majority of patients with local or locoregional cutaneous melanoma presenting with CTC after curative treatment developed progressive disease mainly within 2 years following surgery. In this report peripheral blood samples from 65 patients with stage II-III disease were analyzed every 3 months during 2 years from the time of surgery by multiprimer RT-PCR to Melan-A, gp 100, MAGE-3, MIA and tyrosinase mRNA. For a 5-year follow-up 27 (41.5%) patients developed progressive disease. Twenty six (96.3%) of these cases had at least one positive marker in their blood. Disease progression was reported in 40.7% within 1 year, in 25.9% within the 2nd, in 18.6% within the 3rd and in 7.4% each within the 4th and 5th years respectively [26].

Several health centers conducted similar studies. C.R. Scoggins et al. [12] compared the presence of CTC and follow-up outcomes in patients with stage IIA-IIC melanoma. The authors analyzed samples of peripheral blood from 820 melanoma patients aged 18 to 71 years with tumors more than 1 mm thick and free from histologically verified regional metastases undergoing surgical treatment. CTC detection was made using multiprimer RT-PCR to tyrosinase, MART-1, MAGE-3 and gp 100 mRNA.

У 115 (14%) из 820 пациентов в периферической крови были обнаружены ЦОК, причем у 99 из этих пациентов был выявлен только один из анализируемых транскриптов мРНК, а у 16 – комбинация из 2 и более маркеров. Не будучи прогностическим фактом общей выживаемости, наличие ЦОК было связано с более низкой безрецидивной выживаемостью. Вероятность пережить 6-летней рубеж без признаков прогрессирования болезни оказалась равной 85% при отсутствии ЦОК, 75% – при экспрессии одного маркера ЦОК и только 56% при экспрессии более 2 маркеров мРНК ($p = 0,0062$).

В работе P. Arenberger с соавт. [4] у 65 пациентов с IIВ–III стадией меланомы кожи после радикального хирургического лечения образцы клеток периферической крови исследовались каждые 3 мес с использованием мультипраймерной ОТ-ПЦР к мРНК Melan-A, gp100, MAGE-3, MIA и тирозиназы с целью выявления и последующей оценки этих маркеров в динамике. За время наблюдения 18 мес. у 18 (27%) больных было выявлено прогрессирование заболевания. В период от 0 до 9 мес. до появления клинических признаков возврата болезни у всех этих пациентов было зафиксировано обнаружение маркера/маркеров в образцах периферической крови, причем MAGE-3 оказался самым чувствительным маркером прогрессии. У пациентов с прогрессированием авторы наблюдали одномоментное обнаружение трех транскриптов в 39%, двух – в 28% и одного – в 33% случаев соответственно. Опираясь на полученные данные, авторы исследования считают, что динамика изменения молекулярных маркеров меланомы в периферической крови может считаться прогностическим фактором и быть полезным для раннего обнаружения метастатической прогрессии.

P. Rutkowski с соавт. [54] провели исследование, направленное на обнаружение ЦОК в лимфатических сосудах и периферической крови больных меланомой кожи с использованием ОТ-ПЦР к мРНК тирозиназы, MART1 и MAGE. Образцы лимфы и крови были взяты у 107 пациентов с III стадией заболевания через 24 часа после лимфаденэктомии. Наличие хотя бы одного положительного маркера из трех расценивалось как обнаружение ЦОК. У 40 больных (37,4%) были выявлены ЦОК в лимфатической жидкости, у 28 пациентов (26,2%) – в периферической крови. При медиане наблюдения 24 мес. авторы не нашли каких бы то ни было существенных различий во времени до прогрессирования и общей выживаемости у больных с отсутствием и наличием ЦОК в периферической крови. Однако, обнаружение как минимум одного мРНК маркера ЦОК в лимфатической жидкости коррелировало с более короткой БРВ больных (9,9 против 15,3 мес., $p = 0,04$). Вероятность пережить два года без признаков болезни составила 18,9% для пациентов с наличием ЦОК и 42,1% при их отсутствии.

Цель исследования A. Fusi с соавт. [22] состояла в оценке прогностической значимости динамики ЦОК в группе больных меланомой кожи III стадии в процессе адъювантной иммунотерапии PEG-ИНФ и в группе наблюдения, зарегистрированных в исследовании EORTC 18991.

CTC were found in peripheral blood from 115 (14%) of 820 patients, of whom 99 had only one of the mRNA transcripts analyzed and 16 had a combination of two or more markers. The presence of CTC was not related to overall survival but was predictive of a shorter disease-free survival. The chance to survive 6 years progression-free was 85% in cases without CTC vs. 75% with expression of one marker and 56% in the presence of more than 2 markers ($p = 0.0062$).

P. Arenberger et al. [4] analyzed peripheral blood samples from 65 patients with stage IIB-III cutaneous melanoma after curative surgery using multiprimer RT-PCR to Melan-A, gp 100, MAGE-3, MIA and tyrosinase mRNA every 3 months to detect and assess changes in the markers. Eighteen (27%) patients developed progressive disease within 18 months of follow-up. All these patients presented with expression of a marker/markers in peripheral blood within 0 to 9 months prior to appearance of clinical signs of disease recurrence, with MAGE-3 being the most sensitive marker of progression. Among the patients with progressive disease simultaneous expression of three transcripts was found in 39%, of two markers in 28% and of one marker in 33% of cases. Basing on these findings the authors concluded that changes in molecular markers of melanoma in peripheral blood might be a prognostic factor for early detection of metastatic progression.

P. Rutkowski et al. [54] detected CTC in lymphatics and peripheral blood from patients with cutaneous melanoma using RT-PCR to tyrosinase, MART1 and MAGE mRNA. Samples of lymph and blood were collected from 107 patients with stage III disease after 24 h following lymphadenectomy. Cases with at least one marker were considered CTC positive. Forty (37.4%) patients had CTC in lymphatic fluid and 28 patients (26.2%) had CTC in peripheral blood. At a median follow-up of 24 months the authors failed to find any significant differences in time to progression or overall survival between patients with vs. without CTC in their peripheral blood. However, expression of at least one CTC marker in lymphatic fluid correlated with a shorter disease-free survival (9.9 vs. 15.3 months, $p = 0.04$). The chance to survive 2 years disease-free was 18.9% for CTC positive vs. 42.1% for CTC-negative cases.

A. Fusi et al. [22] assessed prognostic significance of changes in CTC content in patients with stage III cutaneous melanoma during adjuvant immunotherapy with PEG-interferon and in an observation group of EORTC 18991 study.

Образцы периферической крови были исследованы на генные маркеры Тирозиназу и Mart-1/Melan-A каждые 6 мес. в течение 5 лет. У 109 (36,5%) из 299 пациентов была выявлена экспрессия по крайней мере одного транскрипта или во время рандомизации ($n = 17$) или в динамике ($n = 92$). Регрессионный анализ Сох указал на достоверно более высокий риск развития метастазирования для больных с наличием транскриптов в образцах периферической крови ($p < 0,001$). Тем не менее, авторы полагают, что ОТ-ПЦР может быть использована для оценки профилактического лечения, поскольку полученные результаты были сопоставимы в обеих контрольных группах.

Напротив, R.A. Wascher с соавт. [66] считают, что определение ЦОК в процессе адъювантной терапии может быть полезным для идентификации пациентов с потенциально агрессивным течением заболевания с целью коррекции дальнейшего лечения. Группа ученых последовательно изучала образцы периферической крови 30 больных меланомой кожи III стадии, которым проводилась вакциноterapia аллогенными клетками (M10, M24 и M101) в дозе 24×10^6 клеток (8×10^6 клеток каждой клеточной линии) после радикального хирургического вмешательства. Забор крови для выявления ЦОК производился непосредственно перед началом вакцинотерапии и далее на 8 и 16 неделях лечения. Для выявления ЦОК использовалась мультипраймерная ОТ-ПЦР к мРНК тирозиназы, MART-1 и MAGE-A.

Среди этих 30 пациентов, включенных в данное исследование, у 19 (63%) было выявлено прогрессирование заболевания. У 10 (53%) из 19 пациентов были выявлены ЦОК с экспрессией одного и более транскрипта мРНК как минимум в одном из трех последовательно взятых образцов крови. Все 10 (100%) пациентов имели положительный маркер/маркеры на 8 и/или 16 недель лечения и только 2 больных перед началом вакцинации. Лишь только у одного из 11 пациентов в группе без прогрессирования в периферической крови была обнаружена меланомная мРНК (MART-1) перед началом лечения, которая не была выявлена при последующем анализе на 8 и 16 недель лечения. Однофакторный анализ показал достоверную корреляцию между наличием ЦОК в периферической крови и безрецидивной выживаемостью. Медиана времени до прогрессирования оказалось равной 11 мес. для ЦОК⁺ и 74 мес. для ЦОК⁻ ($p = 0,01$). В многофакторном регрессионном анализе с использованием модели Сох наличие по крайней мере одного маркера опухолевой мРНК в любом образце периферической крови было связано с увеличением риска прогрессирования более чем в 3 раза ($p = 0,02$).

В двух похожих работах S. Hoshimoto с соавт. [29; 30] ЦОК были исследованы у 331 больного меланомой III стадией после лимфаденэктомии и 214 больных меланомой IV стадией, радикально оперированных по поводу отдаленных метастазов, с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР к мРНК MART-1, MAGE-A3 и GalNAc-T.

Peripheral blood samples were analyzed for gene markers tyrosinase and Mart-1/Melan-A every 6 months for 5 years. Expression of at least one marker at randomization ($n = 17$) and on study ($n = 92$) was found in 109 (36.5%) of 299 patients. Cox regression analysis demonstrated a significantly higher risk of metastasis for patients with transcript-positive peripheral blood ($p < 0.001$). However, the authors believed that RT-PCR could be used to assess prophylactic therapy because compatible results were obtained in both control groups.

R.A. Wascher et al. [66] consider CTC detection during adjuvant therapy useful for identification of patients at risk of aggressive disease course to correct further treatment. The investigators studied samples of peripheral blood from 30 patients with stage III cutaneous melanoma receiving vaccine therapy with allogenic cells (M10, M24 and M101) at 24×10^6 cells (8×10^6 cells per line) after curative surgery. Blood was harvested for CTC detection immediately before vaccine therapy and further at weeks 8 and 16 of treatment. Multiprimer RT-PCR to tyrosinase, MART-1 and MAGE-A mRNA was used for CTC detection.

Nineteen (63%) of the 30 patients had progressive disease. Ten (53%) of the 19 patients demonstrated expression of one or more transcripts at least in one of three sequential samples. Positive marker(s) were found in all the 10 (100%) patients at week 8 and/or 16 of treatment and only in 2 patients before vaccination start. Only 1 of 11 patients free from disease progression had melanoma mRNA (Mart-1) before treatment which was not detected at further tests at week 8 or 16 of treatment. Univariate analysis demonstrated a significant correlation between the presence of CTC in peripheral blood and disease-free survival. Median time to progression was 11 months for CTC-positive vs. 74 months for CTC negative cases ($p = 0.01$). Cox regression analysis showed that the presence of at least one marker of tumor mRNA in any blood sample was associated with a more than 3-fold increase in the risk of progression ($p = 0.02$). S. Hoshimoto et al. conducted two similar studies [29; 30] to assess CTC in 331 patients with stage III melanoma after lymphadenectomy and 214 patients with stage IV melanoma after curative surgery for distant metastases using multiplex RT-PCR to MART-1, MAGE-A3 and GalNAc-T mRNA.

После хирургического лечения в рамках II фазы клинических испытаний пациенты получали либо противомеланомную вакцину Ganvaxin в комбинации с БЦЖ, либо БЦЖ. На момент начала лечения биомаркер(ы) ЦОК (≥ 1) были обнаружены периферической крови в 17,5% случаев при III стадии и у 54% пациентов, имеющих IV стадию заболевания. По результатам многофакторного анализа для больных локорегионарными стадиями выявление 2 и более транскриптов было связано с сокращением времени до прогрессирования ($p = 0,046$). Для пациентов с IV стадией заболевания выявление ЦОК (вне зависимости от количества маркеров) оказывало негативное влияние на показатели безрецидивной ($p = 0,002$) и общей ($p = 0,0012$). За 22 мес. наблюдения у 71% больных IV стадией было выявлено дальнейшее прогрессирование заболевания, а 44% пациентов умерли от метастатической болезни. Авторы считают, что выделение группы больных с ЦОК необходимо для последующего использования у них более агрессивной дополнительной терапии, а также важно для стратификации пациентов в клинических испытаниях новых противоопухолевых препаратов.

Углубленное исследование, направленное на изучение прогноза в зависимости от ЦОК у больных, радикально прооперированных по поводу первичной опухоли и/или метастазов, было проведено D.S. Noon с соавт. [28]. Образцы периферической крови 7 (15,2%) пациентов со II стадией, 29 (63%) – с III и 10 (21,8%) – с IV стадией заболевания были обследованы с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР. Оценивалась экспрессия мРНК к тирозиназе, MAGE-3, MUC-18 и p97, которая была обнаружена в периферической крови у 24; 10; 41 и 19 больных соответственно. Выявление в ЦОК экспрессии одного и двух маркеров наблюдалась в 28% случаев, трех – в 37%, а четырех – в 2% наблюдений. Только у 3 больных (6%) не было обнаружено ЦОК. Авторы не отмечают никаких существенных различий между полом, возрастом, локализацией, толщиной первичной опухоли по Breslow, уровнем инвазии по Кларку и экспрессией отдельных транскриптов. Однако, количество ЦОК, содержащих мРНК тирозиназы и MAGE-3 прогрессивно увеличивалось параллельно со стадией заболевания ($p = 0,018$ и $p = 0,033$, соответственно). Экспрессия в ЦОК более 2 различных мРНК достоверно коррелировало с более высокой частотой метастазирования в отдаленные органы ($p = 0,02$). Прогрессирование было выявлено у 7 (25%) из 28 больных с экспрессией от 0 до 2 маркеров и у 10 (56%) из 18 больных при выявлении 3–4 транскриптов ($p = 0,024$).

В данном исследовании авторы также предприняли попытку создания модели индивидуального риска прогрессирования для пациентов, прооперированных по поводу меланомы. Все пациенты были стратифицированы на 3 группы – низкого (II стадия с экспрессией не более двух маркерных мРНК), промежуточного (II стадия с экспрессией более 2 маркеров или же с III–IV стадиями с экспрессией не более 2 маркеров) и высокого (III–IV стадии и экспрессией более 2 маркеров) риска.

The patients received antimelanoma vaccine *Ganvaxin* in combination with BCG or BCG alone after surgical treatment in a phase II clinical study. At treatment start CTC biomarker(s) (≥ 1) were found in peripheral blood from 17.5% of patients with stage III and in 54% of patients with stage IV disease. Multivariate analysis demonstrated that the presence of 2 or more transcripts in patients with locoregional stage was associated with a shorter time to progression ($p = 0.046$). For patients with stage IV disease detection of CTC (irrespective of the number of the markers) was a poor prognosis factor as to disease-free ($p = 0.002$) and overall ($p = 0.0012$) survival. Within a follow-up of 22 months 71% of stage IV patients developed progressive disease and 44% died from metastatic disease. The authors concluded that CTC detection was necessary to identify candidates for a more aggressive therapy as well as to stratify patients in clinical trials of new anticancer agents.

D.S. Hoon et al. [28] conducted in-depth study of correlation between prognosis and the presence of CTC in patients undergoing curative surgery for the primary and/or metastatic lesions. Samples of peripheral blood from 7 (15.2%) stage II, 29 (63%) stage III and 10 (21.8%) stage IV patients were analyzed by multiplex RT-PCR. Expression of mRNA to tyrosinase, MAGE-3, MUC-18 and p97 was found in 24, 10, 41 and 19 patients respectively. Expression of one or two markers was detected in 28%, three markers in 37%, four markers in 2% of cases. Only 3 (6%) patients were free from CTC. There were no significant differences with respect to gender, age, disease site, Breslow's depth, Clark's level of invasion and expression of individual markers. However, content of CTC expressing tyrosinase and MAGE-3 mRNA was increasing progressively in parallel with disease stage ($p = 0.018$ and $p = 0.033$ respectively). Expression of more than 2 different mRNAs correlated significantly with a higher frequency of distant metastasis ($p = 0.02$). Progression was reported in 7 (25%) of 28 patients with expression of 0 to 2 markers and in 10 (56%) of 18 patients with expression of 3 or 4 transcripts ($p = 0.024$).

The authors also attempted to develop an individual progression risk model for patients undergoing surgery for melanoma. All patients were stratified into three groups of low (stage II with expression of not more than 2 marker mRNA), intermediate (stage II with expression of more than 2 markers or stage III-IV with expression of not more than 2 markers) and high (stage III-IV with expression of more than 2 markers) risk.

За период наблюдения 60 мес. признаков прогрессирования не было выявлено ни у одного пациента из группы низкого риска. В группе промежуточного риска прогрессирование было обнаружено у 8 (32%) из 25 больных, а в группе высокого риска – у 9 (66,2%) из 16 пациентов ($p = 0,037$). Полученные результаты свидетельствуют, что транскрипционный статус является существенным фактором неблагоприятного прогноза, который мог бы влиять на рекомендации адъювантной терапии.

Выявление метастазов меланомы в региональные лимфатические узлы является фактором неблагоприятного прогноза. Эти пациенты являются кандидатами на вспомогательную терапию из-за высокого риска рецидива болезни после радикального хирургического вмешательства. Однако до настоящего времени никакое исследование не может точно предсказать выживание пациентов, получающих неoadъювантную терапию при меланоме кожи локорегионарных стадий. Цель многоцентрового проспективного исследования К. Коуанаги с соавт. [36] состояла в том, чтобы изучить динамику изменения ЦОК в периферической крови больных меланомой кожи III стадии в процессе проведения комбинированного лечения. Лечебная программа включала 2 курса неoadъювантной биохимиотерапии по схеме CVD в стандартных дозах с добавлением ИЛ-2 в дозе 9 млн МЕ/м² в/в в 1–4 дни и рекомбинантный ИНФ- α в дозе 5 млн МЕ/м² п/к в 1–5 дни лечения, радикальную лимфаденэктомию, после которой проводилось еще 2 курса адъювантной биохимиотерапии в том же режиме, которая начиналась в течение 6 нед. после хирургического вмешательства.

63 пациентам были проанализированы образцы периферической крови с использованием мультипраймерной ОТ-ПЦР для выявления мРНК MART-1, GalNAc-T, PAX-3 и MAGE-A3 до начала химиотерапии, перед и после хирургического вмешательства и после окончания химиотерапии с приблизительным интервалом между заборами 6 нед. В момент диагностики не было отмечено корреляций частоты выявления ЦОК с полом, возрастом, локализацией, толщиной опухоли Breslow, изъязвлением, pT и pN стадиями, стадиями по TNM (IIIA, IIIB и IIIC) и предыдущим статусом лечения. У 19 (30%) из 63 пациентов были выявлены метастазы в отдаленные органы. 44 (70%) больных оставались без признаков прогрессирования в сроки от 4,6 до 52,4 месяцев. При медиане наблюдения 30,5 мес. выявление ЦОК после окончания лечения достоверно коррелировало почти с 4-кратным повышением риска прогрессирования и смерти от метастатической болезни (61% против 15%, $p = 0,001$).

В группе пациентов без признаков прогрессирования отмечалось существенное снижение уровня маркеров на различных этапах противоопухолевого лечения, вплоть до полного их исчезновения к его окончанию ($p < 0,0001$). В группе больных, у которых было отмечено прогрессирование, в процессе проведения лечения динамики изменения уровня транскриптов отмечено не было. 18 (95%) из 19 пациентов имели по крайней мере один маркер во время лечения.

Within a follow-up of 60 months none of patients from low risk group developed progressive disease. Progression was reported in 8 (32%) of 25 patients from intermediate and in 9 (66.2%) of 16 patients from high risk groups ($p = 0.037$). These findings demonstrate that transcription status is a significant factor of poor prognosis that may be useful for choice of adjuvant therapy regimen.

Regional lymph node metastases from melanoma are a poor prognosis factor. Patients with the regional involvement are candidates for adjuvant therapy due to a high risk of recurrence after curative surgical treatment. However there are no tests to predict survival of patients receiving adjuvant therapy for locoregional cutaneous melanoma. K. Koyanagi et al. [36] studied changes in CTC in peripheral blood from patients with stage III cutaneous melanoma on multimodality treatment. The treatment program consisted of 2 cycles of neoadjuvant biochemotherapy by CVD schedule at standard dosage with addition of interleukin-2 at 9 000 000 IU/m², i.v., days 1–4 and recombinant interferon-alpha at 5 000 000 IU/m², s.c., days 1–5, curative lymphadenectomy with 2 cycles of the same regimen of adjuvant biochemotherapy to follow starting at 6 weeks after surgery.

Peripheral blood from 63 patients was analyzed for MART-1, GalNAc-T, PAX-3 and MAGE-A3 mRNA by multiprimer RT-PCR before chemotherapy, before and after surgery and after chemotherapy at an interval of approximately 6 weeks between samplings. At diagnosis there was no correlation between frequency of CTC detection and gender, age, site, Breslow's depth, ulceration, pT or pN stages, TNM stages (IIIA, IIIB, IIIC) and previous treatment. Distant metastases were detected in 19 (30%) of 63 patients. Forty four (70%) remained progression-free for 4.6 to 52.4 months. At a median follow-up of 30.5 months CTC detection after treatment end correlated significantly with almost a 4-fold increase in the risk of progression and death from metastatic disease (61% vs. 15%, $p = 0.001$).

The progression-free patients demonstrated a significant decrease in the marker levels at various stages of anticancer treatment to complete disappearance by the treatment end ($p < 0.0001$). The patients developing progressive disease showed no changes in the marker levels during treatment. At least one marker was found during treatment in 18 (95%) of the 19 patients.

У пациентов, которые экспрессировали по крайней мере два маркера ЦОК, прогрессирование развилось в течение 7 мес. с момента начала лечения.

Показатели общей выживаемости статистически уменьшались, если после лечения в образцах периферической крови были выявлены ЦОК с экспрессией MART-1, GalNac-T и/или MAGE-A3 ($p = 0,007$, $p < 0,0001$ и $p = 0,009$ соответственно). Предполагаемая общая 2-летняя выживаемость составила $94,5\% \pm 3,8\%$ для пациентов с отсутствием ЦОК после окончания лечения, $80,0\% \pm 12,7\%$ – для пациентов с одним положительным маркером и $40,0\% \pm 21,9\%$ – для пациентов с 2 и более положительными транскриптами в ЦОК ($p < 0,0001$). Результаты, полученные в ходе этой работы, наглядно демонстрируют, что ЦОК может быть использован как ценный маркер для оценки эффективности терапии и раннего предсказания прогрессирования.

Изложенные данные свидетельствуют о том, что смерть от метастатической болезни может быть зарегистрирована у пациентов с диагностированной ранней меланомой или же спустя годы после удаления первичной опухоли. И загадка опухолевой прогрессии чаще всего связана с меланомными клетками, циркулирующими в системе кровообращения больных, считающихся радикально излеченными после хирургического лечения. Раннее обнаружение ЦОК в периферической крови могло бы представлять мощный инструмент для идентификации больных меланомой с вероятным развитием опухолевой прогрессией и потенциально плохим исходом болезни.

Несмотря на то, что ОТ-ПЦР отличается высокой чувствительностью и, как показали исследования, обладает прогностической ценностью, этот метод характеризуется большой сложностью и трудоемкостью, что затрудняет его широкое внедрение в клиническую практику.

Более того, во время извлечения РНК происходит нарушение целостности клетки, что не позволяет подсчитывать общее количество ЦОК, отделять ЦОК от опухолевых микроэмболов и выполнять их морфологический и иммунофенотипический анализ.

Этими уникальными свойствами обладает система CellSearch компании Veridex. Данная технология прошла одобрение FDA (USA) для выявления уровней ЦОК у пациентов с метастазами рака молочной железы [53], колоректального рака [14] и рака предстательной железы [16]. Система является полуавтоматической, в ее основе лежат методы иммунофлуоресценции, иммуномагнитного разделения и проточной цитометрии [31]. Предел чувствительности данного метода составляет 5 и более ЦОК на 7,5 мл крови [3; 44; 64].

Высокочувствительный комплекс для выявления ЦОК в периферической крови больных меланомой включает в себя антиген CD146 (Melcam) и HMW-MAA. Порог количества опухолевых клеток в кровотоке, который позволяет оценивать течение опухолевого процесса и определять степень развития метастазов, составляет 2 ЦОК в 7,5 мл крови [49].

Patients expressing at least two CTC markers developed progression within 7 months after treatment start.

Overall survival was decreasing in a statistically significant manner in cases with CTC expressing MART-1, GalNAc-T and/or MAGE-A3 during treatment ($p = 0.007$, $p < 0.0001$ and $p = 0.009$ respectively). The prognosticated 2-year overall survival was $94.5\% \pm 3.8\%$ for patients free from CTC after treatment end, $80.0\% \pm 12.7\%$ for patients with one positive marker and $40.0\% \pm 21.9\%$ for patients with 2 or more positive markers of CTC ($p < 0.0001$). These results demonstrate that CTC may be a useful marker of response and early prediction of progression.

All these findings show that death from metastatic disease may occur in patients with diagnosed early melanoma or after several years after removal of the primary. The tumor progression is often associated with melanoma cells circulating in blood of patients considered cured by surgical treatment. Early detection of CTC in circulation may be a powerful tool to identify melanoma cases with a high risk of disease progression and potentially poor outcome.

Although RT-PCR is a high-sensitivity assay of high prognostic value, this technique is too sophisticated and labor-consuming which makes difficult its clinical use.

Besides, RNA extraction is associated with cell damage which prevents accurate total CTC count, differentiation of CTC from microemboli and CTC morphological or immunophenotypic analyses.

CellSearch supplied by *Veridex* is a system with unique properties. It was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) as a tool for CTC measuring in patients with metastases from cancer of the breast [53], prostate [16] and colorectal cancer [14]. The system is semiautomatic and based on immunofluorescence, immunomagnetic separation and flow cytometry [31]. The system limit of sensitivity is 5 or more CTC per 7.5 ml blood [3; 44; 64].

A high-sensitivity complex for CTC measuring in peripheral blood from melanoma patients includes antigen CD146 (Melcam) and HMW-MAA (high molecular weight melanoma-associated antigen). The threshold for circulating tumor cells allowing monitoring disease course and assessment of metastasis status is 2 CTC per 7.5 ml blood [49].

В исследовании С. Rao с соавт. [49], включившем данные о 44 больных диссеминированной меланомой и 55 здоровых доноров, оценили количество ЦОК с использованием системы CellSearch.

Обнаружение в периферической крови клеток с иммунофенотипом $CD146^+HMW-MAA^+CD45^-CD34^-Ki67^{+/-}$ считалось доказательством наличия ЦОК. На момент начала исследования у 39 (86%) из 44 больных была выявлена метастатическая болезнь, 5 (14%) пациентов имели III неоперабельную стадию заболевания. При анализе образцов периферической крови количество ЦОК в контрольной крупе составило 0–1 в 7,5 мл крови. При меланоме этот показатель колебался от 0 до 8043, причем 2 и более ЦОК были выявлены у 12 (27,3%) из 44 пациентов. Статистический анализ показал, что наличие 2 и более ЦОК ассоциировалось с достоверным ухудшением выживаемости больных (медиана 2,0 мес. против 12,1 мес., $p = 0,001$). Четыре пациента, которые умерли в течение 1 месяца, имели 2; 8; 10 и 8043 ЦОК в 7,5 мл крови.

L. Khoja с соавт. [33] исследовали образцы периферической крови 101 пациента с метастатической меланомой (M1a – 4%, M1b – 17,8% и M1c – 78,2%), получивших различные виды противоопухолевой терапии (Дакарбазин, Вемурафениб, ингибиторы MEK или Ипилимумаб) в качестве первой или второй линии терапии. ЦОК определялись с использованием платформы CellSearch и считались положительными при ко-экспрессии маркеров Melcam and HMW-MAA и отсутствии антигенов CD45 и CD34. Количество ЦОК колебалось между 0 и 36 на 7,5 мл крови. Перед началом лечения у 75 (74,3%) больных было выявлено не более одной ЦОК, у 26 (25,7%) пациентов зарегистрировано более 2 ЦОК, что позволило исследователям выделить группу благоприятного и неблагоприятного прогноза. Из клинических факторов наличие ЦОК коррелировало с высоким уровнем ЛДГ ($p = 0,001$) и статусом ECOG > 2 ($p = 0,002$).

Оценка динамики ЦОК проводилась до начала лечения и далее на 6; 9; 12 и 18 неделях противоопухолевой терапии, а также при выявлении прогрессирования. В однофакторном анализе у больных с уровнем ЦОК более 2 выявлено статистически значимое снижение показателей ОВ (медиана 2,6 мес. против 7,2 мес., $p < 0,011$). В многофакторном анализе число ЦОК также было независимым неблагоприятным прогностическим биомаркером, влияющим на выживание больных ($p = 0,005$). 34 (45%) из 75 пациентов из группы благоприятного прогноза были живы через 10 мес. после начала лечения, в то время как этот временной порог пережили только 6 (23%) из 26 больных, отнесенных в группу неблагоприятного прогноза. У 13 пациентов, во время лечения которых через 6–9 недель был зафиксирован частичный или полный ответ на терапию (Дакарбазин или Вемурафениб), отмечалось достоверное снижение уровня ЦОК. Напротив, развитию прогрессирования заболевания предшествовало увеличение количества ЦОК ($p = 0,005$).

C. Rao et al. [49] used the *CellSearch* system to assess CTC in 44 patients with disseminated melanoma and 55 healthy donors. CTC positivity was reported by detection of cells with a $CD146^{+}HMW-MAA^{+}CD45^{-}CD34^{-}Ki67\pm$ immunophenotype in peripheral blood. At study start 39 (86%) of 44 patients had metastatic disease, 5 (14%) patients had stage III inoperable disease. Analysis of peripheral blood samples from controls detected 0 or 1 CTC per 7.5 ml blood. In melanoma cases this count varied from 0 to 8043 with 2 or more CTC found in 12 (27.3%) of 44 cases. Statistical analysis demonstrated that the presence of 2 or more CTC was associated with a significant shorter survival (median 2.0 vs. 12.1 months, $p = 0.001$). The 4 patients dying within 1 month had 2, 8, 10 and 8043 CTC per 7.5 ml blood.

L. Khoia et al [33] studied samples of peripheral blood from 101 patients with metastatic melanoma (M1a 4%, M1b 17.8%, M1c 78.2%) receiving various regimens of anticancer treatment (dacarbacin, vemurafenib, MEK inhibitors or ipilimumab) in first or second lines. CTC detection was made using the *CellSearch* platform, a test was considered positive in case of Melcam and HMW-MAA coexpression and the absence of CD45 and CD34. The CTC counts varied from 0 to 36 per 7.5 ml blood. Before treatment 75 (74.3%) patients had not more than 1 CTC, 26 (25.7%) had more than 2 CTC, and basing on these results the patients were divided into a good or poor prognosis group by the investigators. The presence of CTC correlated with high levels of LGH ($p = 0.001$) and ECOG performance status > 2 ($p = 0.002$).

CTC assessment was made before treatment, at weeks 6, 9, 12 and 18 of therapy and at progression. Univariate analysis discovered that patients with more than 2 CTC had a statistically significantly shorter OS (median 2.6 vs. 7.2 months, $p < 0.011$). As demonstrated by multivariate analysis CTC number was also an independent poor prognosis marker influencing survival ($p = 0.005$). Thirty four (45%) of 75 patients from the good prognosis group survived 10 months after treatment start vs. 6 (23%) of 26 patients from the poor prognosis group. The 13 patients achieving complete or partial response after 6 to 9 weeks of treatment (dacarbacin or vemurafenib) demonstrated a significant decrease in CTC count. On the contrary, increase in CTC number was indicative of disease progression ($p = 0.005$).

Данные, полученные в ходе этой работы, наглядно демонстрируют, что динамика ЦОК может быть использована как надежный суррогатный маркер для оценки эффективности терапии и раннего предсказания прогрессирования.

ЦОК являются гетерогенной клеточной популяцией, поэтому в последние несколько лет в зарубежных исследованиях отмечен повышенный интерес к изучению молекулярно-биологических характеристик опухолевого клона. Установлено, что только небольшая популяция опухолевых клеток, названная стволовыми раковыми клетками, обладает двумя важными особенностями – способностью к самообновлению и рефрактерностью к химиотерапии и лучевой терапии [27; 42; 55; 68]. Обладая более высоким метастатическим потенциалом по сравнению с другими опухолевыми клетками, стволовые клетки рака после достижения ими преметастатической ниши иницируют метастатический процесс [46], отвечая, тем самым, за развитие рецидивов болезни даже после, казалось бы, успешного лечения. Существуют специфические молекулярные маркеры стволовых клеток. Для меланомы одними из таких предполагаемых маркеров являются антигены CD133 и Nestin (NES).

CD133 – белок, принадлежащий к семейству промиелина-1, функция которого до сих пор остается неизвестной. Молекула CD133 является ключевым маркером в выделении стволовых клеток при ряде новообразований (в том числе – и при меланоме), а также маркером предшественников эндотелиоцитов, которые способны увеличиваться более чем 100 раз и создавать преметастатическую нишу [43].

Nestin (NES) был описан в контексте со стволовой популяцией в меланомных клеточных линиях [27]. Его экспрессия ассоциируется со снижением дифференцировки и была связана более агрессивным поведением опухоли. Подобно маркеру CD133, экспрессия NES возрастает при малигнизации неуса в меланому [34].

Доказательства наличия субпопуляции стволовых клеток в периферической крови при меланоме были продемонстрированы А. Fusi с соавт. [23]. В 2011 году эти ученые опубликовали результаты иммунофенотипической характеристики ЦОК 32 больных метастатической меланомой, которые были идентифицированы методом проточной цитометрии с использованием антител к маркерам MLANA (Melan-A) и HMB-45 в CD45-негативной фракции клеток. Экспрессия антигена CD133 наблюдалась на мембранах 0–23,4% ЦОК, и в большинстве случаев не превышала 1% и не коррелировала с клиническим течением болезни. Частота экспрессии маркера Nestin на ЦОК варьировала в широких пределах (0–81,5%), составляя в среднем 18%. Статистический анализ показал достоверные ассоциации между уровнем NES⁺ ЦОК $\geq 35\%$ и неблагоприятными клиническими факторами прогноза – повышением ЛДГ ($p = 0,02$), большим объемом опухолевой массы ($p = 0,001$), количеством метастатических локализаций опухоли ($p = 0,02$), а также корреляцию с более короткой общей выживаемостью больных (медиана 4 мес. против 8 мес., $p = 0,006$).

This study demonstrated that changes in CTC number might be used as a reliable surrogate marker to assess response and predict early progression.

CTC is a heterogeneous cell population, therefore foreign investigators focused recently on study of molecular biological characteristics of the tumor clone. It was found that only a small subset of tumor cells referred to as cancer stem cells possessed two important features, i.e. ability of self renewing and resistance to chemo- and radiotherapy [27; 42; 55; 68]. Possessing a much higher metastatic potential as compared to other tumor cells the cancer stem cells initiate metastasis on reaching premetastatic niche [46] thus accounting for disease recurrence even after seemingly successful treatment. There are specific molecular markers of cancer stem cells. Antigens CD133 and Nestin (NES) are possible markers for melanoma.

CD133 is a protein from prominin-1 family with yet unknown function. CD133 molecule is a key marker for detection of stem cells in some neoplasms (including melanoma) as well as a marker of endothelial progenitor cells able to multiply by more than 100-fold and form a premetastatic niche [43].

Nestin (NES) was described in the context of stem cell population in melanoma cells lines [27]. Its expression is associated with lower degree of differentiation and more aggressive tumor behavior. Like Cd133, expression of NES increases during nevus malignization in melanoma [34].

A. Fosi et al. [23] confirmed the presence of stem cell subset in peripheral blood from melanoma patients. In 2011 the investigators reported results of CTC immunophenotyping in 32 patients with metastatic melanoma as identified by flow cytometry with antibodies to MLANA (Melan-A) and HMB-45 in CD45-negative cell fraction. CD133 expression was seen on 0 to 23.4% of CTC, was not more than 1% in most cases and failed to correlate with disease course. Frequency of Nestin (NES) expression on CTC varied greatly (0 to 81.5%, mean 18%). Statistical analysis demonstrated significant associations between the level of NES-positive CTC $\geq 35\%$ and poor prognosis factors such as LDH elevation ($p = 0.02$), large tumor burden ($p = 0.001$), number of metastatic sites ($p = 0.02$) and shorter overall survival (median 4 vs. 8 months, $p = 0.006$).

Другим маркером, связанным с агрессивным течением меланомы является Ki67. Исследование С. Rao с соавт. [49] показало, что экспрессия Ki67 обнаруживается на ЦОК больных меланомой в среднем в 84% случаев (30–100%), что может отражать пролиферативную активность опухоли [25; 48] и быть косвенным доказательством высокой злокачественности и резистентности к терапии.

Но, несмотря на ряд новаторских исследований, на текущий момент понимание многих биологических свойств ЦОК крайне ограничено. Показано, что клеточные линии меланомы и стволовые клетки первичной опухоли могут экспрессировать маркеры MDR-1 [32], CD20 [42, 57], CD44/CDH5/VE-Cadherin [57], CD271 [8], ABCB5 [32, 57], ABCC2 [32], ABCG2 [42], JARID1B [52]. Уровень экспрессии этих маркеров на ЦОК меланомы, а также те последствия, которые влечет за собой их обнаружение, еще предстоит доказать.

Суммируя вышеизложенное, еще раз хочется подчеркнуть, что анализ ЦОК является перспективным подходом к дальнейшей характеристике меланомы и метастатического процесса. На основании этого, ЦОК в настоящее время можно рассматривать в качестве нового многообещающего диагностического маркера, получившего название «жидкостной биопсии в реальном времени» [45].

Литература

1. Давыдов М. И., Аксель Е. М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г. – 2012. – М., ИГР – 308 с.
1. Davydov M.I., Aksel E.M. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS in 2010. М. – 2012. – 308 P.
2. Alix-Panabières C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Annu. Rev. Med. – 2012. – V. 63. – P. 199-215.
3. Andreopoulou E., Yang L. Y, Rangel K.M. et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/DetectTM versus Veridex CellSearchTM system. Int. journal of cancer. – 2012. – V. 130. – №7. – P. 1590–7.
4. Arenberger P., Arenbergerova M., Gkalpakiotis S. et al. Multimarker real-time reverse transcription-PCR for quantitative detection of melanoma-associated antigens: a novel possible staging method. J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. – 2008. – V. 22. – №1. – P. 56-64.
5. Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. Australian Medical Journal. – 1869. – V.14. – P.146-7.
6. Balch C.M., Buzaid A.C., Soong S.J. et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J. Clin. Oncol. – 2001. – V.19. – P. 3635–48.

Ki67 is another marker associated with melanoma aggressiveness. C. Rao et al. [49] have demonstrated that Ki67 is expressed on CTC in 84% (30 to 100%) of melanoma cases and may be a reflection of tumor proliferative activity [25; 48] and an indirect sign of high malignancy and resistance to therapy.

However, our understanding of many biological properties of CTC is currently limited in spite of the innovative studies. It was shown that melanoma cell lines and stem cells might express MDR-1 [32], CD20 [42; 57], CD44/CDH5/VE-Cadherin [57], CD271 [8], ABCB5 [32; 57], ABCC2 [32], ABCG2 [42], JARID1B [52]. Further study is needed to measure levels of these markers' expression on melanoma CTC and their sequela.

In summary, it should be emphasized once more that assessment of CTC is a promising approach to further characterization of melanoma and metastatic process. Therefore CTC can currently be considered a new promising diagnostic marker referred to as 'real-time liquid biopsy' [45].

7. *Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E. et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J. Clin. Oncol.* – 2001. – V.19. – P.3622–34.
8. *Boiko A.D., Razorenova O., van de Rijn M. et al.* Human melanoma initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature.* – 2010. – V. 466. – P.133–8.
9. *Brownbridge G.G., Gold J., Edward M. et al.* Evaluation of the use of tyrosinase-specific and melanA/MART-1-specific reverse transcriptase-coupled-polymerase chain reaction to detect melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* – 2001. – V. 144. – №2. – P. 279–87.
10. *Butler T.P., Gullino P.M.* Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* – 1975. – V.35. – P. 512–6.
11. *Cambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C.* Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* – 2002. – V. 2. – P. 563–72.
12. *Charles M. Balch, Jeffrey E. Gershenwald, Soong S.J. et al.* Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J. Clin. Oncol.* – 2009. – V. 27. – №36. – P. 6199–206.
13. *Charles R. Scoggins, Merrick I. Ross, Reintgen D.S. et al.* Prospective Multi-Institutional Study of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Molecular Staging of Melanoma. *J. Clin Oncol.* – 2006. – V.24. – №18. – P.2849-57.

14. *Cohen S.J., Punt C.J., Iannotti N. et al.* Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* – 2008. – V.26. – P.3213–21.
15. *Danila D.C., Fleisher M., Scher H.I.* Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2011. – V.17. – №12. – P. 3903–12.
16. *De Bono J.S., Scher H.I., Montgomery R.B. et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* – 2008. – V.14. – P.6302–9.
17. *Demicheli R., Abbattista A., Miceli R. et al.* Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: Further support about the concept o tumor dormancy. *Breast Cancer Res. Treat.* – 1996. – V.41. – P.177–85.
18. *Eton O., Legha S.S., Moon T. E. et al.* Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J. Clin. Oncol.* – 1998. – V.16. –P.1103–11.
19. *Francken A.B., Accortt N.A., Shaw H.M. et al.* Prognosis and determinants of outcome following locoregional or distant recurrence in patients with cutaneous melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* – 2008. – V.15. – P.1476–84.
20. *Fidler I.J., Yano S., Zhang R.D. et al.* The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* – 2002. – V.3. – P. 53–7.
21. *Friedl P., Wolf K.* Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – V.3. – P. 362–74.
22. *Fusi A., Collette S., Busse A. et al.* Circulating melanoma cells and distant metastasis-free survival in stage III melanoma patients with or without adjuvant interferon treatment (EORTC 18991 side study). *Exp. Dermatol.* – 2010. – V.19. – P.994–9.
23. *Fusi A., Reichelt U., Busse A. et al.* Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* – 2011. – V.131. – №2. – P. 487–94.
24. *Geho D.H., Bandle R.W., Claire T. et al.* Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda).* – 2005. – V. 20. – P.194–200.
25. *Gimotty P.A., Van Belle P., Elder D. E. et. al.* Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* – 2005. – V.23. – P. 8048–56.
26. *Gkalpakiotis S., Arenberger P., Kremen J. et. al.* Quantitative detection of melanoma-associated antigens by multimarker real-time RT-PCR for molecular staging: results of a 5 years study. *Eur. J. Cancer.* – 2009. – V.45. – №18. – P.3189–97.

27. *Grichnik J.M., Burch J.A., Schulte R.D. et al.* Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – V.126. – P.142–53.
28. *Hoon D.S., Bostick P., Kuo C. et al.* Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. *Cancer Res.* – 2000. – V.60. – №8. – P. 2253-7.
29. *Hoshimoto S., Faries M.B., Morton D.L. et al.* Assessment of prognostic circulating tumor cells in a phase III trial of adjuvant immunotherapy after complete resection of stage IV melanoma. *Ann. Surg.* – 2012. – V.255. – №2. – P.357-362.
30. *Hoshimoto S., Shingai T., Morton D.L. et al.* Association Between Circulating Tumor Cells and Prognosis in Patients With Stage III Melanoma With Sentinel Lymph Node Metastasis in a Phase III International Multicenter Trial. *J. Clin. Oncol.* – 2012. – V.30. – № 31. – P. 3819-26.
31. *Kagan M., Howard D., Bendele T. et al.* Sample Preparation and Analysis System for Identification of Circulating Tumor Cells. *Journal of Clinical Ligand Assay.* – 2002. – V.25. – № 1. – P.104–10.
32. *Kesht G.I., Goldstein I., Itzhaki O. et al.* MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* – 2008. – V.368. –P.930–936.
33. *Khoja L. , Lorigan P., Zhou C. et al.* Biomarker Utility of Circulating Tumor Cells in Metastatic Cutaneous Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – V.6. – P.1-9.
34. *Klein W.M., Wu B.P., Zhao S. et al.* Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* – 2007. – V.20 – P.102–107.
35. *Koyanagi K., Kuo C., Nakagawa T. et al.* Multimarker quantitative real-time PCR detection of circulating melanoma cells in peripheral blood: relation to disease stage in melanoma patients. *Clin. Chem.* – 2005. – V.51. – №6. – P.981-8.
36. *Koyanagi K., O'Day S.J., Gonzalez R. et al.* Serial monitoring of circulating melanoma cells during neoadjuvant biochemotherapy for stage III melanoma: outcome prediction in a multicenter trial. *J. Clin. Oncol.* – 2005. – V.23. – №31. – P.8057-8064.
37. *Lewis T.B., Robison J.E., Bastien R. et al.* Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer.* – 2005. – V.104. – P.1678–1686.
38. *Mazzocca A., Carloni V.* The metastatic process: methodological advances and pharmacological challenges. *Curr. Med. Chem.* – 2009. – V.16. – P.1704–1717.
39. *Michaelson J.S., Cheongsatmoy J.A., Dewey F. et al.)* Spread of human cancer cells occurs with probabilities indicative of a nongenetic mechanism. *Br. J. Cancer.* – 2005. – V.93. – P.1244–1249.

40. *Miller M.C., Doyle G.V., Terstappen L.W.* Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of oncology.* – 2010. – V.2010. – P.1-8.
41. *Mocellin S., Hoon D., Ambrosi A. et al.* The Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Patients with Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* – 2006. – V.12. – P.4605-4613.
42. *Monzani E., Facchetti F., Galmozzi E. et al.* Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur. J. Cancer.* – 2007. – V.43. – P.935-946.
43. *Natori T., Sata M., Washida M. et.al.* G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* – 2002. – V.297. – №4. – P.1058-1061.
44. *Negin B., Cohen S.* Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Current treatment options in oncology.* – 2010. – V.11. – № 1-2. – P.1-13.
45. *Pantel K., Alix-Panabieres C.* Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* – 2010. – V.16 – P.398-406.
46. *Pantel K., Alix-Panabieres C., Riethdorf S.* Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2009. – V.6. – P.339-351.
47. *Pantel K., Brakenhoff R.H.* Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – V.4. – P.448-456.
48. *Pearl R.A., Pacifico M.D., Richman P.I. et.al.* Ki-67 expression in melanoma. A potential method of risk assessment for the patient with a positive sentinel node: *J Exp Clin. Cancer Res.* – 2007. – V.26. – P.109-115.
49. *Rao C., Bui T., Connelly M. et al.* Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. *Int. J. Oncol.* – 2011. – V.38 – P.755-760.
50. *Riethdorf S., Fritsche H., Muller V. et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin. Cancer Res.* – 2007. – V.13. – P.920-928.
51. *Roberts D.L., Anstey A.V., Barlow R.J. et al.* U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma. *Br. J. Dermatol.* – 2002. – V.146 – P.7-17.
52. *Roesch A., Fukunaga-Kalabis M., Schmidt E.C. et al.* A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell.* – 2010. – V.141. – P.583-594.
53. *Rosenberg R., Gertler R., Friederichs J. et al.* Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry.* – 2002. – V.49. – P.150-158.
54. *Rutkowski P., Nowecki Z.I., Kulik J. et al.* Molecular staging by multimer reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of lymphatic drainage and blood from melanoma patients after lymph node dissection. *Melanoma Res.* – 2008. – V.18. – №4. – P.246-252.

55. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y. *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. – 2008. – V.451. – P.345–349.
56. Singh A.D., Ronnie I.G., Kevel T. *et al.* The Zimmerman-McLean-Foster hypothesis: 25 years later. *Br. J. Ophthalmol.* – 2004. – V.88 – P.962–967.
57. Smalley K.S., Herlyn M. Integrating tumor-initiating cells into the paradigm for melanoma targeted therapy. *Int. J. Cancer*. – 2009. – V.124 – P.1245–1250.
58. Smith B., Selby P., Southgate J. *et al.* Detection of melanoma-cells in peripheral-blood by means of reverse-transcriptase and polymerase chain-reaction. *Lancet*. – 1991. – V.338. – P.1227–1229.
59. Swaby R.F., Cristofanilli M. Circulating tumor cells in breast cancer: a tool whose time has come of age. *BMC medicine*. – 2011. – V.9. – P.43
60. Tanaka F., Yoneda K., Kondo N. *et al.* Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2009. – V.15 – №22. – P.6980–6986.
61. Thompson J.F., Scolyer R.A., Kefford R.F. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet*. – 2009. – V.374. – P.362–365.
62. Tsao H., Nadiminti U., Sober A.J. *et al.* A meta-analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA as a marker for circulating tumor cells in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol.* – 2001. – V.137. – №3. – P.325–330.
63. Uhr J.W., Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – V.108 – №30. – P.12396–12400.
64. Van der Auwera I., Peeters D., Benoy I.H. *et.al.* Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *British journal of cancer*. – 2010. – V. 102. – №2. – P. 276–84.
65. Visús C., Andres R., Mayordomo J.I. *et al.* Prognostic role of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA in patients with melanoma. *Melanoma Res.* – 2007. – V.17. – №2. – P.83–9.
66. Wascher R.A., Morton D.L., Kuo C. *et al.* Molecular tumor markers in the blood: early prediction of disease outcome in melanoma patients treated with a melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol.* – 2003. – V.21. – №13. – P.2558–2563.
67. Yap T.A., Sandhu S.K., P. Workman J. S. *et al.* Envisioning the future of early anticancer drug development. *Nat. Rev.Cancer*. – 2010. – V.10. – P.514–23.
68. Zabierowski S.E., Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J. Clin. Oncol.* – 2008. – V. 26. – P.2890–4.
69. Zhe X., Cher M.L., Bonfil R.D. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am. J. Cancer Res.* – 2011. – V.1. – №6. – P.740–51.

К. Ламбер

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫРАЖЕННОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ Т-КЛЕТОК МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Лаборатория иммунологии, Университетская больница, Высшая национальная горная школа, Сент-Этьен, Франция

Резюме

Проточная цитометрия является мощным инструментом, представляющим редкую возможность анализировать очень большое число клеток по отдельности, используя несколько параметров. Класс Т-клеток традиционно разделяют на несколько подтипов в зависимости от экспрессии взаимно исключающих молекул CD4 и CD8. Однако анализ одновременно нескольких параметров позволяет выявлять некоторые неклассифицированные комбинации маркеров, функциональная значимость которых не установлена. Кроме того, высокая точность и воспроизводимость результатов этого метода дают возможность дифференцировать клетки по уровню экспрессии маркеров. Результаты исследования показали следующее: помимо классических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, у большинства доноров определяются и у некоторых пациентов присутствуют в значительных количествах другие, неклассические фенотипы (CD4⁺CD8dim, CD4dimCD8⁺, CD8dim Т-клетки), экспрессирующие единственный клонотип V β и персистирующие в течение нескольких лет. В некоторых публикациях указывается на возможное участие хронических вирусных инфекций, особенно ЦМВ. Эти особые фенотипы были описаны при Т-клеточной лимфоме. Для их обозначения мы предложили термин «олигоклональная клонопатия неопределенного значения». Широко распространена экспрессия CD3, которая демонстрирует большое разнообразие физических и функциональных характеристик популяции Т-клеток, при этом интерес в функциональном плане вызывает Т-клеточный ответ, контролирующий качество и степень памяти.

Таким образом, мультипараметрический анализ крупной популяции Т-клеток указывает на большое разнообразие Т-клеток, каждая из которых действует отлично от других в зависимости от своих собственных характеристик. Т-клетки необходимо рассматривать с позиций социологии с целью разработки новой парадигмы «цитосоциологии».

Ключевые слова: Т-клетки, CD3, уровень CD на мембране, неклассические субпопуляции, «олигоклональная клонопатия неопределенного значения».

Lambert Claude

EXPLORING THE T CELL HIGH DIVERSITY USING FLOWCYTOMETRY

Immunology laboratory, SFR INSERM IFRESIS 143, University Hospital and CNRS UMR5307 Ecole Nationale Supérieure des Mines Saint-Etienne, France

Abstract

Flowcytometry is a powerful tool allowing the rare opportunity to analyse a very large number of cells individually, using multiple parameters. Focusing on T cells, the cell type is classically divided in few subtypes by expressing mutually exclusive CD4 or CD8 molecules. However, analyzing multiple parameters simultaneously has revealed some unclassical associations of markers which functional significances were either unknown or even through to be non compatible. Furthermore the high precision and reproducibility of the technique give the possibility to distinguish cells according to the level of marker expression.

Results showed that: Beside classical CD4⁺ and CD8⁺ T cell, other non classical phenotypes (CD4⁺CD8dim, CD4dimCD8⁺, CD8dim T cells) can be detected in most of the donors and can strongly increase in some patients, expressing a single V β clonotype and persisting over years. Some reports show a possible involvement of chronic virus infections and especially CMV. Furthermore, these particular phenotypes have been described in T cell lymphoma. We have proposed to name them Oligoclonal Clonopathy of Undetermined Significance. The expression of CD3 is widely distributed showing a large diversity on physical and functional characteristics of the T cell population with functional interest on the dynamics of T cell response that govern the quality and extend of memory.

Thus multiparametric analysis of a large population of T cells highlights its high diversity of T cell, each of them acting differently according to its own characteristics. The T cell should be considered with sociology approach leading to a new paradigm of «cyto-sociology».

Keywords: T cells, CD3, membrane density, non classical subsets, Oligoclonal clonopathy of undetermined significance.

Введение

Проточная цитометрия позволяет охарактеризовать множество отдельных клеток в крупной популяции. Множественное мечение дает возможность анализировать одновременно большее число маркеров при меньшем числе протоколов. Это не только позволяет сократить число необходимых анализов, но и дает экономию времени и денег. Кроме того, множественное мечение также дает возможность получить более точную информацию о каждой клетке. Это – уникальный метод для исследования разнообразия клеток. Проточная цитометрия открывает новую область биологии, цитосоциологию.

Цитометрия имеет несколько областей применения. С ее помощью можно анализировать клетки любого типа, однако в данной работе мы рассмотрим периферические мононуклеарные клетки (особенно – лимфоциты), которые можно легко определять по физическим параметрам. Традиционно лимфоциты подразделяются на 3 основные линии: Т-, В- и NK-клетки, надежно дифференцировать которые можно только методом иммуноокрашивания [1]. Обычно NK-клетки идентифицируют по экспрессии CD56, В-клетки – по экспрессии CD19 и Т-клетки – по экспрессии CD3ε. Молекула CD3 состоит из нескольких цепей, и комплекс физически связывается с ТКР изотипов α-β или γ-δ [2]. Т-клетки также экспрессируют CD4 и CD8, которые являются взаимно исключающими молекулами. Каждый из указанных классических подтипов Т-клеток выполняет определенные, давно известные функции, например, Т-хелперы или цитотоксические Т-клетки.

Исторически эти три типа лимфоцитов описываются при помощи 2–3-цветной проточной цитометрии с использованием маркеров CD3, CD56, CD3 и CD4 или CD3–CD19. Использование всех этих маркеров одновременно показывает, что традиционная классификация не является достаточно точной. Исследование у больных с нарушением иммунитета позволило выявить необычные субпопуляции Т-клеток, которые присутствуют и у здоровых доноров, но только в очень небольшом количестве. Кроме того, использование хорошо контролируемого окрашивания и анализ интенсивности окрашивания показывает разнообразие распределения клеток, обладающего функциональной значимостью [3].

Функции и память Т-клеток определяются ранними этапами процесса распознавания антигена. ТКР связывается со специфическим лигандом (пептидом), связанным с собственными молекулами ГКГС, МНС в соответствии с биохимической авидностью [4]. Небольшие изменения авидности могут привести к полному ответу, апоптозу либо толерантности Т-клеток. Кинетика процесса также зависит от уровня имеющихся CD3–ТКР. Сродство с пептидным комплексом очень низкое, поэтому требуется поддержка ко-стимулирующих молекул, в частности, CD4, которая связывается с молекулой МНСII [5], или CD8, которая связывается с молекулой МНС I [6].

Introduction

Flowcytometry allows characterization of a lot of individual cells in a large population. Multiple labeling gives the possibility to analyse simultaneously more markers in less protocols. This does not only reduce the number of tests to be done, saving time and money. Most of all, the multiple labeling also brings more precise information on each cell. This is a unique method for exploring cell diversity. Flowcytometry open a new field in biology that is «cyto-sociology».

While cytometry has many applications and can focus on any cell type, we shall focus the present study on peripheral mononuclear cells and especially lymphocytes that can easily be selected on physical parameters. Classically, the lymphocytes can be separated in 3 main lineages T, B and NK cells that can only be reliably selected using immunolabelling [1]. Typically, the NK cells are identified on their expression of CD56, B cells expressing CD19 while T cells specifically express CD3 ϵ . The CD3 is composed of multiple chains and the complex is physically associated with the TCR of either the alpha beta or gamma delta chain iso-types [2]. T cells also express CD4 or CD8 that are classically mutually exclusive. Each of these classical T cell subsets corresponds to distinct functions known for a long time such as helper or cytotoxic T cells.

Historically, the three lymphocytes were described using 2 or 3 color flow cytometry with CD3, CD56, CD3 and CD4 or CD3-CD19. Using all these markers simultaneously shows that this classification is not precise enough. Looking at immune-compromised patients has revealed non conventional T cell subsets that are in fact present in healthy donors but only as small minorities. Furthermore, using well controlled labeling and considering the labeling intensity also shows out an heterogeneous distributions of cells with functional significance [3].

T cell functions and memory depend on the early steps of recognition of the antigen. The T cell receptor (TCR) bind to the specific ligand (peptide) linked to a self molecules MHC according to the biochemical avidity [4]. Small changes in avidity can lead either to either full T cell response or apoptosis or tolerance. The kinetics also depends on the level of CD3-TCR available. The affinity to the peptide complex is very low and need support from co-stimulatory molecules and especially CD4 that bind to the MHC II molecule [5] or CD8 that bind to the MHCI molecule [6].

Включение CD3–ТКР индуцирует интернализацию [7] и, как следствие, снижение мембранного уровня [8]. Для полной активации Т-клеток необходимо минимальное число интернализованных молекул [9]. Экспрессия на мембране маркеров CD3, CD4, CD8 является точным инструментом не только для фенотипирования Т-клеток, но также и для определения их основных функций. Необходимо оценивать уровень экспрессии этих маркеров.

Целью данной работы является исследование большого разнообразия популяции Т-клеток и потенциальной физиологической/ патологической значимости субпопуляций для использования стандартных протоколов иммуномониторинга.

Пациенты и методы

Анализ лимфоцитов проводили на образцах, полученных у здоровых взрослых доноров и больных, перенесших трансплантацию почки (время после трансплантации от 1 до 15 лет).

Иммуномечение лимфоцитов проводили стандартным способом с использованием комбинаций CD3-флюоресцеин изотиоционат (FITC, IgG1, клон sk7), CD16-фикоэритрин (PE, IgG1, клон B73.1), CD56-PE (IgG1, клон NCAM 16.2), CD45-перидин хлорофилл протеин (PerCP, IgG1, клон 2D1), CD4-PE-цианин7 (PE-Cy7, IgG1, клон SK3), CD19-аллофикоцианин (APC, IgG1, клон SJ25C1) и CD8-APC-цианин 7 (APC-Cy7, IgG1, клон SK1). Для анализа $\gamma\delta$ -Т-клеток использовали CD3-APC-цианин 7 (клон sk7), все реагенты производства BD Biosciences, Сан-Хосе; CA и CD8 α -APC (клон SFC121thyD3), CD4-PE-Cy7 (клон SFC112T4D11), CD8 β PE-Cy5 (клон 2ST8.5H7) и TCR γ/δ FITC (клон Immu 510) или TCR γ 9 (Immu 360) (все Beckman-Coulter; Fullerton).

Клонотипы ТКР V β идентифицировали при помощи пар конъюгированных МКА к V β 1 (клон BL37.2) PE и V β 2 (клон MPB2D5) FITC, V β 3 (клон CH92) FITC и V β 4 (клон WJF24) PE, V β 5.1 (клон IMMU157) FITC и V β 5.3 (клон 3D11) PE, V β 5.2 (клон 36213) FITC и V β 8 (8.1 и 8.2; клон 56C5) PE, V β 7 (клон ZOE) FITC и V β 9 (клон FIN9) PE, V β 11 (клон C21) PE и V β 12 (клон VER2.32.1) FITC, V β 13.1 (клон IMMU222) PE и V β 13.6 (клон JU-74) FITC, V β 14 (клон CAS1.1.3) PE и V β 16 (клон TAMAYA 1.2) FITC, V β 17 (клон E17.5F3) FITC и V β 18 (клон BA62) PE, V β 20 (клон ELL 1.4) FITC и V β 22 (клон IMMU 546) PE, V β 21.3 (клон IG125) FITC и V β 23 (клон AF23) PE (все Beckman-Coulter). Все с метками CD3-APC-Cy7, CD8 α -APC, CD4-PE-Cy7, CD8 β PE-Cy5.

Активационный тест проводили на свежих изолированных в градиенте плотности мононуклеарных клетках, инкубированных в течение 30 ч с МКА к CD3. После инкубации клетки из одной лунки промывали и окрашивали 3 комбинациями репрезентативных клонотипов: V β 1 PE/V β 20 FITC; V β 2 FITC/V β 8 PE и V β 3 FITC/V β 9 PE с CD3-APC-Cy 7, CD8 α -APC, CD4-PE-Cy7, CD25 PE-Cy5 (клон MA251; BD Biosciences).

The CD3-TCR engagement induce internalization [7] and thus membrane down-regulation [8]. A minimal number of internalized molecules is needed for full T cell activation [9]. The membrane expression of CD3, CD4, CD8 are precious tools not only for T cell phenotyping but also for their primary function. Their level of expression must be considered.

The aim of this paper was to examine some extend of large diversity of T cell population and their potential physiological/ pathological significance from basic protocols usually used in immuno-monitoring.

Patients and methods

Lymphocyte analysis was performed on samples from healthy adult blood donors and renal transplant patients, (time from graft 1–15 years).

Lymphocytes were immune-labeled in routine practice using a combination of : CD3-Fluorescein IsoThiocyanate (FITC, IgG1, clone sk7), CD16- Phycoerythrin (PE, IgG1, Clone B73.1), CD56-PE (IgG1, Clone NCAM 16.2), CD45- Peridin Chlorophyl Protein (PerCP, IgG1, clone 2D1), CD4-PE -Cyanin7 (PE-Cy7, IgG1, clone SK3), CD19-Allophycocyanin (APC, IgG1, clone SJ25C1), and CD8-APC-Cyanin7 (APC-Cy7, IgG1, clone SK1). An alternative labeling was used for $\gamma\delta$ T cell analysis using : CD3-APC-Cyanine 7 (clone sk7), all from BD Biosciences, San Jose, CA and CD8 α -APC (clone SFCI21thyD3), CD4-PE-Cy7 (clone SFCI12T4D11), CD8 β PE-Cy5 (clone 2ST8.5H7) and either TCR γ/δ FITC (clone Immu 510) or TCR γ 9 (Immu 360) all from Beckman-Coulter; Fullerton, CA

The clonotypes of TCR V beta chain were identified using pairs of conjugated monoclonal antibodies to: V β 1 (clone BL37.2) PE and V β 2 (clone MPB2D5) FITC, V β 3 (clone CH92) FITC and V β 4 (clone WJF24) PE, V β 5.1 (clone IMMU157) FITC and V β 5.3 (clone 3D11) PE, V β 5.2 (clone 36213) FITC and V β 8 (8.1 and 8.2; clone 56C5) PE, V β 7 (clone ZOE) FITC and V β 9 (clone FIN9) PE, V β 11 (clone C21) PE and V β 12 (clone VER2.32.1) FITC, V β 13.1 (clone IMMU222) PE and V β 13.6 (clone JU-74) FITC, V β 14 (clone CAS1.1.3) PE and V β 16 (clone TAMAYA 1.2) FITC, V β 17 (clone E17.5F3) FITC and V β 18 (clone BA62) PE, V β 20 (clone ELL 1.4) FITC and V β 22 (clone IMMU 546) PE, V β 21.3 (clone IG125) FITC and V β 23 (clone AF23) PE (all purchased from Beckman-Coulter). All associated with CD3-APC-Cy7, CD8 α -APC, CD4-PE-Cy7, CD8 β PE-Cy5.

The activation test was performed on fresh, density gradient isolated mononuclear cells (PBMC) incubated for 30 hours with anti-CD3 monoclonal antibody. After incubation, cells from the same well were washed and labeled with 3 combinations of representative clonotypes: V β 1 PE/V β 20 FITC; V β 2 FITC/V β 8 PE and V β 3 FITC/V β 9 PE, associated with CD3-APC-Cy 7, CD8 α -APC, CD4-PE-Cy7, CD25 PE-Cy5 (Clone MA251; BD Biosciences).

Большинство процедур иммуномечения проводили на образцах свежей периферической крови объемом 100 мкл, обработанной EDTA и инкубированной с антителами, после этого материал осторожно перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Лизис и фиксацию осуществляли путем добавления 500 мкл раствора FACS Lysing (BD Biosciences). Для мечения $V\beta$ проводили электролизис с использованием раствора Versalyse (Beckman-Coulter), образцы перед анализом промывали 4 мл фосфатного буфера.

Настройку прибора проводили на 9 пробирках (немеченая, 6 с одной меткой, 6 – изотипический контроль и смешанные антитела) с использованием программы FACS Diva (BD Biosciences), как описано ранее [1]. Настройку прибора проверяли ежедневно при помощи стандартизированных 7-цветных гранул Setup.

Результаты анализа крови проверяли ежедневно при помощи средств внешнего контроля (Multi-check control; BD Biosciences).

Анализ точечных графиков проводили с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD Biosciences): CD3 и SSC. Клетки $CD4^+$ и $CD8^+$ анализировали на $CD3^+$. Клонотипы $V\beta$ анализировали по 30 000 Т-клеточных событий среди $CD3^+CD4^+CD8^-$ или $CD3^+CD4^+CD8^+$ лимфоцитов. $\gamma\delta$ Т-клетки определяли по CD3: $\gamma\delta$ ТКР.

Статистический анализ проводили с использованием парного t -критерия Стьюдента для сравнения двух клеточных субпопуляций из образца, линейных регрессий и выражали как $M \pm m$. Коэффициент вариации (CV) определяли как m/M .

Результаты

Т-клеточные фенотипы CD3 CD4 и CD8

В обычной практике популяцию лимфоцитов в крови определяют по физическим параметрам (FSC или CD45/SSC; рис. 1а; см. вклейку). В этой популяции Т-лимфоциты легко определяются при помощи антител к $CD3^+$. Точечный график по двум параметрам делает определение более точным, хорошим началом является комбинация CD3/SSC. Т-клетки можно также выделить из других лимфоцитов, используя CD3 и маркер NK-клеток ($CD56$) или В-клеток ($CD19$; рис. 1б). Экспрессия CD4 и CD8 четко выделяет 2 классических подтипа Т-клеток, как правило, присутствующих в пропорции 2/3 и 1/3, причем эти два подтипа составляют в сумме более 95% общего числа Т-клеток в периферической крови (рис. 1с). Каждый подтип Т-клеток экспрессирует разнообразные ТКР, что показывает мечение 22 изотипов цепи $V\beta$, для которых имеются моноклональные антитела. Эти клонотипы обычно широко представлены на $CD4^+$ Т-клетках, причем частота большинства из них была ниже 5% (рис. 2). Их распределение среди $CD8^+$ Т-клеток было менее выраженным.

Most of the immunolabeling procedures were performed on 100 μ L of EthyleneDiamineTetraAcetic Acid (EDTA) anti-coagulated fresh peripheral blood, incubated with antibodies, gently mixed and incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. The lysis and fixation were obtained by adding 500 μ L of FACSlysing solution™ (BD Biosciences). Samples were analyzed within 2 hours on a FACScanto II (BD Biosciences). For V β labeling, erythrolysis was performed using Versalyse® solution (Beckman-Coulter) and samples were washed with 4ml Phosphate buffer before analysis.

Instrument setting were performed on 9 tubes (unlabeled, 6 single labelled, 6 isotype controls and the mixed antibodies) using FACS Diva™ calculation facilities (BD Biosciences) as previously described [1]. Instrument settings were daily checked using standardized (7 color Setup™ beads). Blood analysing was daily validated using external Quality control (Multi-check control; BD Biosciences).

Dot plots were analyzed using FACS Diva™ (BD Biosciences): CD3 vs Side scatter identification. CD4⁺ and CD8⁺ were analyzed on CD3⁺. V β clonotypes were analysed on 30 000 T cell events, on either CD3⁺CD4⁺CD8⁻ or CD3⁺CD4⁻CD8⁺ lymphocytes. The $\gamma\delta$ T cells were defined on CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR.

Statistical analysis was performed using, paired Student's T test for comparison of two cell sub-populations from the sample, linear regressions and expressed as median $\pm$ 1SD. Coefficient of variation (CV) were calculated as 1SD/mean.

Results

CD3 CD4 and CD8 T cell phenotypes

In routine blood the lymphocyte population was identified on physical parameters (FCS or CD45/SSC; fig. 1a; see insert). Out of this population, T cells can be easily identified out using anti-CD3⁺ labeling. Two parameter dot plot makes it more precise and CD3/SSC is a good possible start. T cells can also be distinguished from other lymphocytes using CD3 versus a marker of NK (CD56) or B cells (CD19; fig 1b). CD4 and CD8 expression clearly define the 2 classical T cell subtypes, in a usual ratio of approximately 2/3 vs 1/3 and the two populations count for more than 95% of total T cells for the peripheral blood (fig. 1c). Each T cell subtype expresses a wild distribution of TCR as approached labeling the 22 V β chain isotypes for which monoclonal antibodies were available. The clonotypes were generally widely distributed on CD4⁺ T cell, at frequency below 5% each for most of them (e.g.: fig 2). The distribution was less widely distributed on CD8⁺ T cell.

Т-клеточные экстра-фенотипы CD3 CD4 и CD8

Однако в ежедневной практике анализа крови больных можно наблюдать необычные фенотипы.

Так, например, небольшая фракция Т-клеток экспрессирует как CD4, так и CD8. Эта двойная экспрессия на графике выглядит не так, как двойственная позитивность, наблюдаемая на незрелых тимоцитах. На самом деле мы наблюдаем два разных фенотипа, экспрессирующих высокий уровень одного маркера (либо CD4, либо CD8) и низкий уровень второго, т. е. Т-клетки CD4⁺CD8dim или CD4dimCD8⁺ (рис. 1d, e). Эти клетки имеют $\alpha\beta$ ТКР, зрелый фенотип/фенотип памяти и могут активироваться. Более пристальный анализ образцов, полученных у здоровых доноров, показывает, что эти два фенотипа также присутствуют и в их крови, хотя и в очень малом количестве (менее 1% Т-клеток). С другой стороны, примерно у 5% больных относительное количество неклассических двойных-положительных клеток может превышать 5 и даже 10% общего числа CD3⁺ Т-клеток и оставаться на высоком уровне в течение нескольких лет (личные данные). Анализ репертуара цепи V β ТКР у этих клеток показывает, что необычные клеточные субпопуляции экспрессируют преимущественно один единственный клонотип (рис. 2a–b). Клиническое значение этих персистирующих олигоклональных клонов пока не установлено, и для их обозначения мы предлагаем использовать термин «олигоклональный клонотип неопределенного значения» (Oligoclonal Clonotype of Undetermined Significance – OCUS) по подобию термину «моноклональная гаммапатия неопределенного значения» (Multiclonal Clonotype of Undetermined Significance – MGUS) для В-клеток.

Существуют и другие необычные подтипы Т-клеток, в основном – среди CD8⁺ Т-клеток. Т-клетки обычно экспрессируют высокие уровни молекулы CD8, представляющей гетеродимер из одной α - и одной β -цепей (CD8 $\alpha\beta$), тогда как небольшая фракция этих клеток экспрессирует более низкие уровни CD8 и не экспрессирует CD4 (рис. 1d–e). Эти CD8dim Т-клетки экспрессируют α - α димерную изоформу CD8 (CD8 $\alpha\alpha$). У некоторых больных они могут составлять существенную часть популяции Т-клеток (рис. 1f). Большинство из этих CD8dim Т-клеток, например, CD4⁺CD8⁺ Т-клетки на самом деле являются ТКР $\gamma\delta$ Т-клетками. Действительно, если циркулирующие $\gamma\delta$ Т-клетки никогда не экспрессируют CD4, некоторая непостоянная часть из них экспрессирует CD8 $\alpha\alpha$ в небольшом количестве. Однако, небольшая часть $\alpha\beta$ Т-клеток также экспрессирует CD8 $\alpha\alpha$ в разных количествах, обычно в небольших, которые могут существенно повышаться у некоторых больных. Субпопуляция клеток CD8dim может быть олигоклональной (рис. 2c), и ее клиническое значение также не установлено. Такие клетки можно рассматривать как компонент OCUS.

CD3 CD4 and CD8 T cell extra phenotypes

However, in daily analysis of patients, we can observe non conventional phenotypes.

Indeed, a small fraction of T cell expresses both CD4 and CD8. This double expression appears graphically different from the double positive that can be observed on immature thymocytes. Indeed, we can observe two distinct phenotypes, expressing a high level of one marker (either CD4 or CD8) and a low level of the other one, defining CD4⁺CD8dim or CD4dimCD8⁺ T cells (fig 1d, e). These cells have $\alpha\beta$ TCR, mature /memory phenotypes and can be activated. Looking closer to healthy donor samples show these two phenotypes are present even if at very low levels (< 1% of T cells). Alternatively, in almost 5% of the patients, the non classical double positive cells can exceed 5 or even 10% of all CD3⁺ T cells and remain at high levels for several years (personal data). Analysing their TCR V β chain repertoire shows that this non conventional cell subsets express predominantly one single clonotype (fig 2a, 2b). The clinical significance of these persisting oligoclonal clones is not known yet and we have proposed to name them Oligoclonal Clonotype of Undetermined Significance (OCUS) in reference to Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) equivalent for B cells.

There are other non conventional T cell subtypes, mainly among CD8⁺ T Cells. While T cells usually express high levels of CD8 composed of one alpha and one beta chain heterodimer (CD8 $\alpha\beta$), a small part of them express reduced levels of CD8 and no CD4 (fig 1d, 1e). These CD8dim T cells express the alpha-alpha heterodimeric isoform of CD8 (CD8 $\alpha\alpha$). In some patients, they can represent a consequent part of T cells (fig 1f). Most of these CD8dim T cells, like the CD4⁺CD8⁺ T cells are in fact TCR $\gamma\delta$ T cells. Indeed, if circulating $\gamma\delta$ T cells never express CD4, a variable part of them do express CD8 $\alpha\alpha$, at low level. However, one small part of the $\alpha\beta$ T cells also express CD8 $\alpha\alpha$ at variable level of expression, usually low but can be strongly enhanced in some patients. The high CD8dim cell subset can be oligoclonal (fig 2c) and its clinical significance is not known either. They can be considered as part of OCUS.

Высокая степень гетерогенности экспрессии CD3 в подмножестве Т-клеток

Помимо фенотипического разнообразия Т-клетки демонстрируют широкий диапазон экспрессии CD3 ($CV = 32,7 \pm 2,7\%$ для интенсивности флуоресценции, рассчитанный по CD8⁺ Т-клеткам в последовательных образцах 56 доноров; рис. 3а). Этот показатель отражает различные уровни экспрессии CD3 (рис. 3б). Уровни экспрессии на CD4 Т-клетках ($MDFI: 1401 \pm 248$) выше, чем на CD8⁺ Т-клетках (1100 ± 178 ; $p < 0,0001$), однако все же эти две субпопуляции характеризуются широким разбросом числа молекул на своей поверхности. Если продолжить разделение этих популяций на более мелкие, можно заметить, что Т-клетки демонстрируют совершенно разные уровни экспрессии CD3 в зависимости от клонотипа (рис. 4).

Функциональное значение гетерогенности CD3

Активация Т-клеток начинается с распознавания рецептором Т-клеток комплекса «пептид-молекула ГКГС». Комплексы ТКР-CD3 активируются и интернализируются, причем кинетика процесса зависит от сродства ТКР и пептидного комплекса. Динамика активации также существенно зависит от исходного уровня ТКР-CD3, и можно ожидать, что кинетика Т-клеток с низкой плотностью CD3 будет отличаться от кинетики Т-клеток с высокой плотностью антигена. Используя в качестве активатора гранулы с нанесенными на них антителами к CD3 – CD28, мы определили степень активации Т-клеток по индукции экспрессии рецептора ИЛ-2 (CD25) через 30 часов у 13 здоровых доноров. Оказалось, что активация клонотипов с высоким уровнем экспрессии CD3 (V β 8 и V β 9) была статистически значимо выше по сравнению с клонотипами CD3low (V β 2 и V β 3; от $p = 0,040$ до $p = 0,0003$; рис. 5).

Обсуждение

При помощи мультипараметрического иммуномечения нами показано большое разнообразие фенотипов, причем некоторые подтипы оказались статистически значимо связаны с определенными функциями [1]; аналогичные результаты показаны и другими авторами. Использование все большего числа меток одновременно позволит значительно повысить точность характеристик различных субпопуляций клеток. Так, например, известно, что для распознавания пептидов, связанных с молекулами HLA II, необходимо присутствие молекулы CD4, поддерживающей кооперацию антиген-представляющих клеток с Т-хелперами, тогда как CD8 связывается с молекулами HLA I, которые распознают несобственные пептиды на любой клетке, поддерживая защитную функцию CD8⁺ Т-клеток в отношении любых потенциальных мишеней [5; 6; 10].

Wide heterogeneity of CD3 expression inside T cell subsets

Beside the phenotype diversity, the T cells appear to have a wide distribution of CD3 expression ($CV = 32.7 \pm 2.7\%$ in fluorescence intensity calculated on $CD8^+$ T cells in 56 consecutive donors; fig 3.a). This corresponds to multiple levels of CD3 (fig 3b). The CD4 T cells ($MdFI : 1\ 401 \pm 248$) have higher levels compared to $CD8^+$ T cells (1100 ± 178 ; $p < 0.0001$) but still the two sub populations have wide distribution of the number of molecules at their surface. Considering furthermore segmentation of the populations, we observed that T cells showed very different levels of CD3 expression in association with their clonotypes (fig 4).

Functional consequences of CD3 heterogeneity: T cell activation is triggered by the TCR recognition of the peptide-MHC complex. The engaged TCR-CD3 complexes are activated and internalized in a kinetic that depend on the TCR affinity for the peptide complex. The dynamic of activation is also highly dependent on the initial level of TCR-CD3 complex and one can expect different kinetics of T cells that express low or high density of CD3. Using anti-CD3-CD28 coated beads as activator, we have measured the T cell activation by measuring the induction of IL-2 receptor expression (CD25) at 30 hours in 13 healthy donors. We observed significant higher activation on CD3 high ($V\beta 8$ and $V\beta 9$) compared to CD3low clonotypes ($V\beta 2$ and $V\beta 3$; $p = 0.040$ to $p = 0.0003$; fig 5).

Discussion

With the help of the multiparameter immunolabeling, our results together with other reports in the literature highlight a rich phenotype diversity, some subtypes being significantly associated with different functions [1]. Using more and more simultaneous labeling will certainly increase their previous characterization. As an example CD4 is known to be required for the recognition of peptides bound to HLA II molecules supporting Antigen Presenting Cells cooperation with T helper cells while CD8 bind to HLA I that recognize non self peptide on any cell supporting $CD8^+$ T cell function against any potential target [5; 6; 10].

Каждая молекула связывается с определенным лигандом и выполняет самостоятельную функцию, причем эти функции носят комплементарный характер. Обычно CD4 и CD8 экспрессируются исключительно на Т-клетках. Однако мы и ряд других авторов показали, что некоторые подмножества Т-клеток асимметрично экспрессируют эти два ко-рецептора [11; 12]. Значение двойной экспрессии CD4 и CD8 не установлено, особенно на таких разных уровнях. Эти две молекулы экспрессируются в течение короткого времени в тех же количествах на очень ранних этапах развития незрелых клеток в тимусе. В процессе созревания определяется их специфическая роль, и ненужный белок исчезает, оставляя единственный маркер CD4 или CD8. Пока неизвестно, что является причиной выявления второго белка в некоторых редких клонах: его возвращение или персистенция при определенных условиях [13]. Можно предположить, что некоторые хелперные Т-клетки (CD4⁺) могут приобретать ту или иную степень эффекторной активности за счет присутствия на поверхности CD8 и наоборот.

Имеются описания CD8αα Т-клеток во внутриэпителиальных лимфоцитах кишечника [14]. Скорее всего, они представляют иммунитет слизистых оболочек подобно γδТ-клеткам, которые часто встречаются среди внутриэпителиальных лимфоцитов и также могут экспрессировать гомодимер CD8αα [15; 16]. CD8αα Т-клетки происходят из тимуса, но развиваются в лимфоидной ткани, ассоциирующей с кишечником, и их репертуар отличается от репертуара обычных CD8 Т-клеток [15]. Их лиганд, включая пептид, представляют неклассические молекулы ГКГС, которые пока точно не установлены.

Также intriguing выглядит олигоклональность этих необычных Т-клеток [17; 18]. Т-клетки обычно имеют небольшую ожидаемую продолжительность жизни, особенно в периферической крови. Доминирование и персистенция одного клонотипа предполагает сильную непрерывную стимуляцию. Присутствие субпопуляций Т-клеток связывают с хронической инфекцией ЦМВ [19–21]. Также показано, что CD4⁺CD8dim Т-клетки часто проявляют специфичность в отношении пептида ЦМВ *MLIPDDYSNTHSTRYVTVK* [22]. Этот специфический клон может быть представлен в большом количестве при острой или быстро прогрессирующей инфекции ЦМВ [19; 22] и играть роль в процессах старения [23].

Как показано для MGUS длительная персистенция отдельных клонов может предрасполагать организм к злокачественным нарушениям (миелома, В-клеточная лимфома). OCUS пока не связывают с Т-клеточной лимфомой. Кроме того, Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания встречаются редко по сравнению с высокой частотой случаев OCUS (напр., Т-клеточная лимфома). Однако в последних сообщениях указывается на прямую связь между постоянным стимулированием и развитием Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, связанных с ЦМВ [24; 25].

Each molecule bind to different ligand and correspond to separate but complementary functions. They are usually exclusively expressed on T cells. However, we and other have shown some T cell subsets that co-express asymmetrically the two co-receptors [11; 12]. The meaning of a double expression of CD4 and CD8 is not clear, especially with at such different levels. The two molecules are expressed transiently at similar levels very early in immature cells in thymus. During the maturation process, their specific role is decided and the useless protein disappears leaving either CD4 or CD8 single labeling. Whether the second protein come back under certain conditions or stay in some rare clones is not known [13]. This could suggest that some helper (CD4⁺) T cells can acquire some level of effector activity by bearing CD8 and vice and versa.

CD8 $\alpha\alpha$ T cells have been described in intra-epithelial lymphocytes of the gut [14]. They are more probably devoted to immunity of mucosae like $\gamma\delta$ T cells that are frequent among Intra-epithelial lymphocytes and can also express C8 $\alpha\alpha$ homodimer [15; 16]. The CD8 $\alpha\alpha$ T cells originate from Thymus but develop in the Gut Associated Lymphoid Tissue and have different repertoire compared to conventional CD8 T cells [15]. Their ligand including peptide most probably presented by non classical MHC molecules that are not completely identified yet.

The oligoclonality of these non conventional T cells is also intriguing [17; 18]. T cells usually have limited life expectancy, especially in peripheral blood. The predominance and persistence of one clonotype suggests a strong, continuous stimulation. The presence of T cell subsets has been linked to chronic CMV infection [19–21]. Furthermore, It has been shown that CD4⁺CD8dim T cells displayed frequently a specificity for the CMV peptide «*MLIPDDYSNTHSTRYTVK*» [22]. This specific clone can be over-represented following the acute or rapidly progressive CMV infection [19; 22] and can play a role in senescence [23].

As shown for MGUS, the long term persistence of single clones may expose to malignant disorders (*Myeloma, B cell lymphoma*). OCUS have not been related yet to T Lymphoma. Furthermore, T cell lymphoproliferative disorders are rare compared to the high frequency of patients with OCUS (ref T cell lymphoma). However recent reports have evidenced a direct link between sustained stimulus and the occurrence of T cell lymphoproliferative disorder for CMV [24; 25].

Существует большее число фенотипов, и наша работа не является исчерпывающей. Так, мультипараметрическое окрашивание позволяет идентифицировать очень точно различные этапы созревания и развития памяти Т-клеток от стадии «необученных» лимфоцитов до эффекторов или стадии долговременной памяти. Использование все большего числа параметров, возможно, позволит идентифицировать больше фенотипов – функциональных или необычных. Например, антиген CD56, который обычно экспрессируется на NK-клетках и участвует в механизмах цитотоксичности, может иногда встречаться на некоторых CD8⁺ Т-клетках, таких как $\gamma\delta$ Т-клетки [26]. Экспрессия CD56 на CD8⁺ Т-клетках может быть значительно повышена у некоторых больных. Пока клиническое значение этого феномена не установлено. Экспрессия CD56 также наблюдается на редких CD4⁺ Т-клетках с неустановленным клиническим значением [27]. Это открывает широкие перспективы иммуномониторинга.

В общем случае, есть тенденция рассматривать популяцию Т-клеток как гомогенную. Хорошо известно, что Т-клетки экспрессируют большое число разнообразных ТКР, чтобы связать как можно больше антигенов для обеспечения безопасности организма. Напрашивается предположение, что чем больше разнообразие рецепторов, тем выше степень иммунной защиты организма. Все разнообразные клонотипы поддерживаются в активном состоянии благодаря постоянным контактам с антигенами окружающей среды. Отсюда следует, что уменьшение разнообразия ТКР может означать утрату некоторой специфичности и возможное наличие дефектов в защитной системе организма. С другой стороны, сокращение разнообразия означает гипер-представительство других клонотипов, возможно слишком сильно реагирующих на некоторые антигены. Однако выраженная гипер-экспрессия одного клонотипа выше 20–30% встречается редко, и тогда возникает вопрос о причине появления этого клонотипа. По одной из гипотез причиной является хроническое, долговременное воздействие антигенов. Некоторые вирусы, особенно из семейства герпес-вируса (Эпштейна–Барр или цитомегаловирус) индуцируют хроническую инфекцию и возможно их длительная персистенция приводит к ослаблению иммунного ответа [19; 20; 28; 29]. Также можно предположить влияние и других персистирующих инфекций.

Другой уровень различий проявляется при рассмотрении исходной интенсивности экспрессии CD3-ТПК [3; 30]. Это явление, как правило, объясняют обычной биологической вариабельностью и приписывают неточности измерений. Однако экспрессия других молекул более однородна, и обычная вариабельность цитометрии ниже 10%. На основании полученных результатов мы считаем, что эта вариабельность имеет функциональное значение, учитывая существенное различие полученных величин. Уровни экспрессии значительно различались в зависимости от клонотипа.

More phenotypes can be observed and our report is not exhaustive. As an example, multiparameter labeling gives the possibility to identify very precisely, different steps in T cell maturity and memory development from naïve toward effector or long term memory stages. But more phenotypes, functional or unconventional are probably still to be identified using more and more parameters. As an example, CD56 that usually is expressed on NK cells and involved in cell cytotoxicity, can occasionally be expressed on some CD8+ T cells like $\gamma\delta$ T cells [26]. CD56 expression on CD8+T cells can be strongly enhanced in some patients. Its clinical signification is not elucidated yet. However, it is also possible to observe CD56 expression on rare CD4+ T cells with unknown significance [27]. This opens large perspectives in immune-monitoring.

Overall, even in one single subset, we tend to consider T cell as an homogenous population. It is well known that T cells express a very large diversity of TCR in order to cover as many antigens as possible for the safety of the body. We can easily suppose that wider the diversity is, higher the patient immunity will be. All different clonotypes are maintained active through regular exposure to environmental antigens related to strong sustained antigen exposure. Consequently, a reduced TCR diversity could mean the loss of some specificities and possible defects in protection of the body. On the other hand, a restriction of diversity means an overrepresentation of the other clonotypes, possibly with excessive response to some antigens. However, a strong over-expression of a single clonotype above 20–30% is rare and raises question on its cause. One hypothesis is a chronic, sustained exposure. Some viruses especially from the herpes family (Epstein-Barr or Cytomegalovirus) have been reported to induce chronic infection and possibly long persisting restricted immune response [19; 20; 28; 29]. More persisting infections or exposures can be suspected.

Another level of diversity appears when considering the level of initial level of CD3-TCR expression [3; 30]. This is usually considered as a usual biological variability and neglected, attributed to the incertitude of measure. But other expressions are much more homogeneous with and the usual variability in cytometry is below 10% of the value. Based on our results, we consider that this variability is has functional significance because of its large discrepancy.

Моделирование *in silico* позволяет прогнозировать различия динамики ранних этапов стимуляции, обуславливающей иммунный ответ, и эти теоретические данные можно подтвердить экспериментально [3; 31]. Все эти данные в совокупности показывают, что существуют некоторые различия в процессе развития Т-клетки, которые связаны с некоторыми клонотипами и определяют их специфичность.

Имеются сообщения о более сильной экспрессии CD3 $\gamma\delta$ Т-клетками [32]. Функциональное значение сильной экспрессии CD3 пока не установлено.

В заключение следует отметить, что анализ Т-клеток по мультипараметрическим критериям позволяет идентифицировать большое число подтипов. Это, в некотором смысле, является слишком упрощенной классификацией. Каждая отдельная Т-клетка имеет свои собственные характеристики и судьбу, которые мы пытаемся определить по анализу образцов. Анализ Т-клеток представляет определенные трудности, как и другие области социологии, однако такой подход с применением парадигмы «иммуносоциологии» может дать положительные результаты

Литература / References

1. Lambert C, Cristina I, Christian G. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of a new flowcytometer. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70(1):29–38.
2. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):336–45.
3. El Hentati FZ, Gruy F, Iobagiu C, Lambert C. Variability of CD3 membrane expression and T cell activation capacity. *Cytometry B Clin Cytom*;78(2):105–14.
4. Bachmann MF, Sebzda E, Kundig TM, Shahinian A, Speiser DE, Mak TW, et al. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur J Immunol* 1996;26(9):2017–22.
5. Feito MJ, Ballester S, Diez-Orejas R, Ojeda G, Criado G, Portoles P, et al. CD4 dependence of activation threshold and TCR signalling in mouse T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1997;45(2):166–74.
6. Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996;384(6609):577–81.
7. Borovsky Z, Mishan-Eisenberg G, Yaniv E, Rachmilewitz J. Serial triggering of T cell receptors results in incremental accumulation of signaling intermediates. *J Biol Chem* 2002;277(24):21529–36.
8. Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 2000;13(5):665–75.

The levels were significantly different according to the clonotypes. In silico simulation predict difference in dynamics of early steps of stimulation that drive the immune response and this theoretical data could be confirmed experimentally [3; 31]. Altogether this means that there are some differences that are innate in the T cell development and related to some clonotypes meaning some specificities.

The gamma-delta T cell have been reported to express higher level of CD3 [32]. This is at least true for one clonotype that is usually the only one expressed in the peripheral blood. One other clonotype can appear, mostly related to CMV infection too [33; 34]. The functional significance of the CD3 high expression is not elucidated yet.

In conclusion, analyzing T cell on multiparametric criteria leads to the identification of a large number of subtypes. This is somehow an over-simplified classification. Each individual T cell has its proper characteristics and fate that we try to qualify from sampling. The T cell analysis has similar difficulties as any type of sociology and could beneficieate from this approach through a new paradigm of «immunosociology».

9. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 2001;15(1):71–82.
10. Denkberg G, Cohen CJ, Reiter Y. Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J Immunol* 2001;167(1):270–6.
11. Prince HE, Golding J, York J. Characterization of circulating CD4+ CD8+ lymphocytes in healthy individuals prompted by identification of a blood donor with a markedly elevated level of CD4+ CD8+ lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1(5):597–605.
12. Ortolani C, Forti E, Radin E, Cibir R, Cossarizza A. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4+,CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191(2):601–9.
13. Kenny E, Mason D, Saoudi A, Pombo A, Ramirez F. CD8 alpha is an activation marker for a subset of peripheral CD4 T cells. *Eur J Immunol* 2004;34(5):1262–71.
14. Romero P, Cerottini JC, Luescher I. On the significance of CD8 alpha alpha expression for T cell memory. *Eur J Immunol* 2005;35(11):3092–4.
15. Imhof BA, Dunon D, Courtois D, Luhtala M, Vainio O. Intestinal CD8 alpha alpha and CD8 alpha beta intraepithelial lymphocytes are thymus derived and exhibit subtle differences in TCR beta repertoires. *J Immunol* 2000;165(12):6716–22.

16. *Pardigon N, Takeda K, Saunier B, Hornung F, Gibbs J, Weisberg A, et al.* CD8 alpha alpha-mediated intraepithelial lymphocyte snatching of thymic leukemia MHC class Ib molecules in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006;177(3):1590–8.
17. *Lambert C, Iobagiu C, Genin C.* Persistent oligoclonal CD4dimCD8+T cells in peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;66(1):10–7.
18. *Lambert C, Ibrahim M, Iobagiu C, Genin C.* Significance of unconventional peripheral CD4+CD8dim T cell subsets. *J Clin Immunol* 2005;25(5):418–27.
19. *Derhovanessian E, Maier AB, Hahnel K, Beck R, de Craen AJ, Slagboom EP, et al.* Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. *J Gen Virol*;92(Pt 12):2746–56.
20. *Iancu EM, Corthesy P, Baumgaertner P, Devere E, Voelter V, Romero P, et al.* Clonotype selection and composition of human CD8 T cells specific for persistent herpes viruses varies with differentiation but is stable over time. *J Immunol* 2009;183(1):319–31.
21. *Khan N.* The immunological burden of human cytomegalovirus infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007;55(5):299–308.
22. *Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Almeida J, Balanzategui A, Munoz-Criado S, Orfao A.* Association between the HLA haplotype and the TCR-Vbeta repertoire of anti-hCMV specific memory T-cells in immunocompetent healthy adults. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(5):371–9.
23. *Chou JP, Effros RB.* T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des*;19(9):1680–98.
24. *Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Barcena P, Almeida J, Ruiz-Cabello F, Tabernero MD, et al.* Expanded cells in monoclonal TCR-alphabeta+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood* 2008;112(12):4609–16.
25. *Richards SJ.* A "pathogenetic" role for CMV in CD4+ LGL proliferations. *Blood* 2008;112(12):4367–8.
26. *Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, et al.* Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*;118(12):3301–10.
27. *Barnaba V, Franco A, Paroli M, Benvenuto R, De Petrillo G, Burgio VL, et al.* Selective expansion of cytotoxic T lymphocytes with a CD4+CD56+ surface phenotype and a T helper type 1 profile of cytokine secretion in the liver of patients chronically infected with Hepatitis B virus. *J Immunol* 1994;152(6):3074–87.

28. Couzi L, Pitard V, Netzer S, Garrigue I, Lafon ME, Moreau JF, et al. Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* 2009;200(9):1415–24.
29. Koch S, Larbi A, Ozelik D, Solana R, Gouttefangeas C, Attig S, et al. Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1114:23–35.
30. Lambert C, Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;61(1):45–53.
31. Bidot C, Gruy F, Haudin CS, El Hentati F, Guy B, Lambert C. Mathematical modeling of T-cell activation kinetic. *J Comput Biol* 2008;15(1):105–28.
32. Thibault G, Bardos P. Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 1995;154(8):3814–20.
33. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001;184(5):533–41.
34. Par G, Rukavina D, Podack ER, Horanyi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G, et al. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 Tcr+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2002;37(4):514–22.

**НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН**



К.М. Аанеи^{1,3}, П. Фландрин-Греста^{1,3}, Э. Тавернье^{2,3}, Д. Гиота^{2,3}, Л. Кампос^{1,3}

РОЛЬ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

В ПАТОФИЗИОЛОГИИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

¹*Лаборатория гематологии, Больница Университета Сент-Этьен, Франция*

²*Институт онкологии, Больница Университета Сент-Этьен, Франция*

³*Лаборатория молекулярной биологии клетки, Университет Клода Бернара, Сент-Этьен, Франция*

Резюме

Управление гомеостазом микроокружения костного мозга, где происходит гематопоз, осуществляется в результате взаимодействий двух действующих лиц: ГСК и мезенхимальной стволовой клетки. Моделью нарушения клеточного гомеостаза может служить микроокружение при МДС, для которого характерны активный синтез цитокинов, нарушение апоптоза и иммунного ответа, аномальный ангиогенез и дефекты клеточной дифференцировки. В последние два года обсуждается вопрос о том, что это микроокружение является не безразличным зрителем, а скорее главным действующим лицом. На основании этой концепции проведен анализ морфометрических, фенотипических и функциональных свойств ключевого элемента микроокружения – МСК, которая является предшественником всех стромальных клеток.

Ключевые слова: мезенхимальная стромальная клетка, миелодиспластический синдром, молекулы адгезии, киназа фокальной адгезии.

Введение

При МДС микроокружение КМ выполняет функцию прекращения интрамедуллярного развития гематопозитических предшественников по механизму апоптоза, и эта аномальная функция, по-видимому, зависит не от выделения растворимых факторов, а от прямого клеточного контакта [1]. Одним из объяснений может служить то, что белки ФА за счет непосредственного контакта с цитоскелетом и сигнальными путями участвуют в трансдукции сигнала выживания, и их дисфункция наблюдается при целом ряде опухолей человека [2]. Микроокружение КМ также отвечает за отбор неопластических гематопозитических клонов, устойчивых к апоптозу и способных экспрессировать факторы, способствующие их собственному росту, пролиферации и миграции [3]. Ключевыми компонентами гематопозитического микроокружения являются МСК костного мозга, и как показал ряд исследований, их морфологические изменения в первичной культуре, полученной из образцов КМ у больных с МДС, сопровождающиеся геномными аномалиями [4; 5; 6; 7] и нарушениями роста по сравнению с нормальными клетками [4], частично коррелировали с активацией каспазы-3 [8].

Carmen Mariana Aanei^{1, 3}, Pascale Flandrin-Gresta^{1, 3}, Emmanuelle Tavernier^{2, 3}, Denis Guyotat^{2, 3}, Lydia Campos^{1, 3}

THE PLACE OF STROMAL MICROENVIRONMENT IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES (MDS) PATHOPHYSIOLOGY

¹Laboratoire d'Hématologie, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, Cedex 2, France

²Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, University Hospital of Saint-Etienne

³Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, UMR 5239 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine J. Lisfranc Saint-Etienne

Abstract

The relationships between two actors: the HSC and the mesenchymal stem cell control the homeostasis of bone marrow microenvironment where hematopoiesis occurs. The model of cellular homeostasis infringement is the microenvironment from MDS, characterized by a high synthesis of cytokines, disorders of apoptosis and immune response, abnormal angiogenesis and defects of cellular differentiation. The last two years argued that the microenvironment is not an indifferent spectator; it is actually the main protagonist.

Following this concept we have analyzed morphometric, phenotypic and functional the key element of the microenvironment, the MSCs which are the precursors of all stromal cells.

Key words: mesenchymal stromal cells, myelodysplastic syndromes, adhesion molecules, focal adhesion kinase

Introduction

In MDS, the BM microenvironment is responsible for the intramedullary abortion of haematopoietic precursors by apoptosis and this abnormal function appears to be dependent on direct cellular contact, rather than on the release of soluble factors [1]. A possible explanation is that FA proteins through their direct connection with the cytoskeleton and signalling pathways are involved in survival signal transduction, and their dysfunctions have reported in a wide variety of human tumours [2]. The BM microenvironment is also responsible for the selection of neoplastic haematopoietic clone(s), resistant to apoptosis and able to express factors promoting its (their) own growth, proliferation, and migration [3]. Bone marrow MSCs are key components of the haematopoietic microenvironment, and several studies indicate their morphological changes in primary cultures derived from MDS BMs compared to the normal counterparts [4] accompanied by genomic abnormalities [4; 5; 6; 7] and growth dysfunction partially correlated with caspase-3 activation [8].

В связи с этим, цель данного исследования состояла в анализе МСК – мультипотентных клеток, которые могут дифференцироваться во все компоненты стромы.

Дизайн и методы

Стромальные клетки КМ изолировали методом адгезии к пластику из образцов, полученных от 8 здоровых доноров (медиана возраста 63 года), 10 больных рефрактерной цитопенией (ПЦ) и 10 больных рефрактерной анемией с избытком бластных клеток (RAEB; 7 RAEB-1 и 3 RAEB-2). Медиана возраста больных составила 73 года. До начала исследования у всех больных и здоровых доноров было получено информированное согласие. Сначала были отобраны МСК в соответствии с минимальными требованиями, предложенными Комитетом по изучению мезенхимальных и тканевых стволовых клеток Международного общества клеточной терапии [9]. Для определения субпопуляций мезенхимальных клеток, амплифицированных в первичной культуре, использовали две молекулы CD73 (экзо-5'-5' нуклеотидаза, связанная с плазматической мембраной) и STRO-1 (антиген стромальных клеток-предшественников-1). Затем для характеристики фенотипа оценивали профили фенотипической экспрессии (гематопоэтические и эндотелиальные маркеры) и маркеров адгезии (VLA5 или α -5 β 1 интегрин (CD49e, CD29), ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии-1) или CD54 и белок внеклеточной матрицы CD44). Аналогично, методом иммуномагнитного клеточного сортирования отбирали клоногенные мезенхимальные предшественники и характеризовали их функциональные свойства. Для оценки экспрессии двух конститутивных белков комплексов ФАК и паксиллина и их регуляторных белков p130Cas и HSP90 в МСК, выделенных у больных МДС, по сравнению с нормой использовали методы количественной иммунофлуоресцентной микроскопии и колокализации при помощи пакета программ IMAGEJ 1.42i (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Устанавливали статистические корреляции экспрессии этих белков и пролиферативной способности МСК с потенциалом гематопоэтического роста.

Результаты и обсуждение

В результате положительного отбора EasySep® были изолированы две фракции клеток STRO-1 + CD73 – и STRO-1 – CD73 +, которые различались по фенотипической экспрессии и кинетике роста.

В культуре нормальных МСК популяция STRO-1 + CD73 – была менее многочисленной, клетки имели округлую или веретенообразную форму, размер клеток в этой популяции колебался в диапазоне от 5 до 26 мкм. Популяция имела фенотип CD45^{low}, экспрессировала небольшое количество молекул адгезии и эндотелиальных маркеров CD31 (PECAM-1) и CD106 (VCAM-1; рис. 1; см. вклейку).

Thus, the purpose of the present study was to evaluate the MSCs, multipotent cells that can differentiate into all stromal components.

Design and methods

BM-derived stromal cells were isolated by plastic adherence from 8 healthy donors (median age, 63 years), 10 RC patients, and 10 patients with refractory anemia with excess blasts (RAEB; 7 RAEB-1 & 3 RAEB-2). The median patient age was 73 years. Informed consent was obtained from patients and healthy donors prior to the study. The first attempt was to select the MSC in order to meet the minimal requirements proposed by Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy [9]. To this end, two molecules CD73 (plasma membrane-bound ecto-5'-5'-nucleotidase) and STRO-1 (stromal precursor antigen-1) has employed to defined the mesenchymal cells subpopulations amplified in primary cultures. Thereafter, the phenotypic expression (hematopoietic- and endothelium-related markers) and adhesion markers profiles (VLA5 or α -5 β 1 integrin (CD49e, CD29), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) or CD54 and the extracellular matrix protein CD44) have evaluated in order to characterized them. Likewise, we selected the clonogenic mesenchymal precursors by immunomagnetic cell sorting, and we performed their functional characterization. The quantitative immunofluorescence microscopy and colocalization study had performed using IMAGEJ 1.42l software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) in order to assess the expression of two constitutive proteins of FA complexes, FAK, paxillin, and of their regulatory proteins, p130Cas and HSP90, in MSCs selected from myelodysplasia comparatively with normal counterpart. Statistical correlations have carried between the expression of these proteins and the MSC proliferation capacity and with hematopoietic growth abilities.

Results and discussion

During EasySep® positive selection, two fractions of cells have isolated: STRO-1+CD73- and STRO-1-CD73+ different as phenotypic expression and growth kinetics.

In normal MSC cultures, the STRO-1+ CD73- population is less abundant and displays a rounded or spindle shape, and, in terms of size, the cells in this population range from 5 to 26 μ m. Phenotypically, they are CD45 $\pm$ ^{low}, express low levels of adhesion molecules, and the endothelial-related markers CD31(PECAM-1) and CD106 (VCAM-1; fig. 1; see insert).

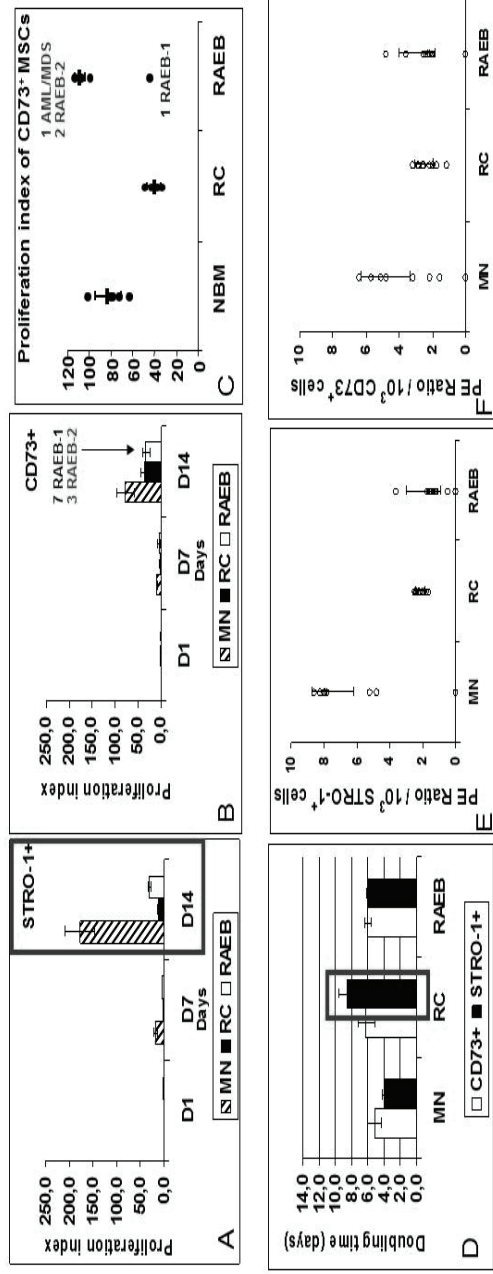
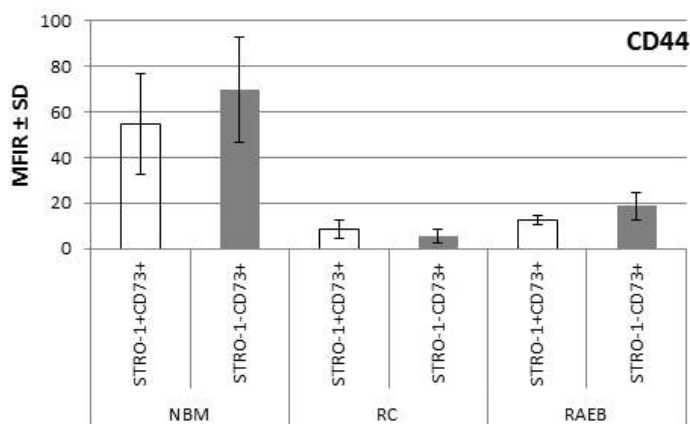
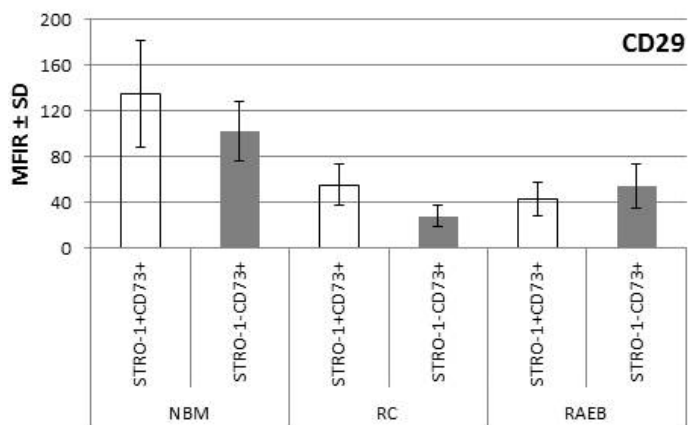


Рис. 2. Содержание и характеристики роста клеток STRO-1+ CD73- и STRO-1-CD73+ у больных с МДС и здоровых доноров. Индекс пролиферации (PI; A-C), время удвоения числа клеток (DT; D) и эффективность посева (PE; E, F) фракций клеток STRO-1+ и CD73+ у больных с МДС и здоровых доноров. Все значения выражены как $M \pm m$. Результаты, полученные в разных группах больных для двух исследованных фракций, показали статистически значимые различия ($P < 0,005$). Показатели PI, DT и PE оценивали во время сбора (конфлюэнтность 80%, 14 дней культивирования) для 10^5 посеянных клеток. Рисунок приводится с изменениями по Aanei et al., 2012 [10].

Fig. 2. Cell yield and the growth characteristics of STRO-1+ CD73- and STRO-1-CD73+ sorted cells from MDS patients compared to cells from healthy donors

Proliferation index (PI; A-C), cell-doubling time (DT; D) and plating efficiency ratio (PE ratio; E, F) of STRO-1+ and CD73+ cell fractions from MDS patients compared with normal cells. All values indicate the mean $\pm$ DS. The results obtained for different groups of cases and for the two fractions investigated were significantly different ($P < 0.05$). PI, DT, and PE ratio were evaluated at the time of harvesting (80% confluence; 14 days of culture) for 10^5 seeded cells. Figure adapted from Aanei et al, 2012 [10].



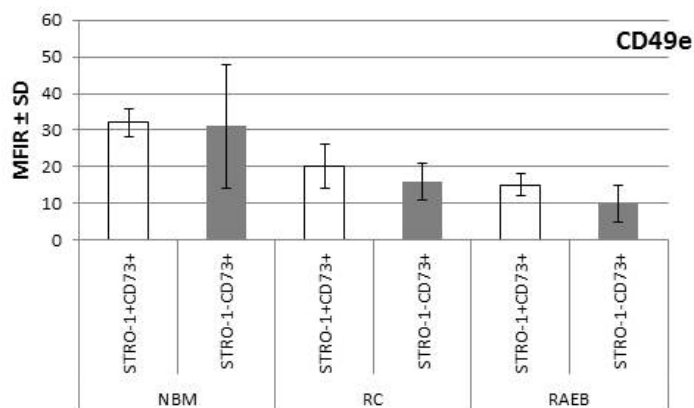
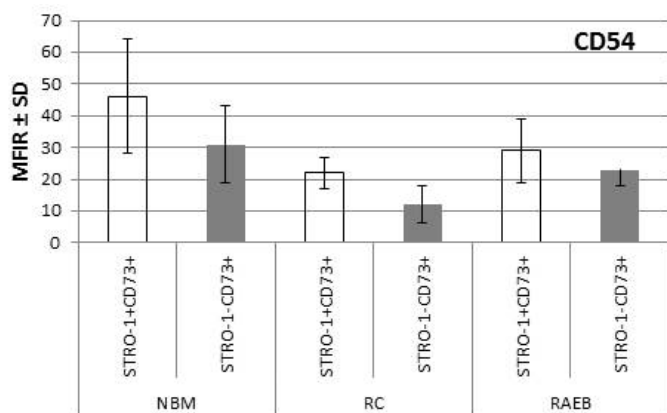


Рис. 3. Экспрессия молекул адгезии на МСК КМ, выделенных у больных с МДС по сравнению с таковыми, полученными у здоровых доноров.

Столбики показывают средний коэффициент интенсивности флуоресценции для экспрессии маркеров адгезии на STRO-1 + CD73 + и STRO-1 – CD73 + клетках по оценке на 20-й день культивирования в пяти независимых экспериментах.

Fig. 3. Adhesion molecules expression on BM-MSC isolated from MDS patients compared with that of healthy volunteers

The columns represent mean $\pm$ SD of mean fluorescence intensity ratio (MFIR) of adhesion marker expression on STRO-1+ CD73⁺ and STRO-1– CD73⁺ cells from the five independent experiments, evaluated in 20th days of cultures.

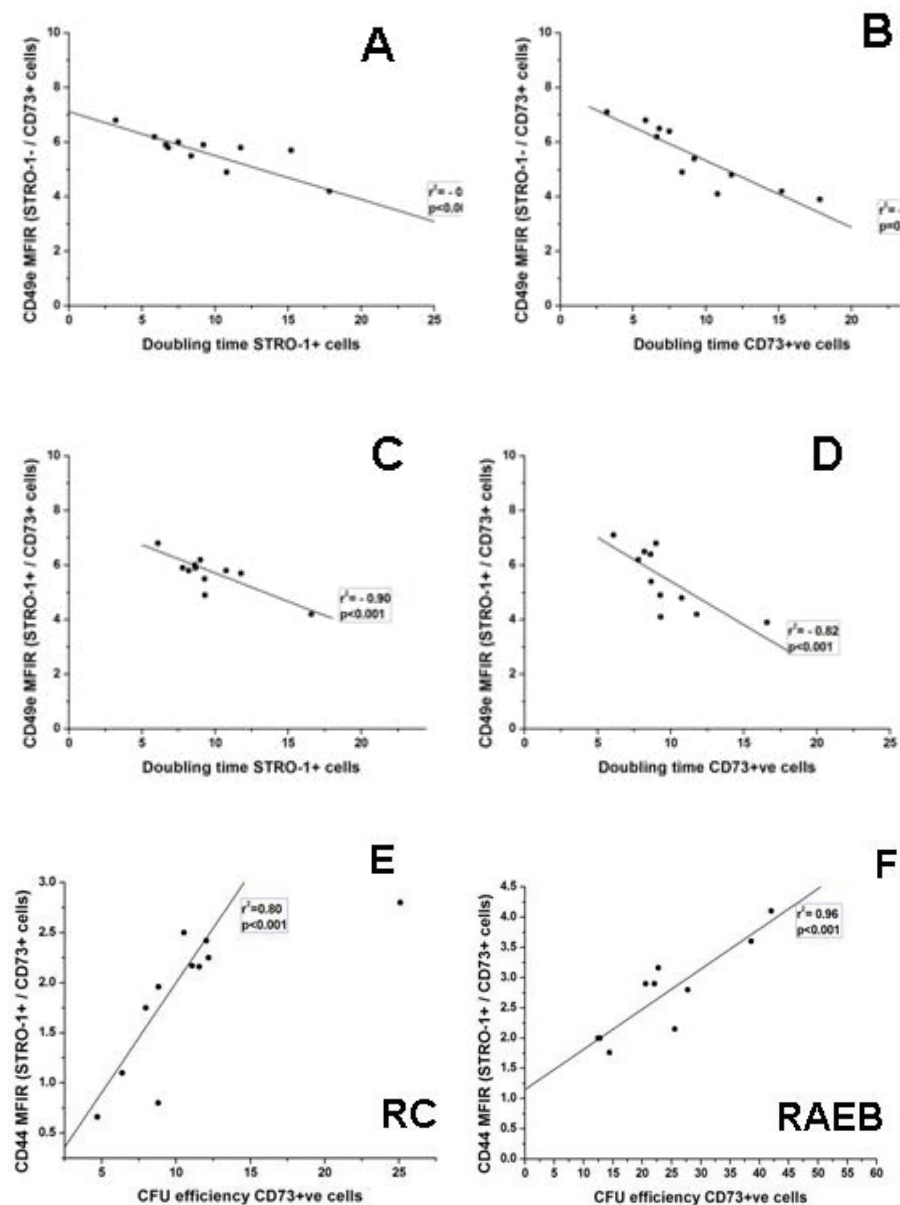


Рис. 4. Значение экспрессии молекул адгезии для роста МСК у больных с МДС.

Рост МСК представляет собой процесс, зависимый от адгезии, в котором участвуют молекулы CD44 и CD49e. Экспрессия CD49e в патологических МСК и ее влияние на пролиферативный потенциал STRO-1 + и CD73 + клеток (A–D). Клоногенная способность МСК демонстрирует положительную корреляцию с экспрессией CD44 (E, F). Эффективность КОЕ CD73 + клеток рассчитывали для 1×10^3 посеянных МСК. Рисунок приводится с изменениями по Aanei et al., 2012 [10].

Fig. 4. The significance of adhesion molecules expression for MSC growth in MDS settings.

MSC expansion is an adhesion-dependent process, and the CD44 and CD49e molecules are involved in this process. CD49e expression in pathological MSCs and its impact on the proliferative potential of STRO-1+ and CD73+ cells (A–D). The MSCs clonogenic capacity directly correlates with CD44 expression (E, F). The CFU efficiency of CD73+ cells was calculated for 1×10^3 seeded MSCs. Figure reprinted from Aanei et al, 2012 [10].

В отношении способности роста эти клетки имели более высокий индекс пролиферации и клоногенный потенциал в 1,5 раза выше, чем клетки STRO-1–CD73 + (рис. 2). В то же время фракция STRO-1–CD73 + включала более крупные (в среднем 50–110 мкм) и более гранулярные клетки, не экспрессирующие эндотелиальные или гематопозитические маркеры (рис. 1). Однако эти клетки экспрессировали высокие уровни маркеров адгезии CD44, CD54, CD29 и CD49e и имели более низкую скорость пролиферации ($77,99 \pm 19,85/10^3$ посеянных CD73 + клеток против $200,0 \pm 32,45/10^3$ посеянных STRO-1 + клеток; рис. 2).

При МДС наблюдалось увеличение STRO-1 + клеток, коэкспрессирующих CD106 и CD31, в период с 20-го по 30-й дни культивирования ($45,1\% \pm 2,3\%$ в группе РЦ, $41,5\% \pm 11,6\%$ в группе RAEB по сравнению с $26\% \pm 7,5\%$ в культурах нормальных МСК). Это увеличение количества STRO-1 + клеток в группе РЦ сохранялось до 60 дней. Также при МДС клетки CD73 + STRO-1 – отличались по размеру от нормальных клеток ($109,1 \pm 50,1$ мкм/ $56,5 \pm 27,9$ мкм в группе RAEB, $39,2 \pm 38,7$ мкм/ $20,4 \pm 10,7$ мкм в группе РЦ по сравнению с $83,8 \pm 27,5$ мкм/ $38,4 \pm 18,0$ мкм в группе нормальных МСК).

Кроме того, морфометрические модификации ассоциировались с дефицитом роста клеток у больных МДС. Обращает внимание выраженное снижение скорости пролиферации МСК как при РЦ, так и при RAEB, главным образом обусловленное снижением пролиферации фракции STRO-1 + клеток (рис. 2 А, D). Что касается CD73 + фракций, наблюдались различия между двумя группами заболеваний. В группе РЦ отмечалось выраженное снижение, а в группе RAEB – два различных типа роста: в группе RAEB-1 сходный с таковым в группе РЦ, а в группе RAEB-2 высокая скорость пролиферации. Клоногенная способность фракций, выделенных у больных МДС, была сильно снижена, причем различия были выражены сильнее во фракции STRO-1 + CD73 – (рис. 2). Мы также наблюдали снижение экспрессии молекул адгезии CD29, CD54 и CD49e на поверхности МСК при МДС (рис. 3), а также статистически значимую корреляцию между снижением экспрессии этих молекул, особенно CD44 и CD49e, и стабильным снижением пролиферации и клоногенной способности (рис. 4).

Иммунофлуоресцентный анализ, проведенный для оценки экспрессии белков ФА и их регуляторов, позволил выявить количественные и качественные различия между нормальными и патологическими МСК. В МСК RAEB отмечалось повышение экспрессии HSP90 α/β , pFAK [Y³⁹⁷] и паксиллина, причем как на мелких (S-MSK), так и на крупных, более зрелых клетках (L-MSK) (рис. 5). Также установлено, что если в норме молекула HSP90 α/β образует комплексы с паксиллином, то эта колокализация отмечается на части (20–30%) нормальных МСК. В то же время при RAEB этот процесс характерен для большинства (80–90%) клеток, и в комплекс включается высокофосфорилированная форма [pY³⁹⁷] белка FAK (рис. 6).

In terms of growth abilities, these cells show a higher proliferation index, and they have clonogenic potential 1.5 times greater than their STRO-1[−] CD73⁺ counterparts (Fig. 2). By contrast, the STRO-1[−]CD73⁺ fraction includes larger (50 to 110 μm , on average) and more granular cells that are negative for endothelial- and hematopoietic-related markers (Fig. 1), but they express increased levels of the adhesion markers CD44, CD54, CD29, and CD49e, and have a lower rate of proliferation ($77.99 \pm 19.85/10^3$ CD73⁺ seeded cells vs. $200.0 \pm 32.45/10^3$ STRO-1⁺ seeded cells) (Fig. 2).

Under the MDS condition, we noticed a higher number of STRO-1⁺ cells that coexpressed CD106 and CD31 between 20 and 30 days of culture ($45.1\% \pm 2.3\%$ in RC group, respectively $41.5\% \pm 11.6\%$ in RAEB compared to $26\% \pm 7.5\%$ of normal MSC cultures). This increase of STRO-1⁺ cells persists until 60 days in the cultures generated from RC group. Moreover, in MDS conditions, we have noticed variations of CD73⁺ STRO-1[−] cells size compared to normal cells ($109.1 \pm 50.1 \mu\text{m}$ / $56.5 \pm 27.9 \mu\text{m}$ in RAEB group, and $39.2 \pm 38.7 \mu\text{m}$ / $20.4 \pm 10.7 \mu\text{m}$ in RC group compared to $83.8 \pm 27.5 \mu\text{m}$ / $38.4 \pm 18.0 \mu\text{m}$ in normal MSC group).

In addition, the morphometric modifications are associated to growth deficiencies of MDS selected cells. Of noted is the remarkable decline of the MSCs proliferation rates, both in RC, as well as in RAEB, due mainly to the mitigate of proliferation of STRO-1⁺ fractions (fig. 2 A, D). Instead for the CD73⁺ fractions there are differences between the two groups of diseases. In RC group is an obvious decrease, while in RAEB group are distinguishes two broad patterns of growth: the RAEB-1 group having a behavior close to RC group, while the RAEB-2 group showing a high proliferative rate. In addition, the clonogenic ability of the fractions selected from MDS settings was strongly diminished, and the differences were more noticeable for the STRO-1⁺ CD73[−] cells (Fig. 2).

Thereafter, we observed a decline of the adhesion molecules CD29, CD54, CD44 and CD49e expression on MSC surface in MDS settings (fig. 3) and a significant correlation between the diminution of expression of these molecules, especially for CD44 and CD49e, with their steady decline of proliferation and clonogenicity (fig. 4).

Likewise, the immunofluorescence experiments conducted to evaluate the expression of FA proteins and their regulators allowed the identification of qualitative and quantitative differences between normal and pathological MSCs. Increased levels of expression of HSP90 α/β , pFAK [Y³⁹⁷], and paxillin are observed in RAEB-MSCs, both in smaller cells (S-MSCs), and in those large, more mature cells (L-MSCs; fig. 5). Moreover, even that in normal conditions HSP90 α/β form complexes with paxillin, this colocalisation concerns a part (20–30%) of normal MSC. By contrast, in RAEB settings this process concerns the most of the MSC cells (80–90% of cells) and engages into this complex the highly phosphorylated form [p^{Y³⁹⁷}] of the FAK protein (fig. 6).

Присутствие pFAK [Y³⁹⁷] в этом комплексе способствует удерживанию паксиллина в ядре и прекращению рециклинга этих белков, опосредованного протеасомами. Накопление паксиллина в ядре ассоциировалось с повышением пролиферации МСК при RAEB, что согласуется с данными Dong et al. (рис. 7).

Результаты проведенного исследования позволяют сделать еще одно предположение о возможной роли pFAK [Y³⁹⁷] во взаимодействиях МСК-ГПК и модуляции клоногенной способности ГПК. Повышение экспрессии pFAK [Y³⁹⁷] в МСК коррелировало со снижением пролиферативной способности гематopoэтических предшественников (ГПК из группы больных с RAEB образовывали в 4 раза, а в группе РЦ в 1,5 раза меньше БОЕ-Э и КОЕ-ГМ, чем контрольные ГПК) (рис. 8).

Выводы

Полученные результаты подтверждают концепцию «плохих зерен в плохой почве», лежащую в основе неопластической трансформации при МДС.

Мы доказали, что МСК, выделенные у больных с МДС, демонстрируют патологическое поведение в опытах *in vitro* и принимают активное участие в некоторых сигнальных путях неоплазии с привлечением процессов, связанных с адгезией, таких как клеточная пролиферация и клоногенный рост.

Структурный и функциональный анализ позволил выявить морфо- и иммунофенотипы, которые могут участвовать в конфликте между ГПК и «адгезивным» микроокружением, а также показал, что данную модель исследования *in vitro* можно использовать для изучения взаимосвязей между этими двумя партнерами.

Установление патологических механизмов, связанных со стромой, может стать основой для разработки альтернативных терапевтических подходов, например, сигнальная активность посредством белков ФА может участвовать во взаимодействиях ГПК и МСК, а если принять, что FAK является одним из белков-клиентов HSP90αβ, то можно использовать ингибиторы HSP90αβ в адьювантной терапии миелодисплазии.

Литература / References

1. Tauro S, Hepburn MD, Peddie CM, Bowen DT, Pippard MJ, Functional disturbance of marrow stromal microenvironment in the Myelodysplastic syndromes, *Leukemia* 16 (2002) 785–790.
2. Golubovskaya V, Cance W, Focal adhesion kinase signaling cancer, *International Review of Cytology* 263 (2007) 103–153.
3. Dührsen U, Hossfeld DK, Stromal dysfunction in neoplastic bone marrow diseases, *Annals of Hematology* 73 (1996) 53–70.

The presence of pFAK [Y³⁹⁷] in this complex contributes to the arrests of the paxillin into nucleus along with the cessation of proteasome-mediated recycling of these proteins. The nuclear accumulation of paxillin has associated with a proliferative advantage of MSCs from RAEB, in line with previously observations of Dong et al. (Fig. 7).

Another assumption that arises from this study involves the putative role of pFAK [Y³⁹⁷] in MSC-HPC interactions and modulation of HPC clonogenicity. Increased levels of expression of pFAK [Y³⁹⁷] in MSCs correlated with decreased proliferation capacity of haematopoietic progenitors (i.e., HPCs from the RAEB group formed 4-fold, and those from RC group 1.5-fold fewer BFU-E and CFU-GM than control HPCs) (Fig. 8).

Conclusions

These results reinforce the concept «bad seeds in bad soil» that underlies the neoplastic evolution in MDS settings.

Herein we bring arguments that MSCs isolated from MDS have a pathological behaviour in *in vitro* cultures and that they actively contribute in some neoplastic signalling pathways involving the adhesion-related processes, such as cell proliferation and clonogenic growth.

Structural and functional analysis allowed us the recognition of morpho- and immunophenotypes that could be involved in the conflict between HSC — «adhesive» microenvironment, proposing also an *in vitro* study model of the relationship between these two partners.

The perception of the stroma-related disease mechanisms may underlie the development of alternative therapeutic approaches, e.g. signalling via FA proteins could be implicated in HPC-to-MSK interactions, and, considering that FAK is one of HSP90αβ-client proteins, enhance the utility of HSP90αβ inhibitors as adjuvant in myelodysplasia therapy.

4. Yüksel MK, Topçuoğlu P, Kurdal M, İlhan O, The clonogenic potential of hematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells in various hematologic diseases: a pilot study, *Cytotherapy* 12 (2010) 38–44.
5. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization, *Leukemia Research* 29 (2005) 215–224.
6. Blau O, Baldus CD, Hofmann W-K, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, Türkmén S, Benlasfer O, Schumann E, Sindram A, Molkentin M, Mundlos S, Keilholz U, Thiel E, Blau IW, Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood*. 2011; 118:5583–5592.

7. Santamaria C, Muntion S, Roson B, Blanco B, Lopez-Villar O, Carrancio S, Sanchez-Guijo F, Diez-Campelo M, Alvarez-Fernandez S, Sarasquete ME, J de las Rivas, Gonzalez M, San Miguel JF, MC del Canizo, Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndromes patients. *Haematologica*. 2012; 97(8):1218–24.
8. Boudard D, Viallet A, Piselli S, Guyotat D, Campos L, *In vitro* study of stromal cell defects in myelodysplastic syndromes, *Haematologica* 88 (2003) 827–829.
9. Dominici M, K Le Blanc, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ and Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
10. Aanei CM, Flandrin P, Carasevici E, Guyotat D, Wattel E, Campos L, Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells (MSCs) in myelodysplastic syndromes (MDS), *Stem Cells and Development* (2012); 21(10):1604–15.
11. Aanei CM, Zugun Eloae F, Flandrin P, Tavernier E, Carasevici E, Guyotat D, Campos L, Focal adhesion protein abnormalities in myelodysplastic mesenchymal stromal cells, *Experimental Cell Research* 317 (2011); 2616–2629.
12. Dong JM, Lau LS, Ng YW, Lim L, Manser E, Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD4 motif: evidence that nuclear paxillin promotes cell proliferation, *Biochemical Journal* 418 (2009) 173–184.

**НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН**



Arjan A. van de Loosdrecht, MD, PhD and Theresia M. Westers, PhD

THE EMERGING IMPACT OF FLOW CYTOMETRY IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Department of Hematology, Cancer Center Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

All correspondence to:

Arjan A. van de Loosdrecht, MD, PhD; Department of Hematology, Cancer Center Amsterdam, VU University Medical Center; De Boelelaan 1117; 1081 HV, Amsterdam; The Netherlands. Tel: +31-20-4442604; Fax: +31-20-4442601.

E-mail: a.vandeloosdrecht@vumc.nl

Abstract

FC is recognized as one of the important tools in the diagnosis of MDS especially when cytomorphology and cytogenetics are inconclusive. Minimal requirements to analyze dysplasia by FC have been proposed by the International Workshops from the European LeukemiaNet on Standardization of FC in MDS. FC should be considered part of an integrated diagnosis, rather than a separate technique. Here, we highlight issues to implement FC in the diagnostic work-up of MDS. Next to that, current advances of FC in diagnosis and prognosis of MDS are introduced.

Introduction

Although cytomorphology is the mainstay in the diagnosis of MDS it may be ambiguous, especially in cases with low blast counts and mild dysplastic features. In particular, in cytopenic patients with normal or inconclusive morphology and normal cytogenetics, additional diagnostic markers are necessary. FC can play a key role. Flow cytometry has been introduced as an important co-criterion in the diagnosis of MDS. Moreover, it has been recommended recently as a tool in the diagnostic work-up of MDS if performed according to the guidelines as defined by the European LeukemiaNet (ELNet) Working Party on «Standardization of FC in MDS».[1–4] ELNet reports describe recommendations on implementation of FC (i.e. technical issues as sample preparation, instrument set-up and quality assessment, acquisition of data and gating strategy); the ELNet working group also proposes minimal criteria for the diagnosis and prognostic evaluation of MDS and other cytopenias [2;3].

Analysis of bone marrow cells by FC can identify specific aberrations in both immature and maturing compartments among different hematopoietic lineages. Since, MDS comprises a heterogeneous group of myeloid neoplasms, it is unlikely that a single specific marker can discriminate MDS from other cytopenias.

Hence, the presence of multiple aberrancies has a higher predictive value for MDS than single aberrancies.[5–8] In line with this, current WHO2008 recommendations recognize the presence of three or more FC aberrancies as indicative of MDS.[9]

As demonstrated in a multicenter study on behalf of the ELNet, application of only four parameters enables to distinguish low-risk MDS without other specific markers (i.e. cytogenetics or ring sideroblasts) from non-clonal cytopenias.[10] The key parameters within this score are: i) an increase in CD34+ progenitor cells within bone marrow nucleated cells ($\geq 2\%$); ii) a decreased percentage of progenitor B cells within the CD34+ compartment ($\leq 5\%$); iii) a decrease or increase of CD45 expression level on myeloid progenitor cells as compared to lymphocytes as a reference (≤ 4 or ≥ 7.5) and iv) a decrease in SSC of neutrophils as compared to lymphocytes (≤ 6). The presence of two or more of these specific aberrancies identified 70% of low-risk MDS cases with a specificity of 93%.[10] Assessment of FC aberrancies of myeloid progenitor cells and the maturing myelomonocytic compartment can add valuable information.[5; 11] Furthermore, FC analysis of erythroid dysplasia might provide supplementary information, particularly within low-risk MDS.[12–14] Few applications are available for FC analysis of the megakaryocytic lineage but no standardized approach is yet available [15]. The next paragraphs summarize current recommendations for FC analysis in MDS. Of note, evaluation of dysplasia by FC necessitates knowledge of expression levels in appropriate normal and pathological bone marrow controls.

Evaluation of dysplasia in the immature myeloid progenitor compartment

The immature cell compartment is very heterogeneous. Therefore, beyond the classic CD45^{dim}/SSC^{low/int} profile, antibody combinations such as CD45/CD34/CD117/HLA-DR and CD45/CD34/CD123/HLA-DR are instrumental to identify myeloid progenitor cells (CD45^{dim} and SSC^{low/int}) among other populations that show overlapping CD45 and SSC features (e.g. B cell precursors, plasma cells, monoblasts, basophils, erythroblasts and plasmacytoid dendritic cell precursors).[2] Observed aberrancies in the immature myeloid compartment in MDS are an abnormal intensity or lack of expression of CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, asynchronous presence of CD11b, and/or the expression of lineage infidelity markers such as CD5, CD7 or CD56 [5; 7; 11; 12; 16–19].

Evaluation of dysplasia in the neutrophil compartment

Maturing neutrophils are identified by their CD45^{int}SSC^{int-bright} profile. Other markers such as CD33, CD64, HLA-DR and CD11b are useful in distinguishing monocytes and hypogranular neutrophils. Neutrophils display diminished CD33 and CD64 expression, heterogeneous to bright CD11b and mostly lack HLA-DR as compared to CD33^{bright}, HLA-DR+ and CD11b+ monocytes. One of the most frequently reported FC aberrancies in the maturing neutrophil compartment is an abnormally decreased SSC reflecting hypogranularity (example in Fig. see insert) [2].

Next to decreased SSC, dysplastic neutrophils can display aberrant expression levels of certain antigens or an aberrant relationship among two or more antigens, e.g. aberrant relationships between CD13 and CD11b and/or CD13 and CD16 and between CD15 and CD10 (Fig.).[2; 3]

Evaluation of dysplasia in the monocytic compartment

Morphological assessment of dysmonopoiesis in MDS is difficult unless there is marked monocytosis. By FC, monocytes can be defined based on their CD45 expression (intermediate-bright), SSC (intermediate) and additional markers such as HLA-DR, CD11b, CD64, CD36, CD33 and CD14. The use of CD14 alone may underestimate the percentage of monocytic cells particularly when immature forms are present. Aberrancies of interest in the monocytic lineage are an abnormal distribution of maturation stages, abnormal relationships of HLA-DR and CD11b, abnormal intensity of CD13 and overexpression of CD56. CD56 (and CD2) may even contribute to discriminate chronic myelomonocytic leukemia (CMML) from MDS/myeloproliferative neoplasms. [20; 21]

Evaluation of dysplasia in the erythroid compartment

The erythroid population can be defined by its very dim to negative of CD45 expression and low FSC and SSC properties. Commonly applied markers are CD45, CD71, CD235a, CD36, CD117, and less frequently CD105. One of the most frequently observed aberrancies (80% of low-risk MDS) is an increased number of erythroid progenitors associated with a larger proportion of immature erythroid cells (CD117+ or CD105+). Furthermore, in approximately 70% of the patients, abnormal relationship of CD71 vs. CD235a and/or decreased expression of CD36 is observed. [7; 12–14; 22]

Flow cytometry and prognosis of MDS

Thus far, the only validated prognostic FC score is the FC scoring system by Wells et al. [5; 8; 19; 23] This flow score weighs the percentage of myeloid progenitor cells and their aberrancies and the amount of aberrancies in the maturing myelomonocytic compartment. In clinical practice, WHO classification, International Prognostic Scoring System (IPSS and IPSS-revised) and WHO-based Prognostic Scoring System (WPSS) are all well validated and applied routinely. [9; 24–26] Interestingly, within the subgroups or risk groups of the WHO, IPSS(-revised) and WPSS flow scores are rather heterogeneous. This implies that FC can identify patients with worse prognosis within validated risk categories.

Application of flow cytometry in predicting and monitoring treatment response

Subgroups of in low and int-1 risk MDS with distinct clinical behaviour regarding transfusion dependency and progression can be identified by FC analysis of

bone marrow cells. [19] Moreover, in a clinical decision model the absence of aberrant myeloid progenitors as assessed by FC in combination with low endogenous erythropoietin levels is predictive for response to growth factor treatment. [27] In addition, aberrant marker expression on myeloid progenitors cells identifies patients who may not benefit from treatment with hypomethylating agents such as azacitidine in intermediate-2 and high risk MDS. [28] There are few data indicating that patients in complete remission for AML after high dose chemotherapy but with FC dysplasia might have worse clinical outcome suggesting persistence of (previously) undefined MDS. Finally, specific flow signatures are being recognized within specific cytogenetic subgroups such as in MDS with isolated del(5q). These flow signatures might have impact in monitoring MDS during treatment with lenalidomide.

Concluding remarks

Flow cytometric analysis is recognized and even recommended as tool for diagnosis of MDS when performed according to the ELNet guidelines. [2; 3] Noteworthy, FC in MDS should only be applied as part of an integrated diagnostic approach. Results from FC analysis can add to better prognostification. Current investigations focus on the role of FC in monitoring the course of the disease in untreated (low risk) MDS patients and in the selection of patients who might benefit from emerging new drugs in low and high risk MDS.

Acknowledgements

We would like to thank all participants of the ELNet and Dutch MDS FC working groups for providing input in the development of the ELNet guidelines for the assessments of FC in MDS.

References

1. Valent P., Horny H.P., Bennett J.M., Fonatsch C., Germing U., Greenberg P., et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk. Res.* 2007 Jun; 31(6): 727–36.
2. van de Loosdrecht A.A., Alhan C., Bene M.C., Della Porta M.G., Drager A.M., Feuillard J. et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009, Aug; 94(8):1124–34.

3. *Westers T.M., Ireland R., Kern W., Alhan C., Balleisen J.S., Bettelheim P. et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012 Jul;26(7):1730–41.
4. *Malcovati L., Malcovati L., Bowen D., Cermak J. et al.* Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults. Recommendations from the European Leukemia Net. Submitted for publication.
5. *Wells D.A., Benesch M., Loken M.R., Vallejo C., Myerson D., Leisenring W.M. et al.* Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003 Jul 1;102(1):394–403.
6. *Arroyo J.L., Fernandez M.E., Hernandez J.M., Orfao A., San Miguel J.F., Del Canizo M.C.* Impact of immunophenotype on prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. Its value in patients without karyotypic abnormalities. *Hematol J* 2004;5(3):227–33.
7. *Malcovati L., Della Porta M.G., Lunghi M., Pascutto C., Vanelli L., Travaglini E. et al.* Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2005 May;19(5):776–83.
8. *Scott B.L., Wells D.A., Loken M.R., Myerson D., Leisenring W.M., Deeg H.J.* Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008 Oct 1;112(7):2681–6.
9. *Brunning R., Orazi A., Germing U., LeBeau M.M., Porwit A., Baumann I. et al.* Myelodysplastic syndromes/neoplasms. In: Swerdlow et al., editor. WHO classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
10. *Della Porta M.G., Picone C., Pascutto C., Malcovati L., Tamura H., Handa H. et al.* Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 2012 Aug; 97(8): 1209–17.
11. *Tang G., Jorgensen J.L., Zhou Y., Hu Y., Kersh M., Garcia-Manero G. et al.* Multi-color CD34⁺ progenitor-focused flow cytometric assay in evaluation of myelodysplastic syndromes in patients with post cancer therapy cytopenia. *Leuk. Res.*, 2012 Aug; 36(8): 974–81.
12. *Stetler-Stevenson M., Arthur D.C., Jabbour N., Xie X.Y., Mollidrem J., Barrett A.J. et al.* Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001, Aug 15; 98(4): 979–87.
13. *Della Porta M.G., Malcovati L., Invernizzi R., Travaglini E., Pascutto C., Maffioli M., et al.* Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006 Apr; 20(4): 549–55.

14. Matarraz S., Lopez A., Barrena S., Fernandez C., Jensen E., Flores-Montero J. *et al.* Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on A series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 May;78(3):154–68.
15. Sandes A.F., Yamamoto M., Matarraz S., Chauffaille M.L., Quijano S., Lopez A. *et al.* Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2012 Jun;97(6):895–902.
16. Ogata K., Nakamura K., Yokose N., Tamura H., Tachibana M., Taniguchi O. *et al.* Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002 Dec 1;100(12):
17. Stachurski D., Smith B.R., Pozdnyakova O., Andersen M., Xiao Z., Raza A. *et al.* Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res* 2008 Feb;32(2):215–24.
18. Matarraz S., Lopez A., Barrena S., Fernandez C., Jensen E., Flores J. *et al.* The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008 Jun;22(6):1175–83.
19. van de Loosdrecht A.A., Westers T.M., Westra A.H., Drager A.M., van der Velden V.H.J., Ossenkoppele G.J. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008 Feb 1;111(3):1067–77.
20. Xu Y., McKenna R.W., Karandikar N.J., Pildain A.J., Kroft S.H. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am. J. Clin. Pathol* 2005 Nov;124(5): 799–806.
21. Lacronique-Gazaille C., Chaury M.P., Le G.A., Faucher J.L., Bordessoule D., Feuillard J. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica* 2007 Jun;92(6):859–60.
22. Lorand-Metze I., Ribeiro E., Lima C.S., Batista L.S., Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk. Res.*, 2007, Feb;31(2):147–55.
23. Chu S.C., Wang T.F., Li C.C., Kao R.H., Li D.K., Su Y.C. *et al.* Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2011 Jul;35(7):868–73.
24. Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M., Fenaux P., Morel P., Sanz G. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997 Mar 15;89(6):2079–88.

25. Greenberg P.L., Tuechler H., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Sole F. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012 Sep;120(12):2454–65.
26. Malcovati L., Germing U., Kuendgen A., Della Porta M.G., Pascutto C., Invernizzi R. *et al.* Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.*, 2007 Aug 10;25(23):3503–10.
27. Westers T.M., Alhan C., Chamuleau M.E.D., van der Vorst M.J.D.L., Eeltink C., Ossenkoppele G.J. *et al.* Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood* 2010, Mar. 4;115(9):1779–84.
28. Alhan C., Westers T.M., van der Helm L.H., Eeltink C., Santini V, Ossenkoppele GJ, *et al.* Absence of Aberrant Myeloid Progenitors by Flow Cytometry Is Associated with Favorable Response to Azacitidine in Int-2 and High Risk Myelodysplastic Syndromes. 2013. Submitted for publication.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Andy C. Rawstron,

**MINIMAL RESIDUAL DISEASE AS AN END-POINT
IN CLINICAL TRIALS: AN UPDATE FROM THE U.S. FOOD
AND DRUG ADMINISTRATION PUBLIC WORKSHOP**

HMDS, St. James's Institute of Oncology, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust

Introduction

There are a number of new agents that are potentially effective in treating CLL. Current therapeutic approaches achieve a good clinical response in a high proportion of people. However the high response rates with standard therapy mean that progression-free and overall survival are the only suitable end-points for clinical trials of new treatments and a randomised phase III trial of a novel agent is likely to take 5–10 years to complete. In order to make new effective treatments available as soon as possible, the US Food and Drug Administration has an accelerated approval pathway using a surrogate end-point that has a high likelihood of predicting clinical benefit. Any biomarker that is suitable as a surrogate end-point needs to meet stringent qualification criteria and clinical benefit will be subsequently confirmed as a secondary end-point. Minimal disease levels detectable by molecular or immunophenotypic approaches in the absence of morphologically evident disease are frequently reported to be better predictors of clinical outcome than conventional response assessment. This article discusses the framework for qualification of a biomarker and the evidence for the use of MRD as an end-point in CLL as presented in a public workshop at the FDA on February 27th, 2013. The meeting was opened by representatives from the FDA who provided background on the criteria that should be met by a biomarker suitable for use as a surrogate endpoint in clinical trials. This was followed by presentation of the evidence that depletion of MRD below a standard threshold is an independent predictor of clinical benefit. Finally the technical aspects of performing high sensitivity detection of residual disease were reviewed.

Regulatory Background and Considerations

Dr Albert Deisseroth from the division of Hematology Products outlined evidence of clinical benefit required for new drug approvals by the FDA. The FDA has a responsibility to approve new drugs on the basis of demonstration of efficacy with acceptable safety in adequate, well-controlled studies and ability to generate product labeling that defines an appropriate patient population for treatment with the drug and provides adequate information to enable safe and effective use and prescribing of the drug. Within this responsibility the FDA has the flexibility to exercise its scientific judgement to determine the kind and quantity of data and information an applicant is required to provide for a particular drug to meet the statutory standards.

The level of scientific data required to demonstrate suitability of an MRD measure was demonstrated using the examples of viral load measurement in HIV and bcr-abl mRNA quantification in CML.

In the case of HIV, before 1996 the clinical endpoints available were: decreased CD4 T cell level, new opportunistic infections, or death. With the advent of reliable assays for HIV mRNA there was pressure to start using «molecular» endpoints so that treatment could be introduced before the occurrence of opportunistic infections. The FDA undertook analysis of data from more than 5000 patients in multiple trials which showed that short-term decrease in viral load correlated with durable response and improved progression-free and overall survival. By 1996 real-time viral load monitoring of HIV RNA level became standard and the FDA advisory committee qualified viral load measurement at 24 weeks as an end-point for accelerated approval, with levels at 48 weeks for regular approval.

In CML, PCR measurement of peripheral blood bcr-abl mRNA early after therapy had been demonstrated to predict long-term outcome and the methods were harmonised in 2003–2005. Molecular responses at 3–18 months from initiation of Imatinib therapy were correlated with clinical outcome 7–8 years later in multiple clinical trials and the major molecular response rate (i.e. greater than 3 log reduction in peripheral blood bcr-abl copies) was qualified as the primary end-point in the approval trial of Nilotinib.

Following from these two situations, the framework for development of MRD as a regulatory endpoint in clinical trials begins with the identification of the MRD measure in clinical trials, followed by development and standardisation of (a) suitable assay(s) to measure MRD. Efficacy of the standardised assay(s) should be demonstrated prospectively in clinical trials and if confirmed as a predictor of clinical benefit would then be suitable as a surrogate endpoint for accelerated approval trials.

Dr Robert Becker, from the department of Medical Device Regulation, considered the need for approval of an in vitro diagnostic assay or device for measuring MRD. A qualified biomarker requires a package of evidence to demonstrate an «interpretable meaning» to the assay result that would be broadly applicable in other trials. A qualified biomarker should be identifiable prior to standard end-points of progression-free and overall survival and there should be strong evidence of a close correlation to these clinical end-points. Because the biomarker is qualified and not a particular assay, there would be no specific requirement for the assay used to be approved by the regulatory body although it would be expected that there is strong evidence of analytical performance of the assay used in any given trial. In particular, there would be a need for standardization, validation and documentation, either with an approved in vitro diagnostic assay or with an agreed testing paradigm, including all validations and controls needed to establish acceptable performance. A specific validated assay might be appropriate in a single disease-treatment setting while a suitable biomarker would reflect a disease characteristic that may be measured by different assays but there would need to be a «gold-standard» to validate the assays and the biomarker must be applicable in different treatment settings.

The validation of a surrogate endpoint was further considered by Dr Mark Rothman, The surrogate endpoint must be correlated at a patient-level with the clinical outcome, independent of treatment, and must fully capture the net effect of treatment on the clinical outcome. The example of CD4 count and viral load in HIV was considered. The CD4 count is a biomarker that predicts opportunistic infection but it is not on the causal pathway of disease process, rather it is a secondary measure of disease activity. HIV viral load is a direct measure of disease activity and predicts subsequent decreases in CD4 count. Maternal HIV viral load predicts the risk of mother-to-child transmission of HIV whereas maternal CD4 count is not predictive. Therefore HIV viral load is on the causal pathway of the disease process and correlates with clinical outcome in settings where CD4 count does not, therefore reduction in HIV viral load is a more suitable biomarker for testing probable clinical benefits from treatment than changes in the CD4 count. A biomarker that is suitable for use a surrogate endpoint in clinical trials should reflect an understanding of the disease process so that changes in the biomarker would predict meaningful clinical benefit with close correlation between effects on the biomarker and effects on clinical benefit demonstrated in multiple randomised clinical trials.

***Current status of MRD assessment in CLL:
demonstration of a close link between MRD-negative status
and improved clinical outcome***

Dr Paolo Ghia began the session concerning the clinical evidence for the use of MRD as an endpoint in approval trials. It was noted that the depth of response has been recognised for many years as the best marker for predicting outcome, and that now it would be expected that more than 80% of previously untreated patients would be likely to respond to currently available treatment approaches such as FCMR. Dr Ghia summarised the clinical studies assessing MRD in CLL and highlighted the fact that MRD was defined as having a clinical remission in the absence of MRD when the blood or bone marrow shows less than one cell per 10 000 leucocytes, or 10^{-4} . Quantitative flow cytometry and PCR assays are available and the benefits and disadvantages of each were considered. Real-time quantitative IGH PCR is patient specific and has a detection limit of 0.001%, is applicable in > 90% of patients but requires pre-treatment material; fresh samples are preferable but results may be obtained in samples > 48 hours old. MRD flow cytometry is disease-specific so does not necessarily require pre-treatment material, and is applicable in > 95% of patients (all of the patients with a typical phenotype) but requires material < 48 hours old.

High-throughput sequencing is a promising approach as it combines the benefits of RQ-PCR without requiring the development of patient-specific primers but the technology has not yet been validated. Finally, Dr Ghia confirmed the efficacy

of MRD as a surrogate marker of outcome by demonstrating the improvement in clinical outcome with depletion of disease below 0.01%.

Dr Seb Böttcher reported on the evaluation of MRD in the German CLL study trial CLL8 comparing fludarabine-cyclophosphamide (FC) with FC-rituximab treatment. The results of this trial confirm that MRD is an independent prognostic factor for progression-free and overall survival in multivariate analysis. Of particular importance is the fact that treatment type, which is highly predictive of outcome in univariate analysis, loses significance when adjusted for MRD status because individuals who achieve MRD-negative status with FC have an identical outcome to those who achieve an MRD-negative status with FCR. Dr Bill Wierda from the MD Anderson reported on the US experience of MRD in chemo-immunotherapy and requested that the results were not shared as they were part of an ongoing clinical trial but the available results were highly supportive of MRD as a surrogate endpoint. Dr Emili Montserrat reported the Barcelona single centre experience of 255 patients treated with a variety of different regimes including Chlorambucil, CHOP, PA, FC(M) and FC(M)-R. The results exemplified the improving clinical responses over the past two decades and again demonstrated that MRD was an independent prognostic factor for treatment-free and overall survival. Professor Peter Hillmen reported the UK experience demonstrating that MRD was a powerful predictor of outcome in multiple clinical trials and also confirming the biomarker as an independent predictor of outcome in patients treated with a variety of different regimes.

Dr John Byrd from Ohio State University offered a separate viewpoint on the value of MRD assessment in the context of new agents that inhibit the B-cell receptor Signalling (BCR) pathway such as GS-1101 and Ibrutinib. These new agents are effective in disease control and very good progression-free survival even in patients with high-risk disease identified by unmutated IGHV, deletion 17p or deletion 11q. However, the kinetics of response with these novel inhibitors are very different to conventional chemotherapy with an initial re-distribution of CLL cells from lymph node to peripheral blood. As a result there is often a very substantial increase in peripheral lymphocyte count in the first few months, followed by a gradual decline over the following months and years. Relatively few patients achieve a conventional remission with the majority showing persistent lymphocytosis. Dr Byrd made the point that MRD is of value in therapeutic strategies that require disease depletion but not necessarily in those offering disease control, and suggested that MRD should be an optional but not obligatory end-point. Finally Dr Neil Kay considered clinical protocols currently in development and noted that MRD would be a central part of the analysis in future trials.

MRD detection by flow cytometry: technical considerations

The qualification of a biomarker requires, in addition to demonstration of clinical benefit, that there is one or more reliable approach to measurement of the biomarker.

The technical aspects of providing a reliable flow cytometric enumeration of MRD were discussed by Andy Rawstron, Maryalice Stetler-Stevenson and Gerard Lozonski.

The European Research Initiative in CLL (ERIC) consortium has worked to develop reproducible assays for detection of MRD in CLL over more than a decade and a summary of this data confirms that multi-parameter flow readily applicable to the quantitative detection of CLL to 0.01% (10^{-4}). A number of different assays from 4 to 6 to 8 CLR have been validated, using the same core antibodies, most of which have been in diagnostic use for decades. An evaluation of the acceptable errors was made by comparing the predictive value of MRD assessments after adding random enumeration errors to a varying degree. Substantial improvements in survival (e.g. > 1 year) require > 1 log depletion of CLL, and so enumeration errors up to 0.5 log (e.g. 0.01% = 0.005 – 0.05%) do not impair prediction of outcome. Further analysis using dilutional study data analysed in multiple different laboratories demonstrates that inter-laboratory analytic errors are within acceptable range. Finally there was initial data suggesting that proficiency testing (EQA) material would be available in the near future.

Regarding more specific details on the use of MRD assays in clinical trials, it was noted that there should be a quantitative CLL-specific assay, not qualitative clonality- based approach. The pre-treatment work-up would ideally include suitability for MRD monitoring. In order to obtain a reproducible limit of detection of 0.01%, detection by flow cytometry of 20–50 events with a CLL-like phenotype was likely to represent a population of CLL but the results were less reproducible than 50 event population minimum. Ideally there would be a contamination control (CD3) included for results in the 0.005–0.05% level. Finally there should be independent validation of results, either using the partial spillover control in 4/6-CLR multi-tube assays, or by independent preparation of component tubes or by validation with an independent assay such as RQ-ASO IGH-PCR. Finally if a treatment decision is based on MRD result, then multiple positive time-points with rising MRD level would be required prior to introduction of treatment. Future studies may need to identify alternative B-cell gating markers in the era of treatments targeting CD19.

Minimal residual disease as a surrogate endpoint in CLL

There is a substantial body of evidence to demonstrate the depletion of CLL cells below 0.01% (1 CLL cell in 10 000 or 10^{-4}) is an independent predictor of improved progression-free and overall survival. MRD is not necessarily suitable in all clinical settings as B-cell receptor signalling pathway inhibitors may provide clinical benefit without disease eradication. However, for approaches aimed at disease eradication the level of residual disease detected by high sensitivity quantitative assays such as flow cytometry or RQ-ASO IGH-PCR could represent a valid

trial endpoint. Such assays are likely to be offered by specialist laboratories but will be available in most countries and this should allow multi-centre international trials to use MRD as an end-point provided sufficient steps are put in place to ensure consistency between centres which would be facilitated by the availability of stabilised samples for proficiency testing in the near future. The optimal timing and site of MRD sampling was discussed and although there is some data to suggest that 6 months from end of treatment in the peripheral blood may be the best time point, the majority of available data has been based on bone marrow aspirate samples taken for conventional response assessment. **The evidence presented provided strong support for the use of MRD as a surrogate end-point in clinical trials for the approval of new treatments in CLL.**

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



O.P. Kolbatskaya, N.N. Tupitsyn

**BONE MARROW LYMPHOCYTE SUBSETS
IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA AT DIAGNOSIS**

*Haematopoiesis Immunology Laboratory, Central Clinicolaboratory Department,
N.N. Blokhin RCRC RAMS*

Abstract

Complex morphocytochemical and immunological (three-color flow cytometry) analysis in 124 patients has demonstrated that acute leukemia in adults is characterized by changes in bone marrow lymphocyte subset composition specific of individual clinical entity at diagnosis. Statistically significant differences in T-effector subset composition were detected both within individual types of acute leukemia (AML and ALL) and within morphocytochemical types of AML and immunophenotypic types of ALL, as well as in subtypes depending on coexpression of various antigens on blasts.

Key words: acute leukemia, bone marrow, lymphocytes, flow cytometry.

Introduction

Bone marrow is a hemopoietic organ. However, bone marrow lymphocyte pool also contains mature immune effector cells able to produce humoral and cell-mediated immune response or tumor immune surveillance in terms of oncology. Bone marrow precursor cells are targets for acute leukemia (AL). The disease originates in bone marrow, therefore it is of much interest to study bone marrow immune system at diagnosis of AL to assess potential immunodeficiency states providing conditions for proliferation of leukemic clone.

There are few publications showing that AL patients have increased counts of natural killers (NK-cells) in bone marrow at diagnosis of AL and in peripheral blood at complete remission as compared to healthy donors, as well as functional anergy of bone marrow cytotoxic T-lymphocytes (CTL) and T-helpers at acute period. The literature lacks systemic data about changes in percentages and absolute contents of T-, B-lymphocyte, NK and CD56 + T-cell subsets in AL patients as compared to normal individuals, about expression of activation molecules on these cells and relationship between lymphocyte counts and AL type or blast phenotypic features.

Recently it became possible to identify accurately blast population and differentiate it from lymphocyte populations by immunofluorimetry. For this purpose one has to assess expression of pan-leukocyte antigen CD45 together with light scattering characteristics of blasts. Blasts are characterized by low CD45 expression, while mature lymphocytes (T, B, NK, CD56 + T-cells) demonstrate marked CD45 expression.

This study allows analysis of bone marrow lymphocyte subsets and assessment of interrelation and differences between immunophenotypic characteristics of blast and lymphocyte subsets in bone marrow, and as a result, a more accurate assessment of bone marrow lymphocytic subsets in AL patients. Finding of meaningful differences between lymphocyte subsets in acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) helps to identify specific features of effector lymphocyte subsets in these groups of patients. As a result this provides a better understanding of mechanisms of antitumor immunity in AL and helps develop immunotherapy and immunocorrection protocols for the treatment of the disease.

Materials and Methods

The study group included 124 patients with AL undergoing morphocytochemical and immunophenotypic diagnostic investigations at the Hemopoiesis Immunology Laboratory, N.N. Blokhin RCRC RAMS during 2004 through 2010. Fifty seven patients had the diagnosis of AML and 67 had ALL. All patients had their first diagnosis of AL, were chemoradiotherapy-naïve and free from myelodysplastic syndrome.

The AML group included 26 (45.6%) women and 31 (54.4%) men, mean age was 46.7 years. The ALL group also demonstrated prevalence of men (42,62.7%) over women (25,37.3%), mean age was 33.3 years.

Morphocytochemical and immunophenotypic analyses of blasts were made on bone marrow samples. Bone marrow at not more than 0.5 ml was collected using Vacutainer tubes with dry EDTA. Smears for morphological and cytochemical analyses were prepared from the samples, and then myelokaryocyte count and immunophenotyping were performed on these smears. Pappenheim staining was used for morphological specimens.

Myelogram count was made by two morphologists (250 cells each) by immersion microscopy of bone marrow specimens.

Cytochemical study assessed activity of the following enzymes in blasts: myeloperoxidase (MPO), lipids in reaction with Sudan black B, α -naphthyl acetate esterase (NE) independently and in reaction with sodium fluoride (NaF) inhibition, PAS-positive substance in diffuse/diffuse-granular or granular forms.

The diagnosis of AML was made according to FAB and more recent WHO (2001 and 2008) classifications in all patients, blasts were more than 20% in all cases (table 1). Immunophenotyping was made by direct immunofluorescence with triple fluorescent labeling. The monoclonal antibody (MAB) panel included antibodies to pan-leukocyte antigen CD45, stem-cell antigen CD34, non-lineage restricted antigens CD38 and HLA-DR, antigens of myeloid (CD13 and CD33), monocyte (CD14 and CD64), erythroid (glycophorin A [GlyA]), megakaryocyte (CD61) differentiation lineages, common acute lymphoblastic leukemia antigen CD10 (CALLA), B-lineage antigens (CD19, CD20, CD22, CD23), T-lineage antigens (CD3, CD5, CD7, CD4, CD8, CD1a) and NK-cell antigen CD56.

Table 1

Distribution of AML patients by FAB-subtypes

Subtype	Patients	
	number	percent
M ⁰ (myeloblastic with minimal differentiation)	5	8.8
M ¹ (myeloblastic without maturation)	21	36.8
M ² (myeloblastic with maturation)	7	12.3
M ³ (promyelocytic)	7	12.3
M ⁴ (myelomonoblastic)	8	14.0
M ^{4 eos} (myelomonoblastic with eosinophilia)	4	7.0
M ^{5a} (monoblastic without maturation)	2	3.5
M ^{5b} (monoblastic with maturation)	0	0
M ⁶ (erythroblastic)	2	3.5
M ⁷ (megakaryoblastic)	1	1.8
Total	57	100

A marker status was considered positive if present on more than 20% of blasts. Cytoplasmatic and nuclear markers CD22, CD3, Tdt, MPO were used to verify the diagnosis.

Analysis of immunophenotyping findings was made by flow cytofluorimetry using a FACScan (Becton Dickinson, USA) device. Twenty to 50 thousand events were collected.

Blast gate identification was made basing on light scatter characteristics and level of expression of pan-leukocyte antigen CD45. Blasts were characterized by a weaker expression of CD45 as compared to mature lymphocytes or maturing/mature myelopoietic cells. Patient distribution with respect to ALL subtypes is summarized in table 2.

Table 2

Distribution of ALL patients by immunosubtypes.

Subtype	Patients	
	number	percent
Pro-B	6	9
Pre-pre-B	28	42
Pre-B	1	1.5
Pre-T	32	47.5
Total	67	100

We used two techniques to count percentages of bone marrow lymphocytes in AML patients, i.e. morphological (by myelogram) assay and flow cytometry. Fig. (see insert) shows an example of lymphocyte cytometry.

Both methods correlated well, there were no statistically significant differences between lymphocyte percentages as assessed morphologically or cytometrically.

Since cytometry allows a more accurate count of lymphocyte percentage in cases with low lymphocyte content (high degree blastosis) in view of counting several tens of thousands of cells, further in this text lymphocyte percentages are given as counted by cytometry.

Notably, blast and lymphocyte populations were clearly differentiated by CD45 expression in all AML cases, while in ALL some blasts demonstrated high CD45 expression. The division efficiency was proved by the absence of mature T- or B-cells in the blast gate and vice versa the absence of cells with precursor markers in the lymphocyte gate.

All cytometry findings were analyzed using personal computers with WinMDI2.8. Statistical analysis of data was made using an SPSS 15 package and included correlation analysis and comparison of means. Statistical significance of parametric variables was determined by Student's test. Comparison of nonparametric variables was made by chi squared test.

Results

We studied morphological, cytochemical and immunophenotypic characteristics of bone marrow cells in 124 AL patients at diagnosis. CD45/SSC gating of bone marrow cells was used. Differentiation between lymphocyte and blast populations by expression of pan-leukocyte antigen CD45 was shown effective. This allowed us to study residual lymphocyte subset composition and to detect changes in the subset proportions characteristic of AL. It was also found that CD45/SSC gating was not possible in some ALL cases because half of patients with T-cell ALL (59.4%) and 14.3% of patients with B-cell ALL demonstrated marked expression of pan-leukocyte antigen CD45 on blasts that made impossible differentiation between lymphocyte and blast populations. These cases were excluded from further analysis.

Mature T-cells were predominant among other lymphocyte subsets in bone marrow of AL (AML and ALL) cases, B-, NK and CD3 + CD56 + T-cells were also present.

As a result of our study we found statistically significant differences in lymphocyte subset quantitative composition with respect to AL type. This finding was characteristic of both the two (AML and ALL) principal AL types and morphocytochemical subtypes of AML and immunophenotypical subtypes of ALL. We also found statistically significant differences in composition of lymphocyte population with respect to immunophenotypic features of blasts.

Acute myeloid leukemia

Average myelokaryocyte content in AML (n = 57) patients was $116.0 \pm 17.1 \times 10^9/l$, with a broad range from 7.0 to $625.0 \times 10^9/l$. Most cases (49.2%) had normal bone marrow cell composition (range $44.5 - 196$ thou/mcl), one third (19,33.3%) had hypocellular and only 10 (17.5%) patients had hypercellular bone marrow.

Blasts in bone marrow samples from AML patients were $72.9\% \pm 2.7\%$ of all myelokaryocytes (range from 20 to 97.4%). Percentages of bone marrow lymphocytes detected morphologically vs. cytometrically were similar: $6.1 \pm 0.8\%$ and $5.5 \pm 0.7\%$ ($p > 0.05$). Absolute lymphocyte counts by the two techniques were also similar: 4.1 ± 0.7 and 3.7 ± 0.4 thou/mcl ($p > 0.05$). Most (47.4%) samples had normal lymphocyte content, 38.6% of cases demonstrated decreased and only 14% had increased lymphocyte contents.

Total T-lymphocyte content in bone marrow of AML patients was $68.5 \pm 2.1\%$ as determined by CD7 expression, $75.3 \pm 2.0\%$ by CD3 expression and $72.8 \pm 2.0\%$ by CD5 expression. Our results are consistent with CD7 + and CD3 + T-cell counts in the study of bone marrow lymphocyte subsets in patients with AL by Ratei R et al. (2005) [1]. T-helpers were $27.0 \pm 1.2\%$ and CTL were $43.2 \pm 1.5\%$ of bone marrow lymphocytes from AML patients. CD56 + CD3 – NK - cells were $13.4 \pm 1.3\%$, CD56 + CD3 + T-cells were $8.4 \pm 1.2\%$ and B-lymphocytes were $11.6 \pm 1.1\%$.

Our findings demonstrated a difference in contents of effector cells with respect to AML morphocytochemical subtype: relative T-helper content and immunoregulatory index were significantly higher in monocytoid than in granulocytic AML subtypes (table 3).

Table 3

Comparison of percentages and absolute numbers of CD4 + T-cells between granulocytic and monocytoid AML.

Subset	CD4 + T-cells	AML subtypes		P
		granulocytic	monocytoid	
		M $\pm$ m (n = 40)	M $\pm$ m (n = 14)	
CD4 +	percent	25.8 $\pm$ 1.4	30.4 $\pm$ 2.2	0.005
	number (thou/mcl)	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	0.408
CD4/CD8		0.6 $\pm$ 0.04	0.9 $\pm$ 0.1	0.017

As a whole immunoregulatory index of bone marrow from patients with AML was 0.7 ± 0.04 which was evidence of CTL subset prevalence over T-helper one. In monocytoid AML CD4/CD8 ratio was 0.9 ± 0.1 , i. e. counts of CTL and T-helpers were similar. While in granulocytoid AML percentage of CTL was about two-fold greater than that of T-helpers with a CD4/CD8 ratio 0.6 ± 0.04 . This phenomenon may be explained by either a more marked CTL response to development of leukemic clone and/or lower toxic effect of blasts on T-helpers in cases with monocytoid AML.

A new finding in our study was an increase in lymphocytes with coexpression of non-linearly restricted markers (CD38 + HLA-DR +) in patients with acute monocytoid as compared to granulocytoid leukemia ($p = 0.035$; table 4).

It is commonly adopted today that expression of various non-linearly restricted antigens (CD34, CD38, CD56) is prognostically significant in AML, that is why

we assessed lymphocyte subsets with respect to blast immunophenotypic characteristics. Our findings confirmed the supposition that blast immunophenotypic characteristics might influence lymphocyte subset composition. Study of lymphocyte subsets in bone marrow from AML patients with respect to blast immunophenotypic characteristics established several regularities. For instance, coexpression of T-lymphocyte antigen CD7 was associated with significantly increased percentage of CD5 + and CD8 + T-cells, as well as of activated CD38 + lymphocytes as compared to CD7 – AML (table 5).

Table 4

Comparison of contents of lymphocytes coexpressing activation markers CD38 and HLA-DR between granulocytic and monocytoid AML.

Subset	Content	AML subtype		P
		granulocytic	monocytoid	
		M $\pm$ m (n = 34)	M $\pm$ m (n = 13)	
CD38 + HLA-DR +	percent	4.7 $\pm$ 0.8	8.4 $\pm$ 1.8	0.035
	number (thou/mcl)	0.2 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.1	0.102

Table 5

Comparison of bone marrow lymphocyte subsets from patients with AML (M^{0-5a} subtypes) with respect to CD7 expression on blasts

Lymphocyte subsets	AML immunophenotype		P
	CD7 $\geq$ 20% (n = 10)	CD7 < 20% (n = 44)	
CD38 (%)	31.2 $\pm$ 6.6	17.8 $\pm$ 2.0	0.010
CD 38 (number, thou/mcl)	1.3 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.2	0.110
CD8 (%)	49.4 $\pm$ 4.6	41.1 $\pm$ 1.5	0.032
CD8 (number, thou/mcl)	2.0 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.2	0.228
CD5 (%)	81.0 $\pm$ 4.3	70.1 $\pm$ 2.2	0.038
CD5 (number, thou/mcl)	3.2 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.4	0.469

Comparison of lymphocyte subsets in bone marrow from AML patients with respect to HLA-DR expression on blasts demonstrated that the antigen expression was associated with a statistically significant increase in relative levels of lymphocytes expressing activation marker HLA-DR ($p = 0.028$). While absolute numbers of HLA-DR-positive lymphocytes were not statistically different ($p = 0.348$). Increased expression of HLA-DR was associated with a significant increase in both percentages ($p = 0.004$) and numbers ($p = 0.026$) of lymphocytes with activation marker CD23 (table 6).

Table 6

Comparison of bone marrow lymphocyte subsets from patients with AML (M^{0-5a} subtypes) with respect to HLA-DR expression on blasts.

Lymphocyte subsets	AML immunophenotype		P
	HLA-DR $\geq 20\%$	HLA-DR $< 20\%$	
HLA-DR (%)	25.6 ± 2.5 (n = 38)	16.0 ± 2.8 (n = 16)	0.028
HLA-DR (number, thou/mcl)	0.9 ± 0.2 (n = 37)	0.6 ± 0.2 (n = 17)	0.348
CD23 (%)	6.6 ± 1.7 (n = 33)	21.5 ± 6.3 (n = 14)	0.004
CD23 (number, thou/mcl)	0.3 ± 0.1 (n = 33)	1.0 ± 0.5 (n = 14)	0.026

Table 7

Comparison of bone marrow CD3 + T-lymphocyte subsets in patients with B-ALL (pre-pre-B and pre-B immunosubtypes).

CD3 + lymphocytes	Patients with B-ALL ($M \pm m$)		P
	pre-pre-B immunosubtype (n = 24)	pre-B immunosubtype (n = 13)	
Percent	75.2 ± 2.5	62.1 ± 5.4	0.016
Number (thou/mcl)	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.5	0.928

Acute lymphoblastic leukemia

Mean content of myelokaryocytes in the ALL study population (n = 67) was 176.6 ± 22.5 thou/mcl with a broad range of 5.0 to 720 thou/mcl. Most (47.6%) cases had normal bone marrow cellularity (44.5 to 196 thou/mcl), 27.2% had increased and 20.4% had decreased numbers of myelokaryocytes. Blasts in bone marrow samples from ALL patients were $86.5 \pm 1.8\%$ of the myelokaryocyte total (range 28.2% to 99.2%). We measured by cytometry lymphocyte contents in bone marrow from ALL patients with low expression of CD45 marker on blasts similarly to that in AML. There were no statistically significant differences between percentages of lymphocytes in bone marrow from ALL patients as measured by morphology or cytometry ($4.0 \pm 0.6\%$ vs. $4.8 \pm 0.8\%$, $p = 0.242$). Absolute numbers of lymphocytes as measured by the two techniques were also similar: 4.0 ± 0.7 thou/mcl by morphology vs. 4.4 ± 0.6 thou/mcl by cytometry ($p = 0.641$). Most (61%) samples contained decreased lymphocyte percentages, while 36.4% had normal and only 2.6% demonstrated increased lymphocyte levels.

Among cell subsets of bone marrow from patients with ALL we found $71.1 \pm 2.5\%$ of CD7 + T-lymphocytes, $71.5 \pm 2.3\%$ of CD3 + T-cells and

$74.1 \pm 2.1\%$ of CD5 + T-cells which was also similar to the composition in *Ratei R. et al.* (2005) [1]. Levels of T-helpers and CTL were $33.0 \pm 1.9\%$ and $36.3 \pm 2.3\%$ respectively. Mean percentages of NK-cells and CD56 + CD3 + T-cells were $15.2 \pm 1.9\%$ and $10.9 \pm 5.4\%$ respectively, and B-cells were $10.2 \pm 1.2\%$ which were similar to CD19 + cell content in *Ratei R. et al.* [1].

Study of lymphocyte subsets in bone marrow from patients with B-lineage ALL discovered new data demonstrating significant differences in T-lymphocyte composition with respect to leukemia degree of differentiation. For instance, percentage of T-lymphocytes was higher in cases with pre-pre-B-immunosubtype as compared to pre-B-subtype ($p = 0.016$) (table 7).

Lymphocyte subset composition in bone marrow from ALL patients was found related with lineage commitment of blasts, i. e. percentage of mature CD3 + T-cells was significantly higher in pre-B leukemias as compared to pre-T-subtype ($p = 0.006$) (table 8). It may be supposed that blasts in leukemias from B-cell precursors are characterized by either greater immunogenic activity or a higher level of activation-induced apoptosis of T-lymphocytes as compared to pre-T-immunosubtype.

Association between lymphocyte subset composition and blast immunophenotypic characteristics was also seen in ALL. Basing on nonparametric tests we found that stem-cell ALL demonstrated a higher percentage of CD3 + T-cells in B-lineage than in T-lineage leukemias ($76.4 \pm 2.2\%$ vs. $59.3 \pm 11.4\%$, $p = 0.022$). However comparison of absolute contents of CD3 + T-cells failed to demonstrate significant differences.

Among CD38-positive ALL percentage of CD3 + T-cells was significantly higher in B-cell subtypes than in pre-T ALL ($73.3 \pm 2.5\%$ vs. $62.1 \pm 5.4\%$, $p = 0.042$). Absolute numbers of CD3 + lymphocytes were similar ($p = 0.710$).

This finding is of much importance and needs further elucidation. The fact is that in the patient population as a whole CD38 expression was not associated with increased percentage of T-cells, while in the subgroup of CD38 + ALL percentages of CD3 + cells in bone marrow from patients with B-cell ALL were significantly higher than in cases with T-cell ALL which was a reflection of a common regularity of CD3 + prevalence in bone marrow from B-cell as compared with T-cell ALL at diagnosis. Important, that there was no direct association between CD38 expression and B-lineage. On the opposite, frequency of CD38 expression in leukemias from B-lineage precursors was 69.3% vs. 100% for T-lineage cases. Comparison of CD56 – B- and pre-T-ALL discovered significant differences in T-cell subsets. Percentage of CD3 + T-lymphocytes were significantly higher in B-ALL ($75.0 \pm 2.5\%$ vs. $58.3 \pm 5.7\%$, $p = 0.004$) as well as of CD5 + T-lymphocytes ($77.4 \pm 2.4\%$ vs. $65.0 \pm 4.9\%$, $p = 0.015$). There were no significant differences between absolute numbers of CD3 + and CD5 + T-cells ($p > 0.050$).

Comparison of bone marrow subsets in AML and ALL

We were the first to find that patients with AL might have a considerable unbalance in contents of effector cells manifested as preponderance of T-helpers or CTL depending on AL subtype.

Comparison of T-lymphocyte subsets in bone marrow from AML and ALL cases discovered that percentage of CTL was significantly higher in AML ($p = 0.011$) while percentage of T-helpers was significantly higher in ALL ($p = 0.006$).

Significant differences in CD4/CD8 immunoregulatory indices between these two groups ($p = 0.003$) confirmed our finding (table 9). The higher immunoregulatory index found by analysis of T-cell subsets in bone marrow from ALL patients (1.3 ± 0.2) was suggestive of a somewhat higher number of T-helpers than of CTL.

T-cell totals as assessed by expression of CD3, CD5 and CD7 antigens in patients with AML and ALL were similar, the same as percentages of CD56 + CD3 – NK-cells, CD56 + T- and B-lymphocytes ($p > 0.05$). It may be supposed that quantitative differences in lymphocyte subsets in bone marrow in AL refer mainly to effector cells (T-helpers and CTL).

Table 8

Comparison of bone marrow CD3 + subsets in patients with B-lineage and T-lineage ALL

CD3 + lymphocytes	Patients with ALL (M $\pm$ m)		P
	B-lineage subtypes (n = 27)	pre-T subtype (n = 12)	
Percent	75.6 $\pm$ 2.1	62.1 $\pm$ 5.4	0.006
Number (thou/mcl)	2.7 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.5	0.844

Table 9

Comparison of percentages and absolute numbers of CD4 + and CD8 + T-cells in patients with AML and ALL

Subsets	Lymphocytes	Patients with AML (n = 57)	Patients with ALL (n = 34)	P
CD4 +	percent	27.0 $\pm$ 1.2	33.0 $\pm$ 1.9	0.006
	number (thou/mcl)	1.0 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	0.160
CD8 +	percent	43.2 $\pm$ 1.5	36.3 $\pm$ 2.3	0.011
	number (thou/mcl)	1.5 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	0.371
CD4/CD8		0.7 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.2	0.003

We discovered differences in B-lymphocyte populations with respect to AL type. For instance, percentage of CD22 + B-lymphocytes was significantly higher in AML ($12.0 \pm 1.5\%$ vs. $6.5 \pm 0.9\%$, $p = 0.004$) than in ALL, while absolute contents of these lymphocytes were not significantly different ($p = 0.084$). On the opposite, contents of CD19 + CD5 + B-lymphocytes in ALL were significantly higher in terms of both percentage ($4.8 \pm 1.1\%$ vs. $1.8 \pm 0.3\%$, $p = 0.002$) and absolute numbers (0.2 ± 0.06 thou/mcl vs. 0.1 ± 0.02 thou/mcl, $p = 0.010$).

It may therefore be supposed that leukemic clone also affects humoral component of bone marrow immunity whose mechanisms differ depending on blast biology and AL type.

Comparison of bone marrow lymphocytes coexpressing CD38 + and HLA-DR + markers from AML and ALL patients demonstrated higher percentage ($11.8 \pm 2.7\%$ vs. $5.6 \pm 0.8\%$, $p = 0.004$) and absolute numbers (0.6 ± 0.2 thou/mcl vs. 0.2 ± 0.04 thou/mcl, $p = 0.013$) of cells of this population.

We also showed that lymphocyte subset composition is different irrespective of AL type, if expression of non-linearly restricted antigens on blasts is present: HLA-DR – AML demonstrated higher contents of T-lymphocytes (CD45 + CD3 + cells) as compared to HLA-DR – ALL ($75.6 \pm 3.9\%$ vs. $55.2 \pm 7.7\%$, $p = 0.016$), while comparison of effector cells in AML and ALL irrespective of HLA-DR expression failed to discover significant differences in CD3 + T-cell contents ($p > 0.05$).

Discussion

Most patients with AL achieve complete response after adequate chemotherapy, though maintenance of long-term disease-free remission is a serious problem for many patients with AML or ALL and poor prognosis. AL recurrence and death are mainly due to persistent minimal residual disease. Multiple immunotherapies aimed at development of specific antileukemia immunity are currently under process in attempts to prevent disease recurrence and improve overall survival. Unfortunately current chemotherapy protocols fail to improve treatment outcomes as assessed by response rate or long-term survival in AL. In fact, chemotherapy has exhausted all its antileukemia potential, and all effort in leukemia study is therefore aimed to find and introduce novel ways to affect leukemic cells that may not necessarily be associated with cytostatic effects [2].

Allogeneic bone marrow transplantation is a good example of removing residual leukemic cells by means of donor bone marrow effector cells (graft versus leukemia reaction) [3]. However use of this technique is limited by the need to find HLA-identical bone marrow, toxicity of transplantation programs and risk of severe complications (graft versus host reaction). Therefore active research is currently in progress to find other ways for eradication of residual leukemic cells by selective influence on these cells only [4;5]. These include development and clinical use of drugs on the basis of humanized monoclonal antibodies against tumor cell antigens with high specificity, greater feasibility and minimal toxicity [6]. Researchers also try and find ways to enhance cell-mediated immunity basing on the knowledge of mechanisms of interaction between effector cells and leukemic cells [7–9]. Results of this research are suggestive of feasibility of immunotherapeutic strategies and show prospects for improvement of treatment outcomes in AL patients in terms of removing minimal residual disease, reducing the risk of recurrence and improving overall survival.

We attempted to analyze quantitative composition of bone marrow lymphocytes, degree of their maturity and the presence of activation molecules on their surface in AL patients. The purpose of this study was to assess bone marrow immunity status, degree of quantitative deficiency in principal cell components, to detect nosological differences in lymphocyte subset composition and to find out how blast phenotypic characteristics influence them in AL patients.

Basing on our findings we assessed relative contents of main lymphocyte subsets, discovered increased percentage of effector-cells (T-lymphocytes and NK-cells), decreased levels of B-lymphocytes. We also found that all T-lymphocytes in bone marrow of patients with AML and ALL were mature, but not all T-cells expressed activation markers. Our study confirmed the supposition that T-lymphocyte subset composition depended on AL type, AML and ALL subtypes and characteristics of their immunophenotype.

Quantitative analysis of T-lymphocytes in bone marrow from AML patients discovered a significant increase in CD4 + and CD8 + T-cell subsets as compared to normal levels as described by *Rego E.M. et al.* [10]. However, we think that absolute CTL number in bone marrow from AML patients was decreased due to suppression of lymphocytes. The conclusion may therefore be made that there is a marked immune deficiency of T-helpers and CTL in AML due to reduction in their populations caused by activation-induced apoptosis. It may be also supposed that CD4 + T-lymphocytes in bone marrow of AML patients are anergic, and content of CTL not affected by apoptosis is insufficient for effective antileukemia response.

We discovered differences in lymphocyte subset composition in bone marrow from AML patients with respect to disease subtype: percentage of T-helpers was significantly higher in monocytic than granulocytic AML ($p = 0.005$) which was also reflected by significant difference in immunoregulatory indices of these subtypes ($p = 0.017$). This may be due to a greater degree of compensatory increase in T-helper percentage in monocytoid AML.

Our results demonstrated that degree of activation of lymphocytes in bone marrow was related to lineage commitment of blasts in AML: percentage of lymphocytes coexpressing CD38 and HLA-DR was significantly higher in monocytoid than in granulocytoid AML ($p = 0.035$) which might be explained by a greater immunogenicity of monoblasts. We also found that percentage of T-lymphocytes with CD8 + , CD5 + and CD38 + markers was significantly higher in CD7-positive AML, while the presence of non-linearly restricted antigen HLA-DR on myeloid blasts was associated with a significantly increased percentages of lymphocyte subsets with activation markers CD23 and HLA-DR. There are multiple reports on interaction of bone marrow lymphocyte and blast subsets in patients with AL demonstrating direct toxic effects of myeloblasts on lymphocytes [11] and impairment of the mechanisms of double recognition of antigens on lymphoblasts by T-lymphocytes [12]. However, unfortunately we failed to find publications comparing T-cell responses in granulocytic and monoblastic AML subtypes or comparing

immunogenic characteristics of blasts. We suppose that aberrancy of blast immunophenotypes (expression of stem-cell antigen, non-linearly restricted antigens and other lineage antigens) might be reflected in the presence of immunogenic epitopes on blast surface and antigen-presenting characteristics that as a whole formed a specific T-cell antileukemia response in each individual case.

Percentage of CD4 + T-cells in bone marrow from patients with ALL was three-fold higher than the normal content (*Rego E.M. et al.* [10]). This finding may be evidence of a marked T-helper defensive response of bone marrow to proliferation of leukemic clone. This suggests that patients with ALL were free from quantitative T-helper deficiency though did have qualitative deficiency of the T-helper component. This may be seen as anergy of CD4 + T-cells or decreased and/or impaired production of Th-cytokines by these cells resulting in dysregulation of T-cell response as a whole. The increase in relative content of CTL (CD8 + T-cells) in bone marrow of our ALL population was not so marked as that of T-helpers: percentage of CTL was only 1.5-fold as high as the normal level (according to *Rego E.M. et al.* [10]). Therefore absolute number of CTL might fail to reach the normal level with total decrease in lymphocyte population content. This finding may suggest that antileukemic defensive response of CTL in bone marrow from ALL patients is less marked or that a considerable portion of CTL in bone marrow from ALL patients is replaced by leukemic clone or undergoes apoptosis.

Analysis of effector lymphocyte subsets in bone marrow from ALL patients with respect to disease immunosubtype (B-cell or T-cell) demonstrated that percentage of lymphocytes with pan-T-cell marker CD3 + was significantly higher in B-ALL ($p = 0.008$), though there were no significant differences between percentages of CTL and T-helpers. This suggests a more marked proliferation of T-cell clones in response to recognition of tumor antigens in B-cell ALL. However, like in case with AML morphocytochemical subtypes, there is no literature on immunogenic activity of lymphoblasts or degree of proliferative response of bone marrow T-cell subsets to leukemia in ALL patients.

We also found statistically significant differences in T-cell content with respect to B-ALL immunosubtype. As known pro-B, pre-pre-B and pre-B immunosubtypes of B-ALL differ not only in expression of B-lineage markers on blasts but also in clinical course, prognosis and treatment outcomes. It may be supposed that the significant differences in contents of CD3 + T-lymphocytes between different B-ALL immunosubtypes reflect their biological characteristics as well. For instance, percentage of CD3 + T-cells was significantly higher in patients with pre-pre-B-ALL as compared to pre-B ALL ($p = 0.016$) which might be a reflection of a greater T-lymphocyte activity. All these differences suggest that each B-ALL immunosubtype had its specific changes in T-cell immunity supposedly due to the effect on lymphocytes of blasts with different degrees of differentiation and immunogenicity and different degrees of expression of costimulating molecules involved in recognition of leukemic antigens. All these factors lead to different results of T-cell activation and as a consequence to

different quantitative characteristics of bone marrow lymphocytes in the patient categories in question. Unfortunately the literature lacks data on relationship between ALL subtypes and contents of T-cell subsets in bone marrow.

Comparison of relative contents of T-lymphocyte subsets in bone marrow samples from patients with AML and ALL demonstrated that percentage of CD8 + T-cells was significantly higher in AML than in ALL ($p = 0.011$). This may be evidence of a more intensive defensive reaction of bone marrow as manifested by CTL proliferation. On the opposite, patients with ALL presented with a greater percentage of CD4 + T-cells as compared to AML ($p = 0.006$). This difference may be due to different biologies of lymphoblasts and myeloblasts, and their different effects on T-lymphocytes which might lead to a more marked proliferative response of T-helper component in patients with ALL. Significant differences in immunoregulatory indices CD4/CD8 between AML and ALL patients ($p = 0.003$) confirm the conclusion about unique character of T-cell unbalance in each disease type.

Two hypotheses may be proposed to explain these results. Cytotoxic effect of myeloid blasts on T-lymphocytes is more marked in AML: secretion by myeloid blasts of soluble factors preventing T-cell enter into cell cycle and T-helper synthesis of type 1 cytokines (Th1) according to *Buggins A.G.S. et al.* [11] and *Orleans-Lindsay J.K. et al.* [13], as well as FasL expression on 54% of myeloid blasts according to *Buzyn A. et al.* [14] enabling them to develop tumor counterattack and to escape from T-lymphocyte cytotoxic effects. It may be supposed that T-helpers in AML patients are more sensitive than CTL to this myeloblastic effect. However, the above-mentioned publications did not cite data about changes in and ratios of different T-cell subsets.

We found no information about such a marked lymphoblast cytotoxicity in the literature, and we may suppose that T-helper subset is preserved better in ALL. As demonstrated by *Yotnda P. et al.* [12], CD4 + and CD8 + T-lymphocyte subsets were equally sensitive to activation-induced apoptosis due to lymphoblast effects in patients with ALL. Moreover, as also shown by *Yotnda P. et al.* [12], lymphoblasts did not express B7.1 which enhanced generation of Th2-cells and synthesis of IL-4. According to *Estaquier J. et al.* [15] and *Becker J.C.* [16] this leads to T-helper anergy and apoptosis, and as a consequence, reduction of principal effects of CD4-dependant CD8-cells as demonstrated in *Sad S. et al.* [17] and *Cardoso A.A. et al.* [18].

Count of bone marrow B-lymphocytes in AML and ALL patients discovered a decrease in their percentages as compared to normal levels according to *Rego E.M. et al.* [10]. There were no statistically significant differences in B-cell totals between AML and ALL. These findings are evidence of considerable suppression of bone marrow humoral immunity, with degree of the suppression being independent of AL subtype. We failed to find publications on mechanisms of influence of blasts (both myeloid and lymphoid) on bone marrow humoral immunity. We analyzed T-lymphocyte contents with respect to blast phenotypic characteristics and coexpres-

sion of various markers on blasts. As known, stem-cell (CD34-positive) leukemias are characterized by a number of specific morphological, cytochemical and immunophenotypic features [19]. We discovered interrelationship between bone marrow lymphocyte subset composition and blast immunophenotypic characteristics when comparing subpopulations of AML and ALL patients with respect to non-linearly restricted antigens on blasts, as well as within morphocytochemical AML subtypes and ALL immunosubtypes. For instance, percentage of T-helpers was statistically higher in HLA-DR-negative AML than in HLA-DR-negative ALL ($p = 0.016$), percentages of CD5 + T-cells, CTL and CD38 + lymphocytes were higher in the presence than in the absence of CD7 on myeloblasts. Absolute contents of CD5 +, CD4 + and CD8 + T-lymphocytes were higher, if CD13 was absent on myeloblasts than in CD13 + ALL. However, there is no literature on quantitative analysis of T- and NK-cells in AL with respect to phenotypic characteristics of blasts. We may suppose that expression on blasts of non-linearly restricted markers as well as markers characteristic of another AL type contributes to biologic features of leukemic cells, in particular their ability to produce cytotoxic effect on T-lymphocytes and to induce T-cell anergy or apoptosis. However, one may suppose that there are other, yet unknown mechanisms of interrelation between lymphocyte and blast populations depending on phenotypic characteristics of blasts and expression on them of non-linearly restricted molecules and antigens characteristic of another AL subtypes. We therefore believe that study of bone marrow lymphocyte population in AL without taking into consideration of characteristics of blast population is not sufficient.

Literature: see HÆmatopoïesis Immunology 2012, №2.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

*Н.Б. Булиева¹, Н.М. Черменева²***ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ СЕПСИСА У ПАЦИЕНТОВ
ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**¹*Ханты-Мансийская государственная медицинская академия*²*Ханты-Мансийская окружная клиническая больница*

Иммунопатологические процессы при онкологических заболеваниях крови интенсивно изучаются в настоящее время, как отечественными, так и зарубежными исследователями. Известно, что онкологические больные являются группой риска в отношении развития инфекционных заболеваний. Развитие инфекционных осложнений при лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ) обусловлено иммунной дисфункцией, и оценка параметров иммунитета может позволить в ряде случаев разработать прогностические критерии у больных с данной патологией.

Цель исследования: установить диагностическую ценность показателей иммунного статуса больных лимфопролиферативными заболеваниями и оппортунистическими инфекциями.

Материалы исследования.

В исследование включено 260 пациентов ЛПЗ, получавших стационарное лечение в отделении химиотерапии и онкогематологии ОКБ г. Ханты-Мансийск.

Проводился анализ иммунологических показателей больных ЛПЗ и микст-инфекцией, а также генерализованными инфекционными осложнениями.

Результаты: Было установлено, что у больных ЛПЗ на фоне иммунодефицита оппортунистическая инфекция часто не бывает однородной и представлена смешанной флорой. Наличие микст-инфекции следует рассматривать, как проявление тяжелого иммунодефицита и считать фактором риска септических осложнений. Учитывая множественность изменений иммунологических показателей при генерализованных инфекционных осложнениях у больных ЛПЗ, установлена диагностическая ценность параметров гуморального и клеточного иммунитета при септических состояниях. С этой целью по каждому показателю иммунограммы, который изучался в нашем исследовании для больных с сепсисом, была построена шкала диагностической ценности, с учетом чувствительности (% позитивных результатов теста в группе пациентов с септическими осложнениями) и специфичности (% негативных результатов теста в группе пациентов без септических осложнений), а также расчетом достоверности по критерию χ^2 и отношения шансов (Odds Ratio – OR), табл. 1. За точку отсчета брался нижний или верхний (для ЦИК, ФНО- α и СРП) квартиль у больных без септических осложнений, полученный при непараметрическом анализе (ФНО- α – 71,2 пг/мл, ИФ- γ – 1,63 ЕД/мл, ИЛ-1 β – 3,69 пг/мл, ИЛ-4 – 4,51 пг/мл, ИЛ-6 – 3,40 пг/мл, IgA – 30,6 мг/л, IgG – 3,70 г/л, IgM – 58,5 мг/л, СРП – 16,2 мг/л, С3-комплемент – 0,48 г/л, С4-комплемент 0,15 г/л, ЦИК – 87 ЕД/мл, ФА нейтрофилов – 33,1%, ФА моноцитов – 28,3%, CD4/CD8 – 1,43, уровень нейтрофилов – $1,66 \times 10^9$).

ABSTRACTS

N.B. Bulieva¹, N.M. Cheremneva²

**THE VALUE OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS
IN THE EARLY DIAGNOSIS OF SEPSIS
IN PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES**

¹ Khanty-Mansiisk Stae Medical Academy

² Khanty-Mansiisk Regional Clinical Hospital

Immunopathological processes in cancer blood intensively studied at the present time, both domestic and foreign researchers.

It is known that cancer patients are at risk for the development of infectious diseases. The development of infectious complications in lymphoproliferative diseases (LPZ) is caused immune dysfunction, and estimation of parameters of immunity may allow in some cases to develop prognostic criteria in patients with this disease. The purpose of the study, to establish the diagnostic value of the immune status of patients with lymphoproliferative diseases and opportunistic infections.

Materials research.

The study included 260 patients LPZ receiving hospital treatment in the department of oncology and chemotherapy EDO Khanty-Mansiysk.

Analyzed immunological patients LPZ and mixed infection and generalized infectious complications.

Results: It was found that the patients are immunocompromised LPZ opportunistic infection is often not uniform and presented a mixed flora. The presence of mixed infections should be seen as a manifestation of severe immunodeficiency and considered a risk factor for septic complications. Given the multiplicity of immunological changes in generalized infectious complications in patients with LPZ, a diagnostic value of the parameters of humoral and cellular immunity in septic conditions. To this end, for each indicator immunograms that was tested in this study for patients with sepsis was built scale diagnostic value, taking into account the sensitivity (% of positive test results in patients with septic complications) and specificity (% of negative test results in patients without septic complications) and the calculation accuracy by χ^2 and odds ratio (Odds Ratio – OR), Table. 1. For a reference point was taken low or high (for the CEC, TNF- α , and PSA) quartile of patients without septic complications, resulting in a non-parametric analysis (TNF- α – 71,2 pg/ml, IFN- γ – 1,63 U/ml, IL-1 β – 3,69 pg/ml IL-4 – 4.51 pg/ml IL-6 – 3.40 pg/ml, IgA – 30,6 g/l, IgG – 3,70 g/l, IgM – 58,5 g/l, PSA – 16.2 mg/l, C3-complement – 0.48 g/l, C4-complement of 0.15 g/l, the CEC – 87 U/ml, the FA neutrophil – 33.1%, monocytes FA – 28,3%, CD4/CD8 – 1,43, neutrophil count – 1.66×10^9).

Таблица

Диагностическая ценность иммунологических показателей больных ЛПЗ и сепсисом

Показатели иммунитета	Чувствительность	Специфичность	Odds Ratio [OR]
Фактор некроза опухоли, пг/мл	84,6%	99,2%	67,3 [8,6–526,7]
Интерферон-γ, ЕД/мл	61,5%	48,6%	1,51 [0,48–4,75]
Интерлейкин-1β, пг/мл	69,2%	74,9%	6,71 [1,99–22,6]
Интерлейкин-4, пг/мл	92,3%	93,9%	185,6 [22,6–1531,5]
Интерлейкин-6, пг/мл	92,3%	76,1%	38,2 [4,87–301,3]
Ig A, мг/л	76,9%	47,4%	3,0 [0,81–11,2]
Ig G, г/л	84,6%	75,7%	17,1 [3,69–79,7]
Ig M, мг/л	53,9%	37,3%	0,69 [0,23–2,12]
С-реактивный протеин, мг/л	76,9%	99,6%	820,0 [78,4–8646,4]
С3-комplement, г/л	92,3%	76,5%	39,1 [4,98–308,3]
С4-комplement, г/л	76,9%	69,2%	7,5 [2,0–28,1]
Циркулирующие иммунные комплексы, ЕД/мл	76,9%	98,8%	270,0 [48,4–1515,9]
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	92,3%	75,7%	37,4 [4,77–294,7]
Фагоцитарная активность моноцитов, %	92,3%	77,3%	40,9 [5,21–322,8]
Тх/Тс	76,9%	99,6%	820,0 [78,4–8646,4]
Нейтрофилы, абс×10 ⁹	92,3%	74,6%	35,2 [4,49–277,4]

Table

Diagnostic value of immunological and sepsis patients LPZ

immune indices	responsiveness	specificity	Odds Ratio [OR]
TNF- α , pg/ml	84,6%	99,2%	67,3 [8,6–526,7]
IFN- γ , ЕД/мл	61,5%	48,6%	1,51 [0,48–4,75]
IL-1 β , pg/ml	69,2%	74,9%	6,71 [1,99–22,6]
IL-4, pg/ml	92,3%	93,9%	185,6 [22,6–1531,5]
IL-6, pg/ml	92,3%	76,1%	38,2 [4,87–301,3]
IgA, g/l	76,9%	47,4%	3,0 [0,81–11,2]
IgG, g/l	84,6%	75,7%	17,1 [3,69–79,7]
IgM, g/l	53,9%	37,3%	0,69 [0,23–2,12]
PSA, g/l	76,9%	99,6%	820,0 [78,4–8646,4]
C3-complement, g/l	92,3%	76,5%	39,1 [4,98–308,3]
C4-complement, g/l	76,9%	69,2%	7,5 [2,0–28,1]
CEC, U/ml	76,9%	98,8%	270,0 [48,4–1515,9]
FA neutrophil, %	92,3%	75,7%	37,4 [4,77–294,7]
monocytes FA, %	92,3%	77,3%	40,9 [5,21–322,8]
CD4/CD8	76,9%	99,6%	820,0 [78,4–8646,4]
neutrophil, $\text{abs} \times 10^9$	92,3%	74,6%	35,2 [4,49–277,4]

Из представленной выше таблицы видно, что чувствительность при повышении уровней ФНО- α и СРП при наличии сепсиса составила 84,6% и 76,9%, специфичность 99,2% и 99,6% (OR – 67,3[8,6–526,7] и 820,0[78,4–8646,4]). Для ИФ- γ диагностическая ценность была недостоверной: чувствительность – 61,5%, специфичность – 48,6%, OR – 1,51[0,48–4,75]. Среди интерлейкинов наибольшая диагностическая ценность была доказана для ИЛ-4 (чувствительность – 92,3%, специфичность – 93,9%, OR – 185,6 [22,6–1531,5]), меньше – для ИЛ-1 β (чувствительность – 69,2%, специфичность – 74,9%, OR – 6,71[1,99–22,6]), ИЛ-6 (чувствительность – 92,3%, специфичность – 76,1%, OR – 38,2[4,87–301,3]). Из иммуноглобулинов стоит выделить IgG (чувствительность – 84,6%, специфичность – 75,7%, OR – 17,1[3,69–79,7]), так как диагностическая ценность IgA и M была незначительной (IgA – чувствительность – 76,9%, специфичность – 47,4%, OR – 3,0[0,81–11,2], IgM – чувствительность – 53,9%, специфичность – 37,3%, OR – 0,69[0,23–2,12]). Для C3- и C4-компонентов комплемента диагностическая ценность отличалась более высокой чувствительностью (92,3 и 76,9%), чем специфичностью (76,5 и 69,2%). Уровень ЦИК при сепсисе был высокоспецифичным (98,8%), и достаточно чувствительным компонентом (76,9%), OR – 270,0[48,4–1515,9]. Среди показателей клеточного иммунитета при сепсисе наиболее чувствительными показателями оказались ФА нейтрофилов и моноцитов (по 92,3% соответственно), а также количество нейтрофилов (также 92,3%), а наиболее специфичным – соотношение CD4/CD8 (99,6%).

Выводы: Наиболее ценными диагностическими «маркерами» септического процесса у больных ЛПЗ можно считать повышение ФНО- α , снижение уровня ИЛ-4, IgG, увеличение содержания ЦИК. Среди показателей клеточного иммунитета при сепсисе наиболее чувствительными показателями оказались ФА нейтрофилов и моноцитов, количество нейтрофилов в крови, а наиболее специфичным – соотношение CD4/CD8.

From the table above it is clear that the sensitivity with increased levels of TNF- α and the PSA in the presence of sepsis was 84.6% and 76.9%, specificity 99.2% and 99.6% (OR – 67,3 [8,6 –526.7] and 820.0 [78,4–8646,4]). IFN- γ for the diagnostic value was incorrect: sensitivity – 61.5%, specificity – 48,6%, OR – 1,51 [0,48–4,75]. Among interleukins greatest diagnostic value has been proven to IL-4 (sensitivity – 92.3%, specificity – 93,9%, OR – 185,6 [22,6–1531,5]), less – for IL-1 β (sensitivity – 69.2%, specificity – 74,9%, OR – 6,71 [1,99–22,6]), IL-6 (sensitivity – 92.3%, specificity – 76,1%, OR – 38,2 [4,87–301,3]). Of antibodies is to provide IgG (sensitivity – 84.6%, specificity – 75,7%, OR – 17,1 [3,69–79,7]), since the diagnostic value of IgA and M was not significant (IgA – sensitivity – 76.9%, specificity – 47,4%, OR – 3,0 [0,81–11,2], IgM – sensitivity – 53.9%, specificity – 37,3%, OR – 0,69 [0,23–2,12]). For C3 and C4 complement components, the diagnostic value of different higher sensitivity (92.3 and 76.9%) than specificity (76.5 and 69.2%). CEC levels in sepsis was highly specific (98.8%), and sensitive component (76,9%), OR – 270,0 [48,4–1515,9]. Among the indicators of cellular immunity in sepsis were the most sensitive indicators FA neutrophils and monocytes (by 92.3%, respectively), as well as the number of neutrophils (also 92.3%), and the most specific – the ratio of CD4/CD8 (99,6%).

Conclusions: The most valuable diagnostic «markers» sepsis patients may be considered LPZ increase of TNF- α , reduced levels of IL-4, IgG, increase in CEC. Among the indicators of cellular immunity in sepsis were the most sensitive indicators FA neutrophils and monocytes, and neutrophils in the blood, and the most specific – the ratio of CD4/CD8.

Е.В. Абакушина¹, Г.С. Неприна¹, А.А. Даниленко¹, В.В. Павлов¹,
Т.Г. Шкаврова¹, Е.И. Коваленко²

НОВЫЙ ФАКТОР ПРОГНОЗА

ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Медицинский радиологический научный центр Минздрава России, Обнинск, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

В последние годы были разработаны молекулярные маркеры, позволяющие прогнозировать течение хронического лимфолейкоза (ХЛЛ). К ним относятся CD38, ZAP-70, статус мутации генов варибельного региона иммуноглобулинов, del17p, del11q, трисомия 12 хромосомы и del13q в интерфазных ядрах. Недавно были обнаружены стресс-индуцированные молекулы MICA/B, которые появляются на поверхности опухолевых лимфоцитов больных ХЛЛ. Абберантные В-лимфоциты способны сбрасывать эти молекулы со своей поверхности, вследствие чего они могут быть обнаружены в сыворотке крови больных.

Задачи. Исследование взаимосвязи между концентрацией молекул MICA/B в сыворотке крови больных, молекулами CD38 и хромосомными нарушениями.

Методы. В исследование включен 21 больной ХЛЛ и 56 здоровых доноров в качестве контрольной группы. У всех пациентов были определены сывороточный уровень молекул MICA/B (ELISA), содержание CD38+ В-клеток. У 8 больных (38%) проведено цитогенетическое исследование наличия del17p, del11q, трисомии 12 хромосомы и del13q методом FISH.

Результаты. Средний уровень sMICA/B у всех больных ХЛЛ составил 335 пг/мл, что превысило контрольные значения в 6,4 раз (среднее 52 пг/мл). Повышенный уровень молекул sMICA/B (более 150 пг/мл) был выявлен у 16 пациентов (76,2%). В группе больных с высоким уровнем сывороточных молекул MICA/B делеция хромосом 13q (8/8), 17p (3/8) и 11q (2/8) обнаруживались чаще. В этой же группе пациентов у 8 человек (38,1%) содержание CD38+ лимфоцитов превысило нормальное значение.

Выводы. Повышенный уровень молекул MICA/B в сыворотке крови больных ХЛЛ может указывать на наличие неблагоприятного течения опухолевого процесса и служить в качестве одного из прогностических факторов.

A. Sergeeva, H. He, K.E. Ruisaard, K. Clise-Dwyer, L. St. John, Q. Ma,
G. Alatrash, J.J. Molldrem

**8F4, AN ANTI-PR1/HLA-A2 T CELL RECEPTOR-LIKE ANTIBODY,
TARGETS ESTABLISHED ACUTE MYELOID LEUKEMIA
AND ELIMINATES LEUKEMIA STEM CELLS**

*Transplantation Immunology Section, Stem Cell Transplantation and Cellular
Therapy Department, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center,*

PR1 (VLQELNVTV) is an HLA-A2-restricted leukemia-associated peptide from proteinase 3 and neutrophil elastase that is recognized by PR1-specific cytotoxic T lymphocytes that contribute to cytogenetic remission of myeloid leukemia. We developed a high affinity T cell receptor (TCR)-like mouse monoclonal antibody (8F4) that binds to a conformational epitope of the PR1/HLA-A2 complex. Flow cytometry and confocal microscopy of 8F4-labeled cells showed significantly higher PR1/HLA-A2 expression on AML blasts compared with normal leukocytes. Moreover, 8F4 mediated complement dependent cytotoxicity of AML blasts and Lin[−]CD34⁺CD38[−] leukemia stem cells (LSC), but not normal leukocytes. To investigate *in vivo* biological effects 8F4 on established leukemia, we established xenografts of primary human HLA-A2-positive AML in sublethally irradiated NOD.Cg-Prkdc^{scid}/Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) mice. Leukemia engraftment was monitored in peripheral blood by flow cytometry. In a screening assay, co-incubation of AML with 8F4 *ex vivo* prevented AML engraftment in immunodeficient mice. In a treatment model, mice with established PR1/HLA-A2-expressing leukemia were treated with twice-weekly intravenous injections of 200 µg 8F4 or isotype control antibody. Flow cytometry and histology analysis of tissues was used to assess leukemia burden and level of engraftment. After 5 weeks of treatment AML was reduced 300-fold in bone marrow of 8F4-treated mice compared to isotype-treated control animals ($0.07 \pm 0.06\%$ hCD45⁺cells versus $20.4 \pm 4.1\%$, $n = 5$ mice per group). Moreover, leukemia stem cells were no longer detected in bone marrow of 8F4-treated mice, compared to $0.88 \pm 0.24\%$ in isotype-treated mice. Similar results were obtained with AML from two additional patients, one with secondary AML (CMML) and one with AML-M7. To confirm 8F4-mediated elimination of LSC, we performed secondary transfer experiment with 1×10^6 bone marrow cells from 8F4- and isotype-treated mice, transplanted into recipient NSG mice, irradiated with 250 cGy. AML was undetectable in mice that received bone marrow from 8F4-treated animals versus $4.1 \pm 2.4\%$ ($n = 4$) in bone marrow of mice that received cells from isotype-treated mice, determined at 16 weeks after secondary transfer, suggesting that 8F4 may eliminate a subset of AML with self-renewing potential. Finally, 8F4 treatment extended survival ($n = 14$, $p < 0.001$) and decreased disease burden of mice with highly aggressive AML xenograft, compared to isotype-treated mice. Thus, our *in vivo* data show that 8F4, antibody with TCR-like specificity to leukemia associated antigen, is highly active against chemotherapy-resistant AML, including leukemia stem cells.

С.В. Сазонов¹, С.М. Демидов²

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОМЕТАСТАЗОВ
В РЕГИОНАЛЬНЫХ ЛИМФОУЗЛАХ
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

¹ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург,
Россия

²ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбу-
бург, Россия

Наличие метастазов (в том числе микрометастазов) в региональных лимфатических узлах у пациентов раком молочной железы (РМЖ) всегда расценивается как неблагоприятный прогностический признак. Реальное представление о степени распространенности процесса часто дают только результаты иммуногистохимического (ИГХ) исследования с применением моноклональных антител (МКА) к антигенам, экспрессируемым клетками эпителиальной опухоли и не являющихся специфичными для лимфоидной ткани. На опухолевых клетках при РМЖ почти в 96% случаев выявляется экспрессия белков промежуточных филаментов цитоскелета - Keratin. Несмотря на наличие в некоторых опухолях эпителиально-мезенхимального перехода при развитии метастатического процесса при РМЖ, чаще всего в последующем наблюдается обратная реэкспрессия Keratin в метастатических клетках. Т.о. именно использование МКА в смеси к различным кератинам - PanCytokeratin (объединяет цитокератины 2, 6, 8, 10, 11, 18, 19) должно служить стандартным исследованием для обнаружения не выявленных метастазов и микрометастазов РМЖ в региональные лимфатические узлы.

Целью настоящей работы: изучить частоту выявления метастазов в региональных лимфатических узлах у пациенток РМЖ при использовании обычного гистологического исследования и при проведении ИГХ с использованием антитела к PanCytokeratin. Материалом для исследования послужили 206 карцином молочной железы, первичная диагностика которых была осуществлена не позднее чем 5 лет назад. Распространенность процесса оценивали в соответствии с Международной классификацией злокачественных опухолей по системе TNM. Большинство пациенток отнесены к II и III стадиям, наиболее частым гистологическим вариантом был инфильтративный протоковый рак, в большинстве случаев установлена II степень злокачественности опухоли.

Иммуногистохимические исследования для выявления в лимфатических узлах клеток, экспрессирующих кератин осуществляли в автостейнере «ДАКО» (Дания) с использованием моноклональных мышинных Anti-Human антител (PanCytokeratin, Clone AE1/AE3, Dako). Предварительно гистологические срезы обрабатывались в барокамере «Paskal DAKO Cytomation» (Дания) при давлении 22Р и температуре 127°C. Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе «Zeiss Imager М» (Германия). Оценка уровней экс-

прессии в опухолевых клетках производилась полуколичественным методом. Положительной считали реакцию при выявлении даже одной метастатической клетки.

Обнаружено, что почти у трети пациенток со РМЖ при использовании обычных методов микрометастазы в лимфатических узлах не определяются. Это касается в первую очередь сторожевых лимфатических узлов. Так, если при обычном гистологическом исследовании метастазы у пациенток, у которых установлена стадия опухолевого процесса T1–2NO, были обнаружены в 32% случаев, то при использовании ИГХ метода их число выросло до 48%, причем в основном за счет выявления микрометастазов.

Установлена взаимосвязь между присутствием метастазов и рецепторным статусом опухоли. При отрицательной экспрессии в опухоли рецепторов к Estrogen метастазы в лимфатические узлы наблюдались в 2,5 раза, при экспрессии HER2 neu – в 3,2 раза, в опухолях с тройным негативным статусом («triple negative» status) – в 3,4 раза чаще, чем в опухолях с позитивным рецепторным статусом.

Представленные нами данные показывают необходимость внедрения в работу патологоанатомической лаборатории иммуногистохимического исследования региональных лимфатических узлов с PanCytokeratin для уточнения степени распространенности опухолевого процесса при РМЖ.

Т.З. Чернявская

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТИМУЛИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

В настоящее время в онкологии при проведении высокодозной химиотерапии (ВХТ) и/или трансплантации используются такие источники гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), как костный мозг (КМ), стволовые клетки периферической крови (СКПК), их сочетание и клетки пуповинной/плацентарной крови. От источника гемопоэтического материала зависят темпы и стабильность восстановления гемопоэза, в том числе моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, дендритных клеток. Источник ГСК оказывает существенное влияние на развитие и степень таких реакций, как «трансплантат против хозяина» (РТПХ), «трансплантат против опухоли» (РТПО), на полноту донорского химеризма и эффективность борьбы с инфекцией. При выполнении аллогенных трансплантаций (аллоТКМ) одним из основных источников ГСК остается КМ, составляя порядка 20% от всех аллоТКМ. При проведении аутологичных ТКМ (аутоТКМ) КМ обычно используется в случае неудачи заготовки СКПК, а также при острых лейкозах (ОЛ). Относительно новым источником ГСК является **стимулированный КМ** (стКМ), обладающий рядом преимуществ и получивший распространение в ряде зарубежных и российских центров.

Наше исследование было проведено для изучения роли стКМ в качестве альтернативного источника ГСК при аутологичных (аутоТстКМ) и аллогенных (аллоТстКМ) трансплантациях. Всего за последние 5 лет из 120 эксфузий КМ стКМ был заготовлен в 106 случаях, в том числе у 17 здоровых доноров КМ. При заготовке стКМ использовался режим мобилизации Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг/сут в течение 3х дней. В группе из 106 человек было 59 мужчин и 47 женщин в возрасте от 16 до 69 лет (медиана 29): с лимфомой Ходжкина (ЛХ) – 61, неходжкинскими лимфомами (НХЛ) – 4, ОЛ – 23, солидными опухолями – 1, в 17 случаях эксфузия проводилась у здоровых доноров КМ. Всего было проанализировано 53 ТстКМ (36 аутоТстКМ и 17 аллоТстКМ).

Из 36 аутоТстКМ (18 муж. и 18 жен. в возрасте от 16 до 57 лет, медиана 29), большинство было выполнено при ЛХ (25 из 36). Также аутоТстКМ проводились при НХЛ (n = 2) и ОЛ (n = 9). Режимы кондиционирования в 9 случаях ОЛ были миелоаблативные, в остальных 27 случаях лимфом – ВЕАМ и аналогичные курсы ВХТ. В общей группе из 36 чел. сроки восстановления гемопоэза после аутоТстКМ были больше, чем после трансплантации аутологичных СКПК (n = 139) в группе пациентов с лимфомами (ЛХ–39, НХЛ–23) и множественной миеломой (ММ) (n = 77), и составили: для нейтрофилов 20 дней (разброс от 12 до 46), для тромбоцитов – 24 дня (от 15 до 80). Необходимо отметить, что после 9 аутоТстКМ, выполненных для консолидации ремиссии ОЛ у пациентов без доступного аллогенного донора, восстановление как нейтрофилов (13–46 дней, медиана 33), так и тромбоцитов (25–80 дней, медиана 37) происходило значительно медленнее, чем при аутоТстКМ у больных лимфомами и ММ, что коррелирует с литературными данными. При сравнении характеристик перелитого стКМ при ОЛ и других нозологиях (лимфомы, ММ) не было выявлено отличий по количеству ЯСК и CFU-GM, несколько различалось содержание в трансплантате CD34+-клеток и Т-лимфоцитов. Интересными представляются результаты 27 аутоТстКМ в сочетании с малыми дозами СКПК (содержание в трансплантате CD34+-клеток в 25 из 27 случаев было менее $1,0 \times 10^6/\text{кг}$, 0.07–2.5, медиана 0.9). Абсолютное большинство пациентов имели диагноз ЛХ (n = 21), остальные – НХЛ (n = 4) или ОЛ (n = 2). Восстановление гемопоэза в этой группе больных произошло в сроки, одинаковые со СКПК: нейтрофилы – на день 13 (разброс 8–32), тромбоциты – на день 14 (9–60). Таким образом, добавление к стКМ даже небольших количеств СКПК способствовало более быстрому восстановлению гемопоэза, которое во всех случаях оказалось стойким.

Большинство аллоТстКМ (14 из 17) было выполнено у больных с ОЛ, они также проводились при хроническом миелолейкозе (n = 2) и ММ (n = 1). Режимы кондиционирования в 16 случаях из 17 были миелоаблативные. После аллоТстКМ восстановление как нейтрофилов, так и тромбоцитов наблюдалось на день 18-й (разброс 13–35 и 12–66, соответственно).

Существенными факторами, повлиявшими на темпы восстановления гемопоэза пациентов нашей группы, кроме источника ГСК, были: наличие тяжелой острой РТПХ (4 чел.), развитие ЦМВ-инфекции с терапией ганцикловиром (2 чел.), а также проведение аллоТКМ в фазе прогрессирования ОЛ (3 чел.). Тем не менее, отмечено быстрое достижение полного донорского химеризма во всех случаях и отсутствие инфекционных смертей в раннем посттрансплантационном периоде. Таким образом, в случае использования стКМ при проведении аллоТКМ можно говорить о темпах восстановления гемопоэза, сопоставимых скорее со СКПК, чем с КМ, а также более редком развитии стероид-рефрактерной острой РТПХ по сравнению со СКПК.

Т.Т. Валиев, А.В. Попа, Г.Л. Менткевич

ТАРГЕНТНАЯ ТЕРАПИЯ ПОЗДНИХ СТАДИЙ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОМ У ДЕТЕЙ.

НИИ ДОиГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Высокоинтенсивная химиотерапия по протоколам группы BFM (1990/1995/2004) позволяет получить длительную общую выживаемость (ОВ) у 98–100% детей с начальными (I–II) стадиями неходжкинских лимфом (НХЛ) из зрелых В-клеток. Нерешенным вопросом в детской онкогематологии остается лечение поздних (III–IV) стадий В-НХЛ, где показатели ОВ составляют 70–75%.

Одним из основных маркеров, экспрессируемых на опухолевых В-клетках, является CD20, который стал мишенью для действия целого ряда таргетных препаратов: ритуксимаб, окрелизумаб, велтузумаб, офатумумаб. Первым зарегистрированным анти-CD20 моноклональным антителом, применяемым в лечении В-НХЛ взрослых, стал ритуксимаб, включение которого в режимы полихимиотерапии (ПХТ) позволило достоверно повысить результаты общей выживаемости больных В-НХЛ. Программы ПХТ с включением ритуксимаба у детей только начинают отрабатываться.

Целью исследования стало изучение эффективности включения ритуксимаба в протокол В-NHL-BFM95 для лечения III–IV стадий В-НХЛ детского возраста.

С января 2000г по декабрь 2012г в исследование был включен 71 пациент с впервые установленным диагнозом В-НХЛ III–IV стадии. Среди больных в 3 раза преобладали мальчики, медиана возраста составила 9 лет. В соответствии с классификацией ВОЗ 2008г диагноз лимфомы Беркитта был установлен у 54 (76%) детей, диффузной В-крупноклеточной лимфомы – у 12 (17%), первичной медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфомы – 5 (7%).

Во всех случаях клетки В-НХЛ экспрессировали CD20. III стадия была диагностирована у 49 (69%) больных, IV – у 22 (31%). Все больные были разделены на 2 группы, в зависимости от включения в протокол лечения ритуксимаба. В основную группу вошло 46 пациентов, в программу лечения которых был добавлен ритуксимаб (R+). Ритуксимаб вводился в дозе 375 мг/м^2 в/в за 24ч до начала каждого блока ПХТ. Контрольную группу составили 25 больных, лечение которым проводилось по стандартному В-NHL-BFM95 протоколу (R–). Анализируемые группы больных были сопоставимы по полу, возрасту, морфоиммунологическим вариантам и стадиям В-НХЛ. ОВ в группе R– составила $75,2 \pm 8,1\%$ (медиана наблюдения $120,9 \pm 12,6$ мес.), тогда как в группе R+ данный показатель оказался $93,0 \pm 4,0\%$ (медиана наблюдения $97,0 \pm 3,7$ мес.). Полученные данные оказались статистически достоверными ($p < 0,02$).

Таким образом, ПХТ по протоколу В-NHL-BFM95 с включением таргетного препарата ритуксимаба достоверно повышает показатели 7-летней ОВ у пациентов с поздними стадиями В-НХЛ.

О.А. Богомолова

ДИАГНОСТИКА

ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КОСТНОМ МОЗГЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер

Диагностика гематогенного распространения эпителиальных опухолей на ранних стадиях – одна из главных проблем современной онкологии. В клинической практике пока не найдено рутинных методов обнаружения микрометастазов. Морфологически единичные разрозненные опухолевые клетки не определяются – требуется применение высокочувствительных иммунологических методов. Накапливаются данные о том, что количественное определение и характеристика диссеминированных опухолевых клеток позволяет получить важную прогностическую информацию и проводить мониторинг эффективности терапии. Для того чтобы контролировать эффективность воздействия лекарственных средств на микрометастазы нужно, в первую очередь, стандартизировать методы количественной оценки единичных диссеминированных опухолевых клеток.

Целью настоящей работы явилось установление степени гематогенной диссеминации у больных раком молочной железы (РМЖ) на основании обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител к эпителиальным антигенам.

Материалы и методы исследования. В работе использованы материалы клинического, морфологического, иммуноцитологического обследования 38 больных РМЖ, находящихся на лечении в ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер г. Ульяновска с ноября 2011 г. по настоящее время. В исследуемую группы вошли женщины в возрасте от 33 до 74 лет. Средний возраст составил $56 \pm 10,0$ лет. На момент постановки первичного диагноза пациентки распределились по стадиям следующим образом: I стадия была диагностирована у 3 (7,9%) больных, IIА – у 11 (29,0%), IIВ – у 3 (7,9%), IIIА – у 7 (18,4%), IIIВ – у 3 (7,9%), IIIС – у 6 (15,8%) и IV – у 5 (13,1%) пациенток. Наиболее частым гистологическим вариантом был инфильтративный смешанный рак (42,9%). Отмечена достаточно высокая частота инфильтративного протокового рака (28,6%). Реже встречались инфильтративный дольковый рак (21,4%) и другие формы рака (медулярный, папиллярный, тубулярный) – 7,1%. Больным было проведено стандартное клиническое обследование. Исследование костного мозга до начала лечения выполнялось как стандартными цитологическим и гистологическим методами, так и методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител к цитокератинам EpCAM (CD326). Материал для цитологического исследования и проточной цитометрии получали с помощью стерильной пункции. Объем костномозгового пунктата не превышал 0,5 мл, т.к. при большем объеме возможно разбавление образца периферической кровью. Проточная цитометрия проводилась на базе лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» РАОН (руководитель – д.м.н., проф. Н.Н. Тупицын). Исследование проводилось в координатах CD45/CD326. Предварительно было проведено иммуномагнитное обогащение клеток, связывающих антитела CD326 (EpCAM). Это позволило оценивать до 50 млн. миелокариоцитов у одного больного. Подсчет клеточности костного мозга и анализ миелограмм производился в клинической лаборатории. Для гистологического исследования выполнялась трепанбиопсия задне-верхней ости подвздошной кости с двух сторон.

Результаты исследования. При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были выявлены у 1 (2,6%) из 38 больных. Это пациентка, у которой IV клиническая стадия была установлена до обнаружения метастатических клеток в костном мозге (T4N3cM1, метастазы в печень, плевру). При гистологическом исследовании трепанобиоптатов подвздошной кости у данной больной было выявлено двухстороннее поражение костного мозга. В другом случае исходная стадия заболевания была расценена как IIIС (T4N3aM0), после гистологического обнаружения метастазов в костный мозг было проведено рестадирирование – стадия была изменена на IV. При дополнительной остеосцинтиграфии у этой пациентки были выявлены множественные остеопластические метастазы в кости, не подтвержденные рентгенологически. У обеих пациенток метастазы в костный мозг подтверждены с помощью метода проточной цитометрии.

Кроме того, у 8 из 38 больных в трепанобиоптатах были обнаружены единичные плазматические клетки или микроочаговое их скопление, что является косвенным признаком поражения костного мозга. При проточной цитометрии у 2 из этих 8 пациенток были обнаружены микрометастазы.

Единичные эпителиальные (опухолевые) клетки в образцах костного мозга были выявлены у 35 (92,1%) из 38 пациенток с помощью проточной цитометрии с применением моноклональных антител EpCAM (CD326). Важно то, что количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, было очень низким и в 77,1% случаев составило менее 1 клетки на 1 млн. миелокариоцитов. Лишь у 8 (22,9%) из 35 больных было выявлено от 1 до 10 (в одном случае – 44) эпителиальных клеток на 1 млн. миелокариоцитов. У 1 из 8 пациенток была диагностирована I стадия заболевания, у трех пациенток – IIА стадия. У остальных четырех пациенток была установлена IV стадия РМЖ (T4N3cM1), при этом у двух из них было выявлено метастатическое поражение костного мозга в трепанобиоптатах.

Если считать положительной реакцию при наличии 1 метастатической клетки среди 1 миллиона мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга (сумма количества лимфоцитов, моноцитов и плазматических клеток), то число таких пациенток составило 31 (88,6%) из 35. При этом только у 4 (11,4%) из 35 больных число клеток было ≥ 10 . У трех больных было выявлено наибольшее число клеток на 1 млн. МНК – 32, 35 и 330, соответственно. Четкий кластер опухолевых клеток – микрометастаз – при проведении проточной цитометрии был диагностирован у 4 (10,5%) из 38 пациенток. При этом в 3 из 4 случаев число клеток в образцах костного мозга было очень низким и составило менее 1 клетки на 1 млн. миелокариоцитов.

Таким образом, метод проточной цитометрии в сочетании с иммуномагнитным обогащением популяции опухолевых клеток позволил диагностировать микрометастазы у 11 (28,9%) из 38 больных.

Полагая, что обнаружение одной изолированной опухолевой клетки может быть диагностически незначимым, ряд исследователей попытался количественно определить «критическую» опухолевую нагрузку, превышение которой достоверно было бы связано с ростом частоты рецидива заболевания. Было показано, что количество рецидивов рака молочной железы резко возрастает при обнаружении в костном мозге 10 или 15 изолированных опухолевых клеток. В нашем исследовании не была прослежена общая и безрецидивная выживаемость в связи с небольшим сроком от начала исследования. Однако, одна больная с IV стадией РМЖ, у которой были подтверждены микрометастазы в костный мозг, погибла от прогрессирования заболевания во время проведения ей второго курса химиотерапии. Выявленные изменения в миелограммах пока не показали ассоциации этих признаков с присутствием отдельных опухолевых клеток в костном мозге. Работа в данном направлении будет продолжена.

Выводы. Возможность выявления единичных опухолевых клеток в костном мозге вследствие большей чувствительности является главным преимуществом метода проточной цитометрии в диагностике диссеминированных опухолевых клеток рака молочной железы в костном мозге по сравнению с морфологическими методами исследования: в 11 (28,9%) и 2 (5,2%) случаях из 38, соответственно. В тоже время обнаружение малого количества опухолевых клеток сложно трактовать в тех случаях, где они не формируют четкого кластера. При наличии такого кластера микрометастазы могут быть констатированы даже при наличии менее 1 опухолевой клетки на 1 млн миелокариоцитов. Нет четких данных о том, какова «критическая» опухолевая нагрузка костного мозга, превышение которой было бы связано с ростом частоты рецидива заболевания. Получение ответов на эти вопросы станет важным шагом на пути к индивидуализации антиметастатической терапии.

Е.О. Игнатова, М.А. Фролова, А.В. Петровский, Е.В. Малышева, Ж.И. Зубцова, Д.А. Зубцов, Е.В. Легченко, А.В. Лавров, С.А. Тюлядин.

АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В последние годы основные успехи в онкологии и, в частности, при раке молочной железы (РМЖ) связаны с индивидуализацией подходов к лечению. Особое место занимают опухоли с тройным негативным фенотипом, то есть отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов и Her2/neu, и, как следствие, мишеней для препаратов таргетного действия. Этот тип опухолей характеризуется неблагоприятным прогнозом.

В последнее время возрос интерес к использованию циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в качестве маркеров для определения прогноза заболевания, говорящих о необходимости назначения более или менее агрессивного лечения, и предиктивных факторов, позволяющих судить о чувствительности опухоли к проводимой терапии.

Цель работы – используя экспрессионные маркеры, определить наличие ЦОК в крови больных тройным негативным РМЖ до и после проведения предоперационной химиотерапии.

Материалы и методы

В исследование вошло 44 пациентки: в группу раннего РМЖ – 18, в группу местно-распространенного РМЖ – 26. Оценка степени патоморфологической регрессии (pCR) осуществлялась с использованием методики Chevallier. Анализ ЦОК проводился с помощью наборов для выделения клеток и определения выделенных клеток по экспрессии маркерных генов – Breast Select и Breast Detect (Adnagen, Германия), соответственно.

Результаты

ЦОК в группе раннего РМЖ в крови на момент постановки диагноза выявлены в 8 случаях из 18 (44,4%), в группе местно-распространенного РМЖ – в 8 из 26 (30,8%). Не выявлено статистически значимых различий в частоте обнаружения ЦОК в двух группах.

В группе раннего РМЖ прооперированы 16 пациенток, 2 продолжают лечение. В группе местно-распространенного РМЖ хирургическое вмешательство выполнено 15 пациенткам, 10 находятся в процессе лечения, 1 пациентка выбыла из исследования в связи с прогрессированием заболевания.

Частота pCR в группе раннего РМЖ составила 68,7% (11/16), в группе местно-распространенного РМЖ – 66,6% (10/15).

Наличие ЦОК на момент постановки диагноза не влияло на частоту pCR в двух группах.

ЦОК после неоадьювантной терапии в группе раннего РМЖ не были выявлены, в группе местно-распространенного РМЖ обнаружены у 4 пациенток (26,7%), из которых у 3-х ЦОК определялись и на момент начала лечения. У 1-ой из 3-х больных достигнута pCR, у 2-х – оставалась резидуальная опухоль.

У 4-й пациентки ЦОК стали определяться после лечения, в то время как на момент постановки диагноза они не обнаруживались. У этой пациентки зарегистрировано прогрессирование заболевания в процессе неоадьювантной химиотерапии. Интересно, что ЦОК были положительны по экспрессии *HER-2*, несмотря на то, что первичная опухоль была отрицательная по ER, PR, *Her2/neu* по данным ИГХ.

ЦОК могут являться потенциальным маркером эффективности терапии и прогноза течения заболевания. Фенотип ЦОК может отличаться от фенотипа первичной опухоли.

И.В. Самойленко, Г.Ю. Харкевич., И.Г. Маркина., Л.В. Демидов

АУТОИММУННЫЕ АНТИТЕЛА У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМой КОЖИ В ПРОЦЕССЕ АДЬЮВАНТНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ВЫСОКИМИ ДОЗАМИ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА

Отделение биотерапии опухолей, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

Адрес для переписки: i.samoylenko@ronc.ru

Введение. Адьювантная иммунотерапия меланомы кожи препаратами интерферона альфа 2b в настоящее время является единственным методом лечения, которая достоверно снижает риск прогрессирования основного заболевания и смерти от него.

В настоящее время не найдено каких-либо биомаркеров, которые бы позволили выделить группу пациентов, получающих максимальную пользу от проводимого лечения.

Материалы и методы. Мы проанализировали возможное влияние присутствия аутоантител IgG к тиреоглобулину (ТГ), тиреопероксидазе (ТПО), микросомальному антигену (МАГ), к рецепторам тиреотропного гормона (рТТГ), антиядерных антител (ANA) и к фосфолипидам (IgG + IgM) в сыворотке крови пациентов перед началом терапии и их появления в процессе лечения интерфероном на выживаемость без прогрессирования у больных, получающих адъювантную иммунотерапию интерфероном альфа 2b. Пациентам проводилось лечение по схеме интерферон альфа 2b 20 млн Ед/м² день 1–5, 4 недели, далее 5 млн. Ед 3р/нед, суммарно 52 недели.

Результаты. В период с марта 2009 по декабрь 2012 в исследование было включено 29 больных меланомой кожи. Средний возраст 45 лет $\pm$ 6,5 лет, мужчины – 54%, стадия ПС – 5 больных (17%), ППС – 24 больных (83%). Медиана времени без прогрессирования (ВБП) составила 16,0 мес. у больных ППС стадией и 16,9 мес. у больных ПС стадией (log rank $p > 0.5$); у пациентов с изъязвлением первичной опухоли – 10,6 мес., без изъязвления: 5,8 мес (log rank $p > 0.5$). У 5 из 29 больных (17%) на скрининге было выявлено диагностически значимое повышение одного или нескольких из определяемых показателей аутоантител. Ни у кого из пациентов не было выявлено клинических признаков аутоиммунных заболеваний. У всех пациентов с исходно повышенным уровнем антител они персистировали на протяжении лечения. Также в течение 1 года после начала лечения у 3 больных было отмечено повышение уровня антител к ТПО, р ТТГ, что сопровождалось понижением уровня ТТГ, но не развитием клинических симптомов. При проведении регрессионного анализа Соx не было выявлено связи между ВБП и исходным присутствием аутоантител или их появлением в процессе терапии ($p > 0.5$). Редукция дозы препаратов (во время индукционной фазы) потребовалась 38% больных. Частота досрочного прекращения терапии или редукции доз также не различалась в подгруппах пациентов с наличием или отсутствием аутоантител ($p > 0.5$).

Закключение: Исходное присутствие аутоантител не является предиктором успеха адъювантной иммунотерапии высокими дозами интерферона альфа 2В и не является фактором прогноза в отношении развития нежелательных явлений. Необходимы дополнительные исследования для обнаружения биомаркеров активности интерферона альфа в адъювантном режиме.

**ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН
Российский фонд
фундаментальных исследований**

***10-ая Международная конференция
«Иммунология гемопоэза»***

**Тема конференции:
«Возможности эрадикации
минимальной остаточной болезни
при раке и гемобластозах»**

6-7 июня 2013 г.

**Программа / Program
Moderator- PROFESSOR G. JANOSSY (UCL, LONDON, UK)**

***Xth International Conference
«Haematopoiesis Immunology»***

**«The possibilities of minimal residual disease
eradication in cancer and haemoblastoses»**

6-7 June, 2013

6 июня. Регистрация – весь день/ Registration 9.30-17.00

9.30-11.00 ОТКРЫТИЕ/ Opening Ceremony

Председатель: профессор *И.В. Поддубная* - Член-корреспондент РАМН, проректор по научной работе и международному сотрудничеству Российской медицинской академии последиplomного образования, зав. кафедрой онкологии РМАПО, председатель общества онкогематологов России

Chairwoman: Professor *Irina V.Poddubnaya* – Corresponding member of the Russian Academy of Medical Sciences, deputy Rector of Russian Academy of Postraduate Education, Head of Department of Oncology, Chairwoman of Russian Society of Oncohematologists

Приветственное слово организаторов конференции

- Член-корреспондент РАМН, профессор И.В. Поддубная / Corresponding member of Russian Academy of Medical Sciences, professor I.V.Poddubnaya
- Председатель оргкомитета конференции профессор Н.Н. Тупицын / Chairman of the Organizing Committee Professor Nikolay Tupitsyn
- Зав. Клинико-лабораторным отделом ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, профессор З.Г. Кадагидзе/ Head of Clinical Laboratory Department of FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, Professor Zaira G. Kadagidze
- Профессор Дж. Джаносси (Лондон, Великобритания), «Моноклональные антитела: от иммунодиагностики к иммунотерапии. Новые мишени и перспективы» / Professor G.Janossy (London, UK) «Monoclonal antibodies: from immune diagnosis to immune therapy. New targets and prospects»
- Профессор С. Динчер, президент ассоциации гематологов Турции «Турецкое законодательство в области аллогенных трансплантаций в онкогематологии. Достигнутые результаты» / Professor S.Dincer, President of Turkish Haematology Association, “The Turkish legislation in the field of allogeneic transplantations in Oncology and Hematology. The achieved results”.
- Доктор медицинских наук Л.Н. Любченко, зав. Лабораторией клинической онкогенетики ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» РАМН, Россия, «Молекулярно-генетическая диагностика меланомы как основа эрадикации» / Doctor of medical sciences L.N. Lubchenko, Head of Laboratory of medical oncogenetics FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Molecular genetic diagnosis of melanoma as a basis for the eradication»
- Профессор Е.М.Трещалина, Зав. лабораторией комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДИТО ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН «Теоретические и экспериментальные перспективы эрадикации меланомы» /Professor E.M Treshalina, Head of the laboratory of combined therapy of tumors, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Theoretical and experimental perspectives of melanoma eradication»

11.00 – СТВОЛОВЫЕ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ TUMOR STEM CELLS AND CIRCULATING TUMOR CELLS

Председатели: Профессор К. Пантель (Директор отдела биологии опухолей Университетского Медицинского центра Гамбург-Эппендорф, Германия), профессор А.А.Штиль (Заведующий лабораторией гибели опухолевых клеток, НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН, Россия), профессор В.А. Хайленко (Заведующий кафедрой онкологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова, Россия)

Chairpersons: Professor K. Pantel (Director of the Department of Tumor Biology University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany), Professor A.A. Shtil (Head, Laboratory of tumor cell death, Research Institute of Carcinogenesis FSBI “N.N.Blokhin RCRC” RAMN, Russia), Professor V.A. Khaylenko (Head of department of Oncology Pirogov Russian National Research Medical University, Russia)

11.00 – 11.20 Катерин Аликс-Панабиер, Ph.D. (Доцент, Университетский медицинский центр, Университет Монпелье, Больница Ст. Элуа, Институт исследований в биотерапии, Лаборатория редких циркулирующих клеток человека, Монпелье, Франция) «Методы определения и биологические свойства циркулирующих опухолевых клеток» / Catherine Alix-Panabieres, Ph.D. (Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier Laboratoire Cellules Circulantes Rares Humaines – LCCRH Institut de Recherche en Biothérapie – IRB, Université Montpellier 1, Hôpital Saint-Eloi – CHRU Montpellier, France) «CTC detection and biology»

11.20 – 11.40. Профессор К. Пантель «Клиническое значение определения и характеристики циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток» / Professor K.Pantel, M.D., Ph.D. (Germany), «Clinical implications of CTC/DTC detection and characterization»

11.40 – 12.10. Е. В. Морозова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гематологии, трансфузиологии, трансплантологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, (Россия) «Лейкозные стволовые клетки при ХМЛ: возможна ли эрадикация?» / E.V. Morozova Md, PhD (Assistant Professor of the chair of Hematology, Transfusiology and Transplantology St. Petersburg state medical University named after Acad. I.P. Pavlov) «Human leukaemic stem cells in CML: is the eradication possible?»

12.10 – 12.25. Брей Андреас, PhD (Германия) «Акустический цитометр Атьюн»/ Brey Andreas, PhD, Technical Sales Specialist Attune Flow Cytometer & Flow Solutions (Life Technologies, Germany) «The Attune acoustic cytometer»

12.25 – 12.45. С. Aanei, PhD, Ассистент профессора (Лаборатория гематологии, CHU Сант Этьен, Франция) «Место стромального микроокружения в патофизиологии миелодиспластических синдромов» / С. Aanei (Assistant Professor Laboratory of Hematology, CHU St. Etienne France), «The place of stromal micro-environment in myelodysplastic syndromes (MDS) pathophysiology»

12.45 – 13.05. Профессор В. Guvench (Секретарь ассоциации гематологов Турции) «Иммуноабсорбция с плазмаферезом» / Professor V. Guvench (Secretary of Turkish Hematology Association, Turkey) «*Immunoadsorption with plasmapheresis*»

13.05 – 13.15. Аспирант Е.О.Игнатова, (Россия) ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН «Анализ циркулирующих опухолевых клеток при проведении предоперационной химиотерапии больным тройным негативным раком молочной железы» / Postgraduate student E. O. Ignatova, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN (Russia) «Analysis of circulating tumor cells in conducting of pre-operative chemotherapy patients with triple negative breast cancer»

13.15 – 13.25. Аспирант О.А. Богомолова, ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, г. Ульяновск, «Диагностика диссеминированных клеток рака молочной железы в костном мозге с помощью метода проточной цитометрии» / О.А. Bogomolova Regional clinical Oncology center, Ulyanovsk, «Diagnosis of disseminated tumor of breast cancer cells in the bone marrow using Flow cytometry»

13.25 – 14.25 Обед/Lunch

14.25 – 16.10 ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ РАКА FUNDAMENTAL CANCER IMMUNOLOGY

Председатели: профессор З.Г. Кадагидзе (Россия), профессор Дж. Джаносси (Англия), профессор Б.В. Пинегин (Заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России), К. Ламбер (Франция)

Chairpersons: Professor Z. G. Kadagidze (Russia), Professor G. Janossy (London, UK), Professor B.V. Pinegin (Head of department of Immune diagnostics and immune correction “State Scientific Center Institute of Immunology” Federal Medical Biological Agency, Russia), C. Lambert (France)

14.25 – 14.45 Профессор Б.В. Пинегин, в.н.с. М.В. Пашенков (Отдел иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России) «Врожденный противоопухолевый иммунитет. Возможности стимуляции» / Professor B. V. Pinegin, leading researcher M. V. Paschenkov (the Department of immunodiagnostics and immunocorrection «SSC Institute of immunology», Federal Medical-Biological Agency of Russia) «Innate anti-tumour immunity. Possibilities of stimulation»

14.45 – 15.05. К. Ламбер, Ph.D., Президент Европейского общества по клиническому клеточному анализу (ESCCA); консультант, Лаборатория иммунологии, Университетская больница, Высшая национальная горная школа, Сант-Этьен, Франция) «Необычные фенотипы Т-клеток, определяемые проточной цитометрией» / Claude Lambert, Ph.D. President of European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA; Consultant, Immunology Lab CHU/ Univ Hospital & Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint-Etienne, France), «T-cells unconventional phenotypes on Flow cytometry».

15.05 – 15.25 Профессор Кадагидзе З.Г., Зав. Клинико-лабораторным отделом ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, «Основные популяции Т-клеток при опухолевом росте» / Professor Zaira G. Kadagidze, Head of Clinical Laboratory Department of FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN (Russia) «T-cell subpopulations in tumor growth»

15.25 – 15.40. Профессор Тупицын Н.Н. Зав. Лабораторией иммунологии гемопоза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, «Роль костного мозга в противоопухолевом иммунитете» / Professor Nikolai N. Tupitsyn, Head of the Laboratory of Haematopoiesis Immunology, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN (Russia), «Role of bone marrow in tumor immunity»

15.40 – 15.50. Ф.А. Шамилов, ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН, (Россия) «Полиоксидоний в неoadъювантной иммунотерапии рака молочной железы» / F.A. Shamilov, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN (Russia), «Poly-oxidonium in neo-adjuvant immunotherapy of breast cancer»

15.50 – 16.00. Кандидат медицинских наук С.В. Лепков, Доцент кафедры госпитальной терапии №2 РНИУ им. Н.И.Пирогова «HCV-ассоциированные лимфомы» / S.V. Lepkov, MD., Ph.D., Assistant Professor, Chair of Hospital Therapy, Pirogov RNRMU, Russia «HCV-associated lymphoma»

16.00 – 16.10. кандидат медицинских наук И.В.Самойленко, отделение биотерапии опухолей НИИ Клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» РАМН, «Аутоиммунные антитела у больных меланомой кожи в процессе адъювантной иммунотерапии высокими дозами интерферона альфа» / I.V. Samoylenko, MD, PhD FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Auto-immune antibodies in patients with melanoma of the skin in the process of adjuvant immunotherapy with high doses of interferon Alfa»

7 июня 2013 г

**9.30 – 12.25. НОРМАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
И МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ
ПРИ ОПУХОЛЯХ КРОВИ**

**NORMAL DIFFERENTIATION,
AND MINIMAL RESIDUAL DISEASE
IN TUMORS OF THE BLOOD**

Председатели: Prof.dr. A.A. van de Loosdrecht (Нидерланды), доцент Е.В. Морозова (Россия), A. Rawstron, Ph.D (Англия), профессор С.Динчер (Турция), профессор Денис Гиотат (зав. отделением гематологии института канцерологии, г. Сант Этиен, Франция), доктор медицинских наук И.С.Долгополов (ведущий научный сотрудник, отделение трансплантации НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН

Chairpersons: Professor A.A. van de Loosdrecht (Netherlands), Assistant Professor E.V. Morozova (Russia), A. Rawstron, Ph.D (UK), Professor S.Dincer (Turkey), professor Denis Guyotat (Head of Hematology department, Institute Cancerologie, Saint Etienne, France), I.S.Dolgoplov, doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Department of Transplantation, Institute of Children Oncology and Hematology FSBI “N.N.Blokhin RCRC” RAMN

9.30 – 9.50. Профессор гематологии А.А. ван де Лоосдрехт (Отдел гематологии, центр изучения рака, Университетский медицинский центр, Амстердам, Нидерланды) «Иммунологические профили нормального и диспластического кроветворения: роль при миелодиспластических синдромах»/ Prof.dr. A.A. van de Loosdrecht (Professor of Hematology Department of Hematology, Cancer Center Amsterdam VU University Medical Center, Amsterdam, Netherlands) «Immunological profiles of normal and dysplastic hematopoiesis: the Impact in Myelodysplastic Syndromes»

9.50 – 10.10 Кандидат медицинских наук К.Н. Мелкова, Зав. отделением трансплантации костного мозга, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН «Всегда ли показана эрадикация минимальной остаточной болезни в онкогематологии?» / Ph.D. K.N. Melkova, Head of Department bone marrow transplantation, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN (Russia) «Is it always necessary to eradicate minimal residual disease in oncohematology?»

10.10 – 10.20 Кандидат медицинских наук Ю.В.Червонобаб «Качество жизни онкогематологических больных» / Ph.D. Y.V. Chervonobab «The quality of life of oncohematological patients»

10.20 – 10.30. Е.М. Грецов (ООО «Биолайн», Россия) «Методические подходы к изучению МРБ при гемобластозах» / E.M. Gretsov ("Bioline", Russia) "Methodological principals of MRD determination in Haemoblastoses"

10.30 – 10.50. А.Раустрон., Ph.D. Консультант, клинический исследователь, HMDS, отделение гематологии института онкологии St. James's (Лидс, Англия) «Материалы совещания FDA (8 марта 2013 г.): роль МРД в клинических протоколах при ХЛЛ» / Professor Rawstron A., Ph.D., Consultant Clinical Scientist HMDS Department of Haematology St. James's Institute of Oncology (Leeds, UK), «An update of the FDA meeting (8th March, 2013) designed to determine whether residual disease in CLL is an appropriate end-point for clinical trials»

10.50 – 10.55. Кандидат медицинских наук А.С. Поляков, Начальник гематологического отделения клиники факультетской терапии ВМА им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия, «Клинический случай. ХЛЛ у больной пожилого возраста. Определение МРБ» / A.S. Polyakov, Ph.D., Head of Haematological Department, Faculty Therapy clinic S.M. Kirov MMA, St.-Petersburg (Russia), «Case report. CLL in elderly patient. MRD determination»

10.55 – 11.15. Профессор А.В. Филатов, Зав. лабораторией иммунохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, «Физиологическая основа aberrантного фенотипа В-ХЛЛ» / Professor A.V. Filatov, Head of the laboratory of immunochemistry «SSC Institute of immunology» FMBA, Russia «The physiological basis of the aberrant phenotype In CLL»

11.15 – 11.35. Профессор Лидия Кампос (Франция), Руководитель службы лабораторной гематологии, зам. координатора программы биологии и патологии, группа биологии и биотерапии, член административного совета ассоциации цитометрии Франции, Сант Этьен) «Минимальная резидуальная болезнь при ОМЛ» / Professor Lydia Campos, Chef de service Laboratoire d'Hématologie Coordonnatrice adjointe du Plateau Biologie Pathologie LBMC-UMR5239 / Groupe Oncologie et Biothérapies Membre CA - Association Française Cytométrie CHU (France), «Minimal Residual disease in AML»

11.35 – 11.55. Кандидат медицинских наук Шаманский С.В., Зав. отделением интенсивной химиотерапии и миелотрансплантации ГНЦ ГВКГ им. академика Н.Н.Бурденко, Россия «Посттрансплантационная терапия при множественной миеломе: контроль минимальной остаточной болезни» / S.V. Shamanskiy, MD, Ph.D., Head of the Department of intensive chemotherapy and myelotransplantation, N. N. Burdenko Central Military Hospital «Posttransplantation therapy for multiple myeloma: monitoring of minimal residual disease»

11.55 – 12.15 Доктор медицинских наук А.В. Попа, Зав. отделением химиотерапии гемобластозов НИИ ДОиГ ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН «Роль эрадикации МРБ в улучшении результатов лечения ОЛЛ у детей» / Doctor of medical Sciences A.V. Popa, Head of the Department of chemotherapy of hemoblastoses Institute of Children oncology and hematology FSBI “N.N.Blokhin RCRC” PAMN, «The role of MRD eradication in improvement of treatment results in children ALL»

12.15 – 12.25. Кандидат медицинских наук Т.Т. Валиев, НИИ ДОиГ ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» РАМН, Москва «Таргетная терапия поздних стадий В-клеточных лимфом у детей» / Valiev T.T. , Ph.D. Institute of Children Oncology FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, (Russia), «Targeted therapy of advanced stages B-cell lymphomas in children»

12.25 – 12.35. Т.З. Чернявская отделение трансплантации костного мозга ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН «Использование стимулированного костного мозга для трансплантации» / T.Z. Chernyavskaya, Department of bone marrow transplantation FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Stimulated bone marrow in transplantation»

12.35 – 12.50 Перерыв, кофе. Coffee-break

**12.50-13.40 НОВОЕ В СЕЛЕКТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА –
ЕСТЕСТВЕННЫЕ ПЕНТАМЕРНЫЕ IgM-АНТИТЕЛА
NEWS IN IMMUNE THERAPY
OF CANCER – NATURAL PENTAMERIC IgM-ANTIBODIES**

Председатели: профессор Н.В. Бовин (Заведующий лабораторией углеводов, ИБХ им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН Россия), профессор Л.В. Демидов (Заведующий отделением биотерапии опухолей ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН,Россия), профессор И.К.Воротников заведующий хирургическим отделением опухолей молочных желез ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН

Chairmen: Professor N.V. Bovin (Head of Laboratory of carbohydrates, M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bio-organic chemistry, Academy of Sciences, Russia), Professor L.V. Demidov (Head of Dept. of bio-therapy FSBI “N.N. Blokhin RCRC” RAMN, Russia), Professor I.K. Vorotnikov – Head of Surgery Department of Breast Cancer, FSBI “N.N. Blokhin RCRC” RAMN

12.50 – 13.20. Ф. Хенсел, Ph.D., (Германия) Вице президент Research & Development, Patrys Ltd, Австралия «Patrys Ltd – компания, нацеленная на развитие естественных человеческих IgM антител для лечения рака», «Предклиническое развитие и ранняя клиническая оценка эффективности человеческих моноклональных антител IgM PAT-SC, специфичных для рака желудка» / Frank Hensel, Ph.D. (Germany) Vice President Research & Development, Patrys Ltd., Australia «Patrys Ltd – A Company focused on the development of natural human IgM antibodies for the treatment of cancer». «Preclinical development and early clinical evaluation of the gastric cancer specific human monoclonal antibodies IgM PAT-SC»

**13.20-13.40 ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАЗРАБОТКИ
РОССИЙСКИХ УЧЕНЫХ В ОБЛАСТИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА
PROMISING DEVELOPMENTS
OF RUSSIAN SCIENTISTS IN CANCER TREATMENT**

Председатель: профессор О.А.Рукавицын – начальник гематологического центра ГВКГ им. академика Н.Н.Бурденко

Chairman: Professor O.A. Rukavitsyn – Head of Haematological Center, N.N.Burdenko State Clinical Hospital

13.20 – 13.40. Кандидат химических наук Г.Г.Чиров, (Россия) Генеральный директор "National Pharmaceutical Technologies", «PF-114 – новый лекарственный кандидат для терапии резистентных форм хронического миелолейкоза, обусловленных мутациями в Bcr-Abl» / G.G. Chilov (Director general "National Pharmaceutical Technologies"), «A new drug candidate for treatment of resistant forms of chronic myeloid leukemia related to Bcr-Abl mutations»

13.40 – 14.20. ОБЕД / LUNCH

**14.20-16.00. ПЕРСПЕКТИВЫ ЭРАДИКАЦИИ РАКА
И ГЕМОБЛАСТОЗОВ
FUTURE DEVELOPMENT OF CANCER
AND HEMOBLASTOSES ERADICATION**

Председатели: профессор К.И. Жордания (Россия), доктор медицинских наук Е.В. Артамонова (Россия), доктор медицинских наук А.В. Попа (Россия)

Chairpersons: Professor K. I. Zhordania (Russia), Doctor of medical Sciences E.V. Artamonova (Russia), Doctor of medical Sciences A. Popa (Russia)

14.20 –14.40. Профессор Демидов Л.В., Зав. отделением биотерапии опухолей ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» «Меланома. Перспективы эрадикации. Роль иммунотерапии» / Professor L.V. Demidov, Head of the Department of biotherapy of tumors, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Melanoma. Perspectives of eradication. The role of immunotherapy»

14.40 – 15.00. Доктор медицинских наук Артамонова Е.В., Ведущий научный сотрудник отделения изучения новых противоопухолевых лекарств «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН «Диссеминированные солидные опухоли: возможна ли эрадикация резидуальных микрометастазов?» / Doctor of medical Sciences E.V. Artamonova, Leading researcher, Department for the study of new anticancer drugs, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Disseminated solid tumors: whether the eradication of residual metastases is possible?»

15.00 – 15.20. Профессор Жордания К.И., Ведущий научный сотрудник отделения гинекологии ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН, «Какова истинная частота ранних форм рака яичников?» / Professor K. I. Zhordani, Leading researcher Department of gynecology, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «What is the frequency of early forms of ovarian cancer?»

15.20 – 15.40. Кандидат медицинских наук А.А. Трякин, ведущий научный сотрудник отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» РАМН «Семинома. Наилучшие при солидных опухолях результаты химиотерапии. Задействована ли иммунная система?» / Ph.D. A.A. Tryakin, Leading researcher Department of clinical pharmacology and chemotherapy, FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMN, «Seminoma. The best chemotherapy results in solid tumors. Is immune system involved?»

15.40 – 16.00. Доктор биологических наук А.Ф. Карамышева, Ведущий научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н.Блохина» «Биологическое и клиническое значение экспрессии VEGF и VEGFR клетками множественной миеломы» / Doctor of biological Sciences A.F. Karamysheva, Leading researcher, laboratory of genetics of tumor cells research Institute of Carcinogenesis, «Biological and clinical significance of the expression of VEGF and VEGFR cells in multiple myeloma»

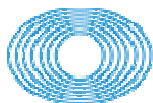
КОНКУРС РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ THE CONTEST OF YOUNG SCIENTISTS

Жюри: Председатель совета молодых ученых ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН кандидат медицинских наук И.В. Самойленко (Россия), Д-р Анди Раустрон (Англия), профессор В. Guvench (Турция), доктор биологических наук А.Ф. Карамышева (Россия), Профессор Лидия Кампос (Франция)

Jury: the Chairman of the Council of young scientists of the FSBI “N.N. Blokhin RCRC” of RAMN Candidate of medical Sciences I.V. Samoilenko (Russia), Dr. Andy Rawstron (England), Professor B. Guvench (Turkey), doctor of biological Sciences A.F. Karamysheva (Russia), Professor Lydia Campos (France)

16.00. ЗАВЕРШЕНИЕ КОНФЕРЕНЦИИ / CLOSING CONFERENCE

ОРГАНИЗАТОР КОНФЕРЕНЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский онкологический научный
центр имени Н. Н. Блохина»
Российской академии медицинских наук

При финансовой поддержке поддержке РФФИ,
грант № 13-04-06031- г



СПОНСОРЫ



BD



Рисунок к статье Л. Кампос

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ОСТАТОЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Picture by L. Campos

DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA BY FLOW CYTOMETRY

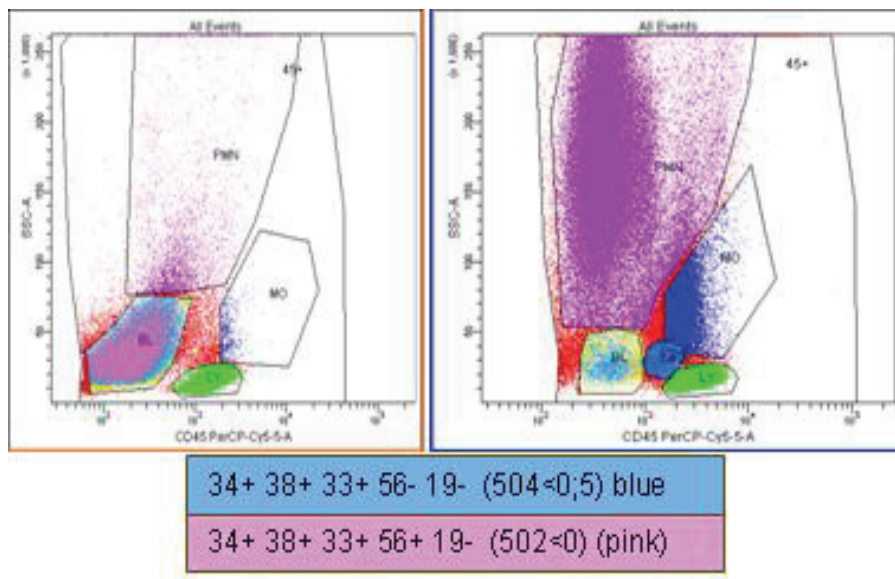


Рис. 1. Пример выявления ЛАФ у больного ОМЛ (6-цветная проточная цитометрия).

При постановке диагноза определялись 2 ЛАФ на бластах ОМЛ (левый график): первый aberrantный антигенный профиль $CD34^+CD38^+CD33^+CD56^-CD19^-$ (голубой цвет) встречается крайне редко (уровень выявления ниже 0,5% $CD45^+$ клеток в норме), а вторая aberrация $CD34^+CD38^+CD33^+CD56^+CD19^-$ (розовый цвет) в нормальном КМ полностью отсутствует. Одна из указанных популяций (голубой цвет, правый график) персистировала после химиотерапии и, следовательно, обусловила рецидив.

Гейтирование проведено на основе экспрессии $CD45$ в комбинации с SSC , что позволяет четко отделить клетки $CD45^{low}$ (желтый цвет) и aberrантные фенотипы (голубой и розовый цвета) от лимфоцитов (зеленый цвет), базофилов (бирюзовый цвет), моноцитов (синий цвет) и гранулоцитов (сиреневый цвет).

Fig. 1. Representative example for detection of LAPs in an AML patient (6 color flow cytometric assay).

Two LAPs on AML blasts have detected at diagnosis (left dot-plot): first aberrant antigen profile $CD34^+CD38^+CD33^+CD56^-CD19^-$ (light blue) is extremely infrequent (detection level is below 0.5% of $CD45^+$ cells in normal settings), and the second aberration $CD34^+CD38^+CD33^+CD56^+CD19^-$ (pink population) is totally absent in normal BM.

Post-chemotherapy one of these populations (light-blue; right dot-plot) persisted and thereafter has been responsible for relapse.

Gating is based on the expression of CD45 in combination with the SSC, which allows a clear separation of $CD45^{low}$ cells (yellow) and aberrant phenotypes (light-blue and pink) from lymphocytes (green), basophils (turquoise), monocytes (dark-blue), and granulocytes (lavender).

AML- DIAGNOSIS and AUTOGRAFT

34-DR-33+117-15-

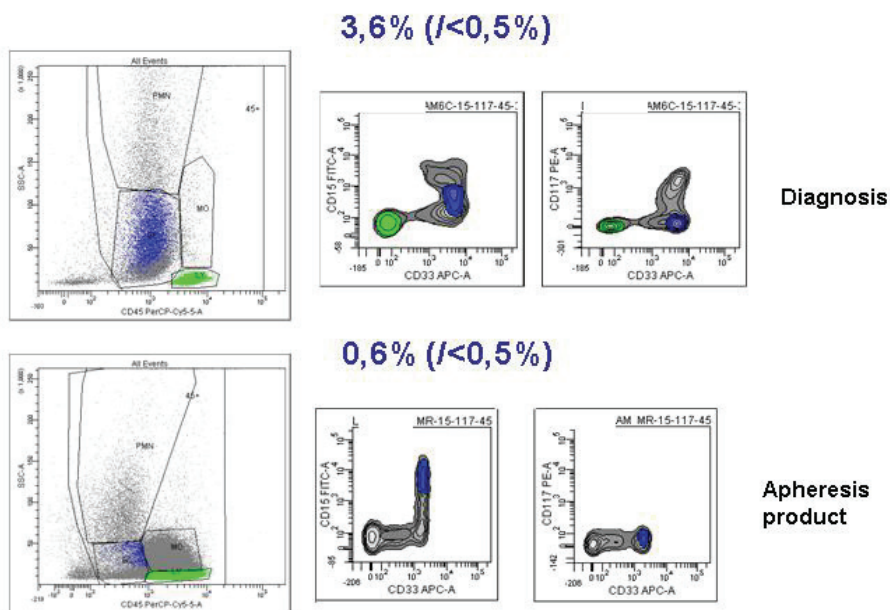


Рис. 2. Пример выявления ЛАФ в продукте аутологических СКПК.

ЛАФ ($CD34^+HLA^-DR^-CD33^+CD117^-CD15^-$) определялся во всех случаях ОМЛ при постановке диагноза (первый ряд; уровень детектирования 3,6% по сравнению с пороговым уровнем 0,5% в нормальном КМ), но не выявлен в продукте афереза (второй ряд).

Fig. 2. Example of LAP detection in autologous PBSC product.

LAP (CD34⁻ HLA-DR⁻ CD33⁺ CD117⁻ CD15⁻) detected in an AML patient at diagnosis (first line; level of detection of 3.6% compared to cut-off value of 0.5% in normal BM) has been uncovered in apheresis product (second line).

Рисунок к статье Т.В. Горбуновой

**АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ
ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ
ПРИ РАБДОМИОСАРКОМЕ И ОССЮ**

Picture by T.V. Gorbunova

**ANALYSIS OF CLINICALLY SIGNIFICANT SUBSETS
OF BONE MARROW LYMPHOCYTES IN CHILDREN
WITH RHABDOMYOSARCOMA AND ESFT**

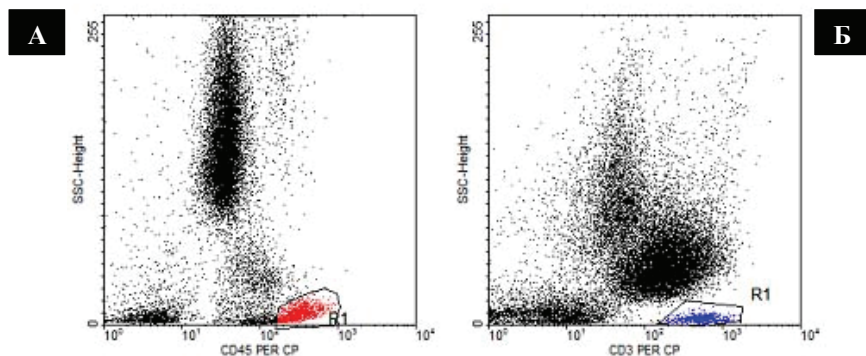


Рис. 1. Субпопуляции лимфоцитов КМ у детей обследуемого контингента.

А: гейт зрелых (CD45⁺⁺) лимфоцитов. Определение % Т– (CD3⁺), В– (CD19⁺), НК–клеток (CD3–CD56⁺) и CD5⁺ В-лимфоцитов в гейте зрелых лимфоцитов (CD45⁺⁺).

Б: субпопуляции Т-лимфоцитов в гейте CD3⁺.

Fig. 1. Lymphocyte subsets of bone marrow in children EAH.

A: gate of mature (CD45⁺⁺) lymphocytes for measuring proportions of Т– (CD3⁺), В– (CD19⁺), NK-cells (CD3–CD56⁺) and CD5⁺ В-lymphocytes in the gate of mature (CD45⁺⁺) lymphocytes.

В: gate of CD3⁺ cells for measuring Т-lymphocyte subset proportions.

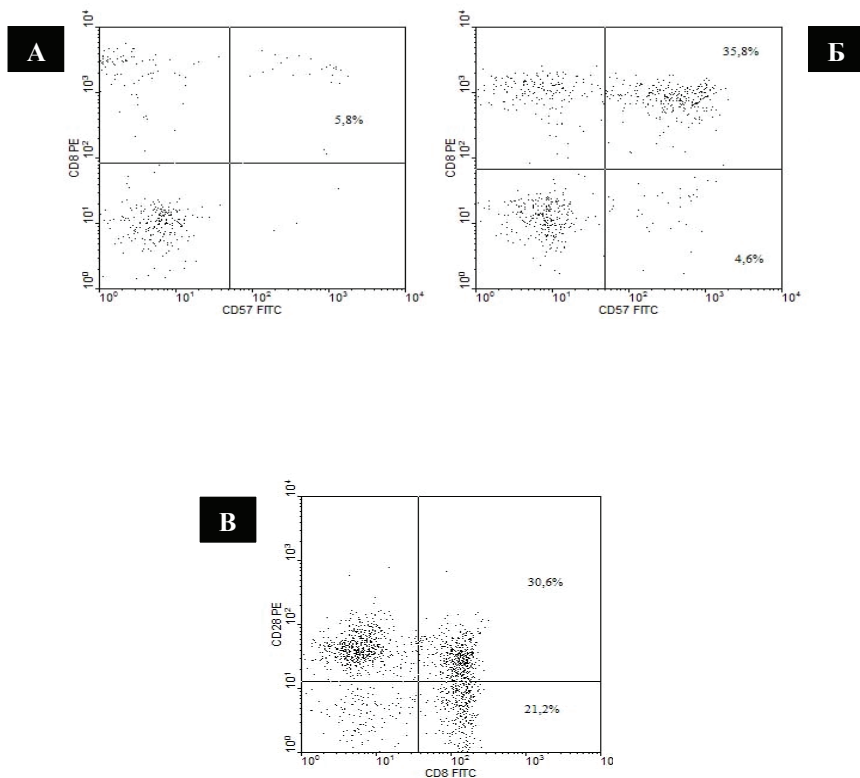


Рис. 2. Гетерогенность $CD8^+$ лимфоцитов костного мозга детей по экспрессии антигенов CD57.

А: низкая экспрессия.

Б: высокая экспрессия.

В: CD28. Представлены клетки в гейте $CD3^+$ лимфоцитов.

Fig. 2. Heterogeneity of $CD8^+$ lymphocytes in bone marrow of children by expression of CD57.

A: low expression.

B: high expression.

C: CD28. Cells in the gate of $CD3^+$ lymphocytes.

Рисунок к статье К. Ламбер

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫРАЖЕННОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ Т-КЛЕТОК МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Picture by C. Lambert

EXPLORING THE T CELL HIGH DIVERSITY USING FLOWCYTOMETRY

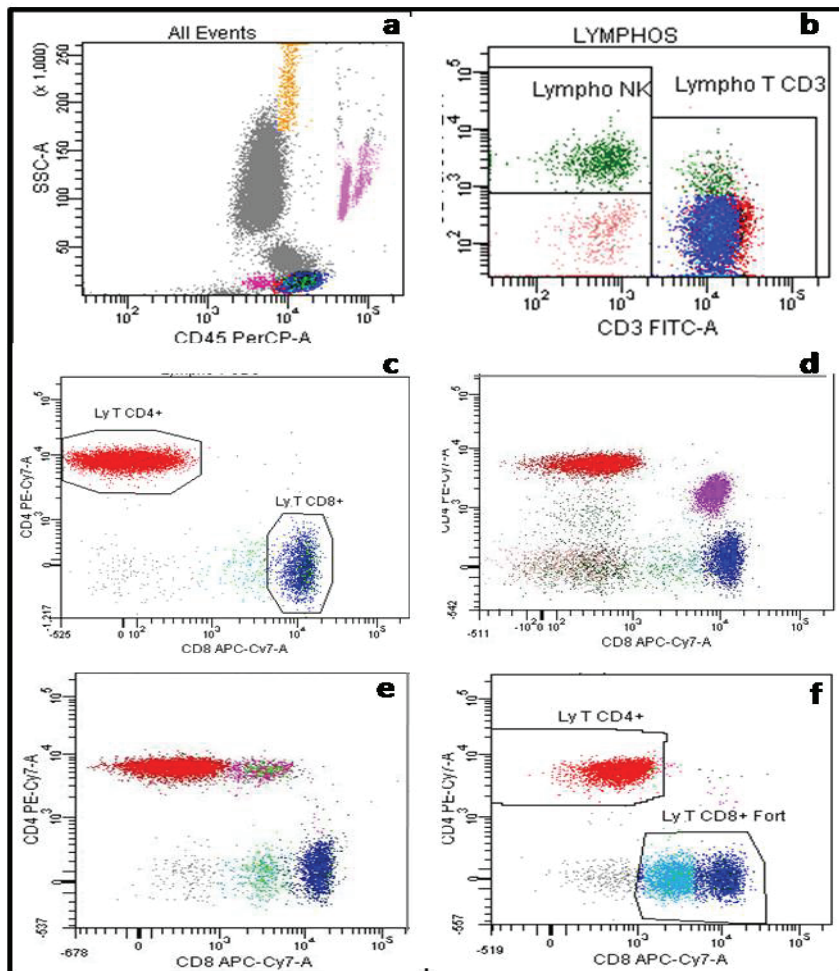
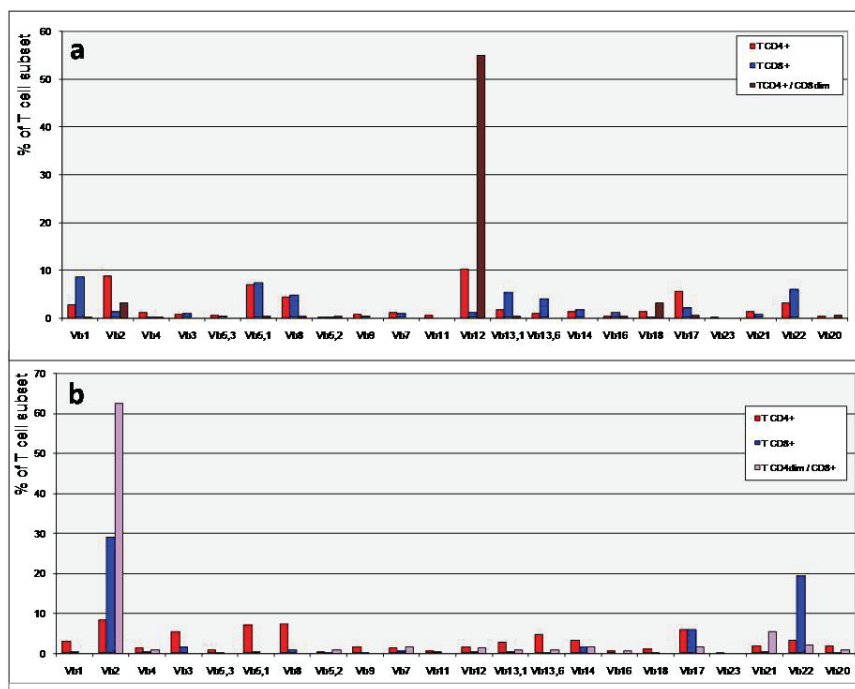


Рис. 1. Субпопуляции Т-клеток, идентифицированные методом проточной цитометрии с использованием одновременно 6 маркеров (CD4, а) и CD3, CD4, CD8, CD56, CD19 (b). Классические субпопуляции Т-клеток (CD4⁺ и CD8⁺, c) определяются среди CD3⁺ Т-клеток. Необычные фенотипы в отношении CD4 и CD8 наблюдаются как незначительные исключения у небольшого числа больных. Точечные графики с и d показывают CD3⁺ Т-клетки: CD4dimCD8⁺ (d), CD4⁺CD8dim (e) и CD8dim (f).

Fig. 1. T cell subsets identified by Flowcytometry using 6 simultaneous markers (CD45panel a) and on CD3, CD4, CD8, CD56, CD19 (panel b). Conventional T cell subsets (CD4⁺ or CD8⁺ panel c) are defined amont CD3⁺ T cells. More, non conventional phenotypes regarding to CD4 and CD8 markers are observed as minority except is few patients. Dot plots c to d are focused on CD3⁺ T cells: CD4dimCD8⁺ (panel d) CD4⁺CD8dim (panel e) and CD8dim (panel f).



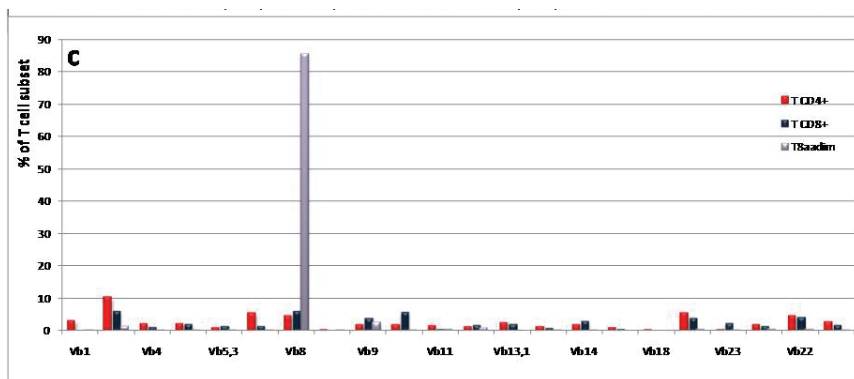
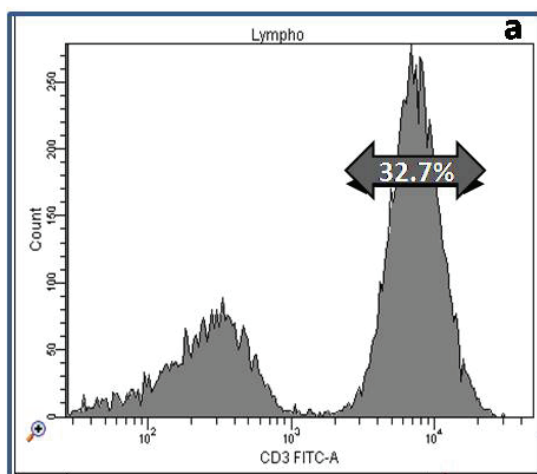


Рис. 2. ТКР Vβ клонотипы в CD4⁺ и CD8⁺ или необычных субпопуляциях Т-клеток у 3 репрезентативных больных. Образцы крови этих пациентов метили CD3, CD4, CD8α, CD8β и 2 из 22 антителами к клонотипам Vβ. Эти клонотипы широко представлены на обычных CD4⁺ Т-клетках, менее выражены на CD8⁺ Т-клетках и могут быть четко олигоклональными на не CD4⁺CD8dim (a), CD4dimCD8⁺ (b) и CD8dim Т-клетках (c).

Fig.2. Vβ clonotypes on T cell receptor in CD4⁺ or CD8⁺ or Non conventional T cell subsets in 3 representative patients. The patient samples were labelled with CD3, CD4, CD8α, CD8β and 2 of the 22 anti Vβ clonotypes. Clonotypes are widely distributed on conventional CD4⁺ T cells, less on CD8⁺ T cells and could be clearly oligoclonal on non CD4⁺CD8dim (panel a), CD4dimCD8⁺ (panel b) and CD8dim T cells (panel c).



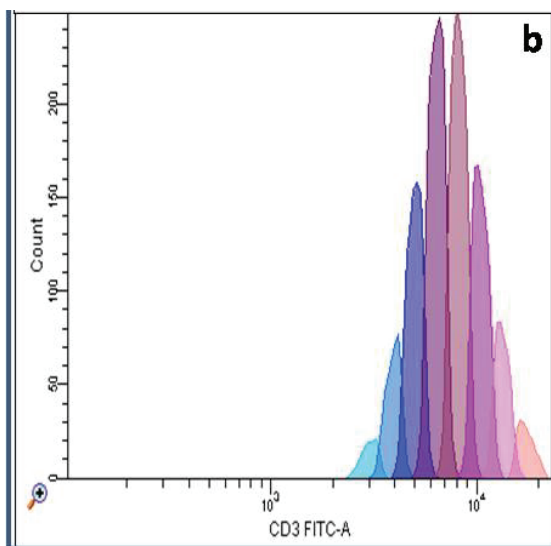


Рис. 3. Экспрессия CD3 на Т-клетках характеризуется большой вариабельностью, обусловленной различными уровнями CD3-ТКР, распознающими пептидный комплекс р-МНС.

Fig. 3. CD3 expression is highly variable on T cells corresponding to different levels of CD3-TCR available for recognition of the p-MHC peptide complex.

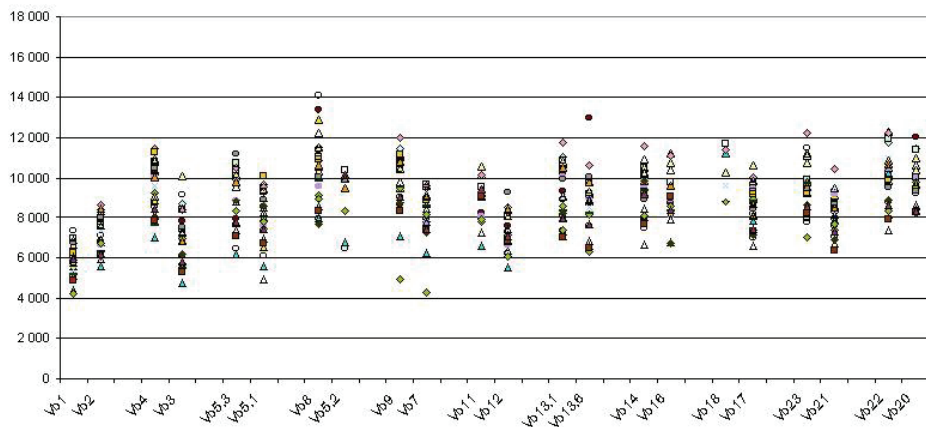


Рис. 4. Экспрессия CD3 на Т-клетках характеризуется большой вариабельностью в зависимости от клонотипа V β (например, CD8⁺ Т-клетки, 13 здоровых доноров).

Fig. 4. CD3 expression is highly variable on T cells in association with the V β clonotype (e.g. CD8⁺ T cells, 13 healthy donors).

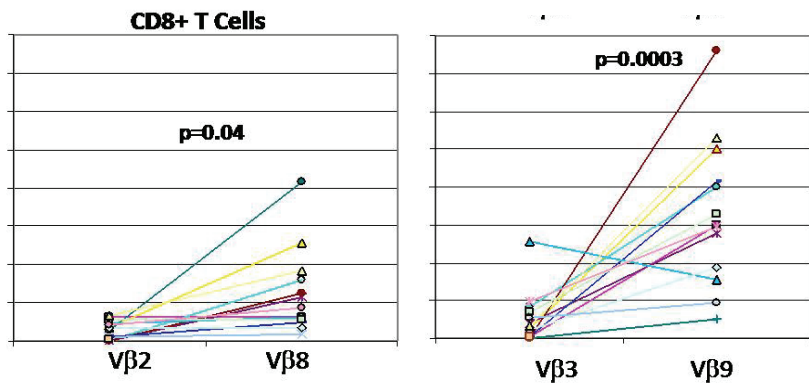


Рис. 5. Активация Т-клеток происходит быстрее при наличии высоких уровней клонотипа V β (V β 8 и V β 9), чем при низких уровнях (V β 2, V β 3), в соответствии с исходным уровнем экспрессии CD3 (например, CD8⁺ Т-клетки, 13 здоровых доноров).

Fig. 5. T cell activation is quicker on V β clonotype High (V β 8, V β 9) compared to (V β 2, V β 3) in correlation with the initial level of expression of CD3 (e.g. CD8⁺ T cells, 13 healthy donors).

Рисунок к статье К.М. Аanei
**РОЛЬ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ
 В ПАТОФИЗИОЛОГИИ МЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

Picture by Carmen Mariana Aanei

**THE PLACE OF STROMAL MICROENVIRONMENT
 IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES (MDS) PATHOPHYSIOLOGY**

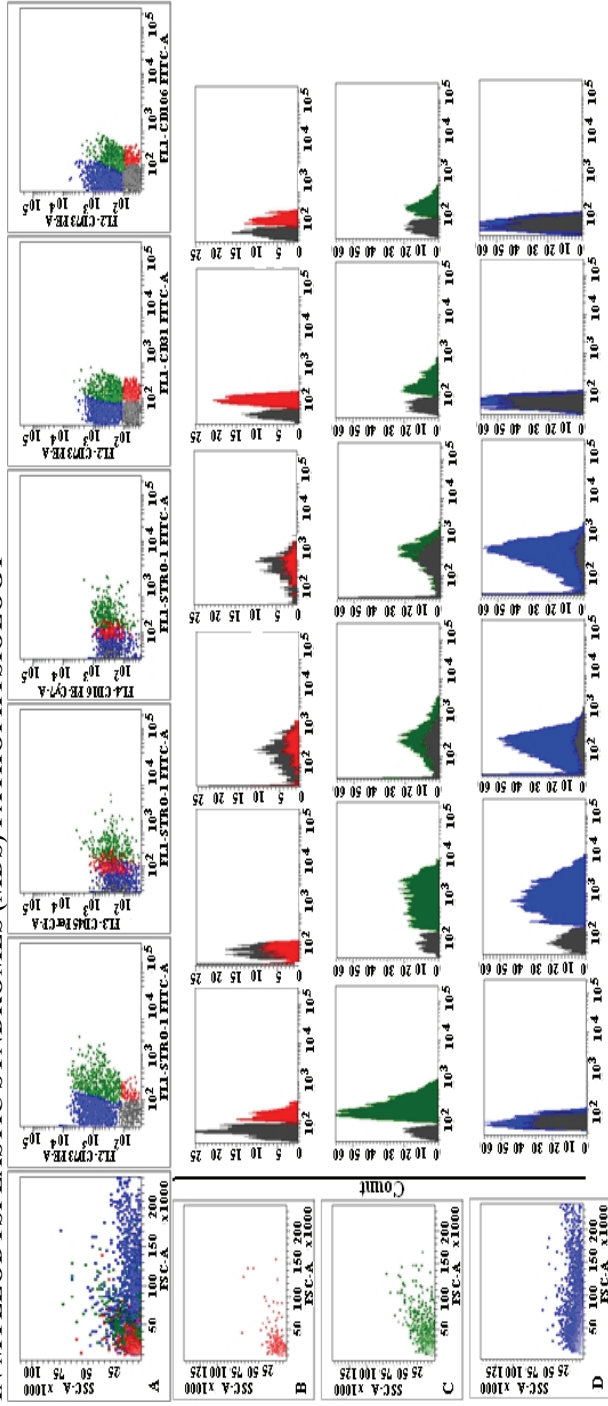


Рис. 1. Характеристика нормальных субпопуляций МСК КМ по экспрессии STRO-1 и CD73

Для каждого подтипа клеток приводятся представительные гистограммы: $FSC^{low}STRO-1 + CD73 -$ (красный), $FSC^{med}STRO-1 + CD73 +$ (зеленый) и $FSC^{var}STRO-1 - CD73 +$ (синий). Экспрессию гематopoзических и эндотелиальных маркеров сравнивали с аутофлуоресценцией неокрашенных клеток (серый). Рисунок приводится с изменениями по Aanei et al., 2012 [10].

Fig. 1. Characterization of normal BM-MSCs subpopulations according STRO-1 and CD73 expression.

Representative histograms were presented for each subtype of cells: $FSC^{low}STRO-1 + CD73 -$ (red), $FSC^{med}STRO-1 + CD73 +$ (green), and $FSC^{var}STRO-1 - CD73 +$ (blue). Hematopoietic and endothelium-related marker expression was compared with autofluorescence in unstained cells (gray). Figure adapted from Aanei et al, 2012 [10].

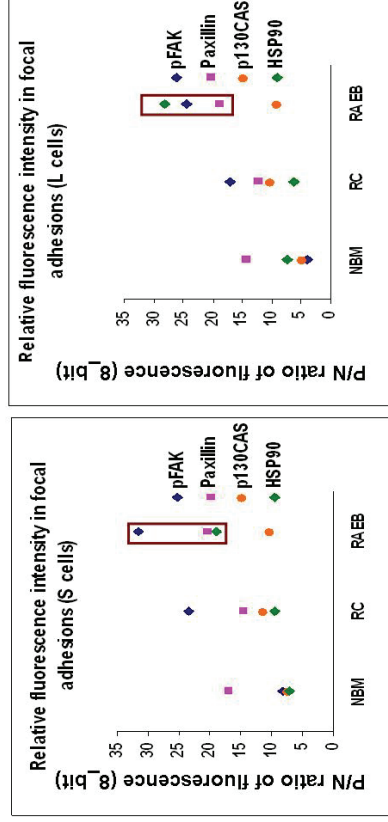


Рис. 5. Анализ средней интенсивности пикселей белков ФА в МДС-МСК по сравнению с нормальным контролем.

Относительная интенсивность экспрессии для паксиллина, pFAK, p130CAS и HSP90; ромбами показаны средние значения для 25 клеток на 1 донора; $n=4$, $n_{RC}=5$, $n_{RAEB}=4$.

Fig. 5. Mean Pixel Intensity (MPI) analysis of FA proteins in MDS-MSCs compared to normal controls.

Relative intensity of expression for paxillin, pFAK, p130CAS and HSP90, diamond symbols represents average values from 25 cells/case, $n_{normal} = 4$, $n_{RC} = 5$, $n_{RAEB} = 4$.

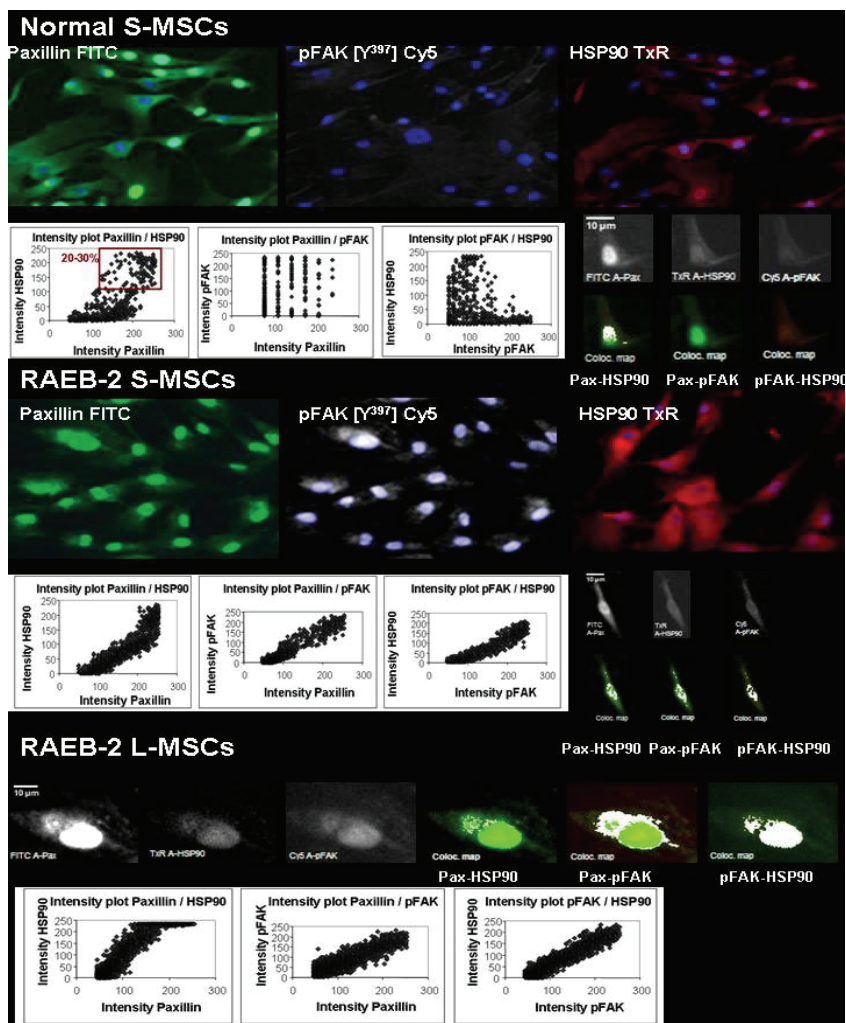


Рис. 6. Анализ ко-локализации белков ФА.

Репрезентативные изображения флуоресценции при двойном окрашивании на паксиллин-HSP90 $\alpha\beta$, паксиллин-pFAK [γ^{397}] и HSP90-pFAK [γ^{397}], карты ко-локализации и двухмерные флюорограммы ко-локализации в нормальных клетках и клетках больных RAEB.

Fig. 6. Colocalisation analysis of FA proteins.

Representative immunofluorescence images for paxillin-HSP90 $\alpha\beta$, paxillin-pFAK [γ^{397}], and HSP90 $\alpha\beta$ -pFAK [γ^{397}] double staining, the co-localization maps and 2-D co-localization fluorograms in normal cells and RAEB counterparts.

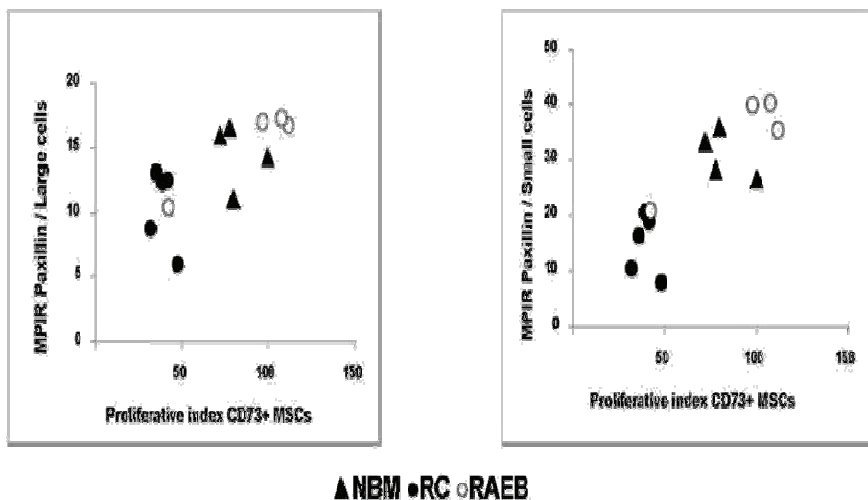


Рис. 7. Статистическая корреляция между интенсивностью экспрессии паксиллина на МСК и их пролиферативная способность.

Интенсивная ядерная экспрессия паксиллина в МДС-МСК индуцирует в них более выраженную пролиферативную способность по сравнению с нормальными МСК. Рисунок приводится с изменениями по Aanei et al., 2012 [10].

Fig. 7. Statistical correlation between the intensity of expression of paxillin on MSCs and their proliferative capacity.

Intense nuclear expression of paxillin in MDS-MSCs induces them a proliferative advantage compared to normal MSCs. Figure adapted from Aanei et al, 2011 [11].

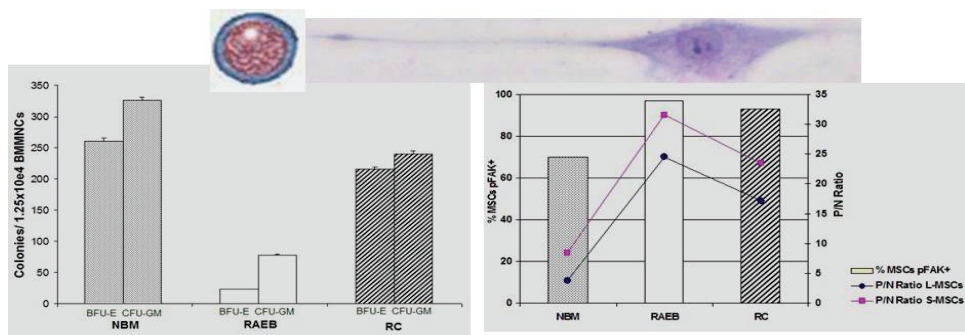


Рис. 8. Гиперэкспрессия pFAK в патологических стромальных клетках и ее влияние на клонотенный потенциал гематопозитических клеток-предшественников.

На левом графике показано среднее число БОЕ-Э (эритроидная бурс-образующая единица) и КОЕ-ГМ (гранулоцитарно-макрофагальная колоние-образующая единица) для каждой категории доноров. На правом графике показано процентное содержание pFAK-положительных МСК (столбики – значения по левой шкале) и относительная интенсивность экспрессии pFAK в крупных МСК (синий) и мелких МСК (розовый) в трех исследуемых группах; линии и ромбы – значения на правой шкале). Рисунок приводится с изменениями по Aanei et al., 2012 [10].

Fig. 8. pFAK overexpression in pathological stromal cells and its impact on clonogenic potential of hematopoietic precursors.

Left chart shows the mean number of BFU-E (burst-forming unit-erythroid) and CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte, macrophage) from each set of cases. The right chart shows the percentage of pFAK positive MSCs cells (columns, values should be compared with left scale), and the relative intensity of expression for pFAK in L-MSCs cells (blue) and S-MSCs (pink) in the three studied groups (lines and diamond symbols, values should be compared with right scale). Figure adapted from Aanei et al, 2011 [11].

Picture by Arjan A. van de Loosdrecht

THE EMERGING IMPACT OF FLOW CYTOMETRY IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

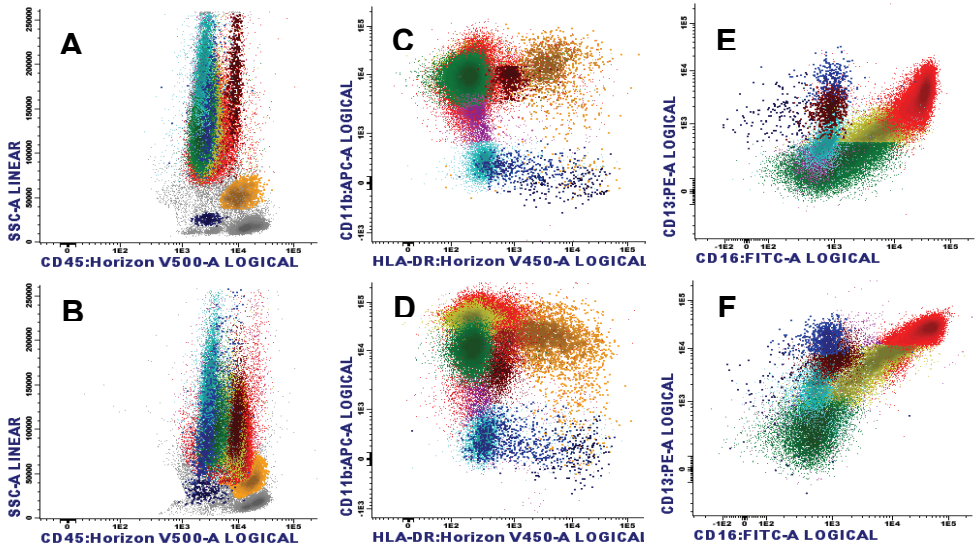


Fig. 1. Immunophenotypic patterns in the myelomonocytic compartment of an MDS bone marrow sample as compared to a normal control.

Multicolor density plots of a normal bone marrow sample and a case of MDS are illustrated in the upper row and lower row, respectively. Panel A and B depict CD45 (X-axis) vs. sideward light scatter (SSC; Y-axis) plots. Cell populations displayed are myeloid progenitor cells ($CD45^{dim}/SSC^{low\ to\ intermediate}$, dark blue), monocytes ($CD45^{int}/SSC^{int}$, orange) and neutrophils ($CD45^{dim}/SSC^{int\ to\ high}$ in multiple colors). Granularity (presented as sideward light scatter: SSC) of MDS neutrophils in panel B is aberrantly decreased as compared to that of the neutrophils in a normal control (panel A), indicating hypogranularity; the latter also holds true for the eosinophils (in brown). In panel C and D maturation patterns of the myelomonocytic subpopulations are shown in HLA-DR (X-axis) vs. CD11b (Y-axis) plots. HLA-DR+CD11b⁻ myeloid progenitor cells (dark blue) differentiate clockwise towards HLA-DR⁻CD11b⁺ neutrophils; differentiation towards HLA-DR+CD11b⁺ monocytes (in orange) occurs counterclockwise. The MDS case in panel D shows over expression of CD11b on more mature neutrophils (in red en pale green). In panel E and F maturation patterns of the selected neutrophil subpopulations are shown in CD13 (X-axis) vs. CD16 (Y-axis) plots. In panel E, the normal maturation from CD13⁻CD16⁻ immature neutrophils (in blue), via a CD13^{dim} interphase (in green) towards CD13⁺CD16⁺ mature neutrophils (in red) is displayed; eosinophils are depicted in brown. The MDS case in panel F shows abnormal concave instead of convex maturation profile (panel E).

Picture by O.P. Kolbatskaya

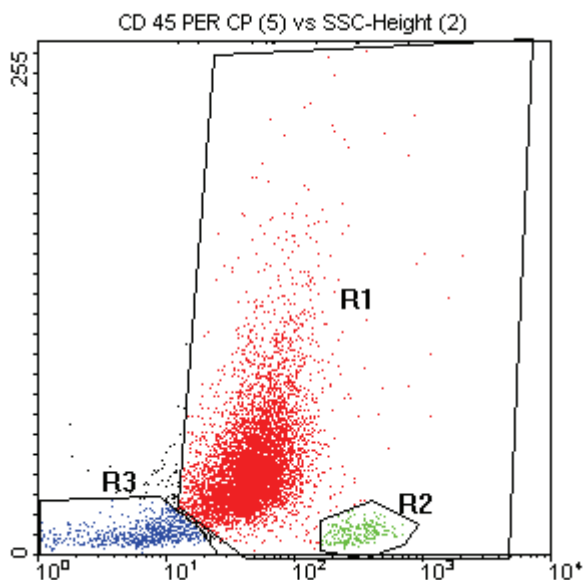


Fig. 1. An example of lymphocyte percentage assessment by cytometry in bone marrow from a patient with AML (Me subtype).

R1, leukocyte gate;

R2, lymphocyte gate;

R3, nuclear erythroid cells, erythrocytes, platelets, debris.

By cytometry, 3.2% of lymphocytes among leukocytes. Percentage of lymphocytes among myelokaryocytes as detected by cytometry is 3.13% (adjusted for nuclear erythroid cells by myelogram).

**НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН**



ТЕРАПИЯ ВЫСОКИХ ДОСТИЖЕНИЙ



Аб-ин: 2010-0144
Рег. Удостоверение: ЛРС П N013127/01 от 09.07.2010
Номер инструкции: П N013127/01-161009

Показания. *Неходжкинская лимфома* Рецидивирующая или химиоустойчивая В-клеточная, CD20-положительная неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности или фолликулярная. Фолликулярная лимфома III-IV стадии в комбинации с химиотерапией у ранее нелеченных пациентов. Фолликулярная лимфома в качестве поддерживающей терапии после ответа на индукционную терапию. CD20-положительная диффузная В-крупноклеточная неходжкинская лимфома в комбинации с химиотерапией по схеме СНОР. *Хронический лимфолейкоз* в комбинации с химиотерапией у пациентов, ранее не получавших стандартную терапию. Рецидивирующий или химиоустойчивый хронический лимфолейкоз в комбинации с химиотерапией. *Ревматоидный артрит* (активная форма) у взрослых в комбинации с метотрексатом при непереносимости или неадекватном ответе на текущие режимы терапии, включающие один или более ингибиторов фактора некроза опухолей (ФНО-α). Безопасность и эффективность препарата у детей не установлены. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к ритуксимабу, любому компоненту препарата или к белкам мыши, острые инфекционные заболевания, выраженный первичный или вторичный иммунодефицит. **Правила приготовления и хранения раствора.** Необходимое количество препарата набирают в асептических условиях и разводят до расчетной концентрации (1-4 мг/мл) в инфузионном флаконе (пакете) с 0.9% раствором натрия хлорида для инфузий или 5% раствором декстрозы (растворы должны быть стерильными и апиrogenными). Приготовленный инфузионный раствор Мабтеры физически и химически стабилен в течение 12 ч при комнатной температуре или в течение не более 24 ч при температуре от 2 до 8 °С. Мабтеру вводят внутривенно, инфузионно (медленно), через отдельный катетер. Нельзя вводить в/в болюсно или в виде в/в инъекций. **Дополнительная информация в инструкции по применению.**

МабТера
Ритуксимаб
В ЦЕНТРЕ УСПЕХА

ЗАО «Рош-Москва»
Официальный дистрибьютор
«Ф. Хоффманн - Ля Рош Лтд.» (Швейцария)
Россия, 107031 Москва
Трубная площадь, дом 2
Бизнес-центр «Неглинная Плаза»
Тел.: + 7 (495) 229-29-99
Факс: + 7 (495) 229-79-99
www.roche.ru





10 лет лаборатории иммунологии гемопоэза. Слева направо:
С.Ю. Тихонова, Н.В.Ковалева, Д.М.Новицкая, В.В.Тимошенко,
О.С. Двойникова, Е.Н. Шолохова, Л.Ю. Гривцова,
Н.Н. Тупицын, З.Д. Жарова, М.А. Френкель,
Н.Б. Лебедева, Т.Н. Азаровская, Н.А. Купрышина, А.В. Моженкова.

Hematopoiesis Immunology Lab. – 10 years. Photo of Laboratory.

20 мая 2013 г. May 20, 2013