

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ имени В.А. ЭНГЕЛЬГАРДА

На правах рукописи

Боголюбова-Кузнецова Аполлинария Васильевна

**Молекулярные, гистологические и иммунологические особенности редких
форм рака щитовидной железы**

Специальность 03.03.03 – Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Купраш Дмитрий Владимирович

Москва-2019

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
Основные условия роста опухоли.....	18
<i>Поддержание пролиферации</i>	20
<i>Уклонение от супрессоров роста</i>	21
<i>Активация инвазии и метастазирования</i>	21
<i>Приобретение репликативного бессмертия</i>	22
<i>Индукция ангиогенеза</i>	23
<i>Устойчивость к клеточной гибели</i>	23
<i>Изменение регуляции энергетического обмена клеток</i>	24
<i>Геномная нестабильность и мутации</i>	25
<i>Воспаление, усиливающее рост опухоли, а также ускользание опухоли от иммунного надзора</i>	26
Иммунный инфильтрат опухолей человека.....	26
Краткий обзор основных подходов иммунотерапии опухолей	34
Морфологические особенности папиллярного рака щитовидной железы	40
<i>ПРЩЖ из высоких клеток (tall cell variant)</i>	42
<i>ПРЩЖ из столбчатых клеток</i>	45
<i>ПРЩЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» (hobnail variant)</i>	46
<i>Уртино-подобный вариант ПРЩЖ</i>	47
<i>Сосуществование различных цитоморфологических компонентов ПРЩЖ в пределах одного опухолевого очага</i>	48
Иммунный инфильтрат опухолей щитовидной железы	49

Генетическая характеристика опухолей щитовидной железы	51
<i>Мутации в гене RAS</i>	51
<i>Мутации в гене BRAF</i>	52
<i>RET/PTC онкоген</i>	53
<i>Мутации в промоторе гена TERT</i>	54
<i>Генетические особенности отдельных вариантов ПРЦЖ</i>	55
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	58
Пациенты	58
<i>Когорта пациентов из Медицинского радиологического научного центра</i> <i>им. А.Ф. Цыба</i>	58
<i>Когорта пациентов из базы данных TCGA</i>	58
Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов.....	59
Выделение нуклеиновых кислот.....	61
Анализ клональности опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.....	61
Анализ транслокаций <i>RET/PTC1</i> и <i>RET/PTC3</i>	63
Мутационный анализ <i>BRAF V600E</i>	64
<i>In silico</i> анализ экспрессии хемокинов и цитокинов в опухолевой ткани .	64
<i>In silico</i> сравнительный анализ мРНК и микроРНК профиля Уортино- подобного и высококлеточного вариантов ПРЦЖ	65
<i>In silico</i> анализ иммунного инфильтрата опухолей щитовидной железы .	65
Статистическая обработка результатов.....	65
РЕЗУЛЬТАТЫ	66
Клинико-патоморфологический анализ проб Уортино-подобного варианта ПРЦЖ.....	67

Анализ структурных гистологических компонентов Уортино-подобного ПРЦЖ.....	67
Анализ основных драйверных мутаций в Уортино-подобном ПРЦЖ.....	69
Корреляция между наличием гистологического компонента из высоких клеток и <i>BRAF V600E</i> мутацией.....	71
Сравнительный анализ мРНК и микроРНК профилей Уортино-подобного и высококлеточного вариантов ПРЦЖ (база данных TCGA).....	73
Иммуногистохимический анализ иммунного инфильтрата Уортино-подобного ПРЦЖ.....	73
<i>In silico</i> анализ иммунологического статуса опухолей Уортино-подобного строения.....	79
<i>In silico</i> изучение факторов выживаемости и привлечения плазматических клеток в опухолевый очаг при Уортино-подобном ПРЦЖ.....	83
Анализ клональности опухоль-инфильтрирующих Т- и В-лимфоцитов...	84
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	87
ВЫВОДЫ.....	99
БЛАГОДАРНОСТИ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	118
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AKAP9 – А-киназа якорного белка 9;

AKR – альдокеторедуктаза;

APRIL (TNFSF13) – член надсемейства лигандов факторов некроза опухоли 13, внеклеточный белок, провоспалительный цитокин из надсемейства факторов некроза опухоли;

A-RAF – серин/треониновая протеинкиназа, член семейства RAF киназ;

BAFF (TNFSF13B) – член надсемейства лигандов факторов некроза опухоли 13B, внеклеточный белок, провоспалительный цитокин из надсемейства факторов некроза опухоли;

BAX – регулятор апоптоза, Bcl-2-подобный белок 4, член семейства генов Bcl-2;

BCL-2 – белок В-клеточной лимфомы 2, член семейства генов Bcl-2, регулирующих процессы апоптоза;

BCL-xL – экстра-длинный белок В-клеточной лимфомы 2, член семейства генов Bcl-2;

BCR – В-клеточный рецептор;

BCR/TCR Evenness – показатель, характеризующий клональность популяции Т- или В-лимфоцитов, определяется как количество клонов, составляющих 50% последовательностей BCR/TCR;

BCR/TCR Richness – показатель, характеризующий обогащение анализируемой пробы последовательностями BCR/TCR. В первом приближении, указывает на степень инфильтрации пробы ткани Т- и В-лимфоцитами;

BCR/TCR Shannon – показатель энтропии Шеннона, определяется как произведение BCR/TCR Richness и натурального логарифма от BCR/TCR Evenness;

BIM – Bcl-2-подобный белок 11, член семейства генов Bcl-2;

BIOMED-2/Euroclonality – протокол определения клональности Т- и В-лимфоцитов, основанный на мультиплексной ПЦР с последующим фрагментным анализом полученных ампликонов;

B-RAF – серин/треониновая протеинкиназа, член семейства RAF киназ;

BRAF K601E – мутация гена *BRAF*, замена лизина в 601 положении на глутаминовую кислоту;

BRAF V600E – мутация гена *BRAF*, замена валина в 600 положении на глутаминовую кислоту;

В-лимфоциты (они же В-клетки) – функциональный тип лимфоцитов, играющих важную роль в обеспечении гуморального иммунитета;

cAMP – циклический аденозинмонофосфат;

CCL25 – хемокиновый лиганд 25, член семейства CC хемокинов;

CCL28 – хемокиновый лиганд 28, член семейства CC хемокинов;

CD11b – кластер дифференцировки 11, интегрин альфа-M;

CD14 – кластер дифференцировки 14, является корецептором для TLR4;

CD15 – молекула кластера дифференцировки 15, 3-фукозил-N-ацетиллактозамин, углеводная молекула адгезии;

CD163 – молекула кластера дифференцировки 163, высокоаффинный фагоцитарный рецептор для гемоглобин-гаптоглобинового комплекса, маркер клеток моноцитарно-макрофагальной линии дифференцировки;

CD1d – молекула кластера дифференцировки 1d, член семейства гликопротеинов CD1;

CD20 – молекула кластера дифференцировки 20, В-лимфоцитарный антиген;

CD21 – молекула кластера дифференцировки 21, рецептор комплемента 2-го типа;

CD3 – молекула кластера дифференцировки 3, мультипротеиновый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов, являющийся основным корецептором Т-клеточного рецептора;

CD30 – молекула кластера дифференцировки 30, TNFRSF8, белок надсемейства факторов некроза опухоли;

CD33 – молекула кластера дифференцировки 33, трансмембранный рецептор на поверхности миелоидных клеток;

CD4 – молекула кластера дифференцировки 4, мономерный трансмембранный гликопротеин, являющийся корецептором TCR;

CD45RO – одна из изоформ молекулы кластера дифференцировки 45, белковая тирозинфосфатаза С типа, присутствует на поверхности Т-клеток памяти;

CD47 – молекула кластера дифференцировки 47, связанный с интегрином белок надсемейства иммуноглобулинов;

CD66 – молекула кластера дифференцировки 66, одна из изоформ раково-эмбрионального антигена;

CD68 – молекула кластера дифференцировки 68, трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся на клетках моноцитарного ряда;

CD79 α – молекула кластера дифференцировки 79А, альфа-цепь белка, связанного с В-клеточным антигенным рецепторным комплексом;

CD8 – молекула кластера дифференцировки 8, трансмембранный гликопротеин, являющийся корецептором TCR;

CDX2 – член семейства каудальных гомеобоксных факторов транскрипции;

CEA – раково-эмбриональный антиген;

C-RAF (RAF1) – серин/треониновая протеинкиназа, член семейства RAF киназ;

CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4, он же CD152, молекула – иммунологический чекпойнт;

CXCL10 – хемокин 10 с C-X-C мотивом, член семейства CXC хемокинов;

CXCL12 – хемокин 12 с C-X-C мотивом, член семейства CXC хемокинов;

CXCL9 – хемокин 9 с C-X-C мотивом, член семейства CXC хемокинов;

DAB – 3,3'-Диаминобензидин, органическое соединение, использующееся при иммуногистохимическом окрашивании ткани, является субстратом пероксидазы хрена;

EGFR – рецептор эпидермального ростового фактора;

ErCAM – молекула адгезии эпителиальных клеток;

ERBB – семейство белков, включающие в себя 4 рецептора тирозиновых киназ;

FAP – активирующий фибробласты белок альфа;

FFPE – ткань, фиксированная в формалине и заключенная в парафиновый блок;

FGF – фактор роста фибробластов;

FoxP3 – белок семейства FOX, транскрипционный фактор для регуляторных Т-лимфоцитов;

GD2 – дисиаialogанглиозид 2;

GD3 – дисиаialogанглиозид 3;

GLUT1 – транспортер глюкозы 1;

H4/D10S170 – ген, выступающий в качестве гетерологичного гена при образовании онкогена *RET/PTC1*.

HIF1 α – гипоксия-индуцируемый фактор 1 альфа;

HIF2 α – гипоксия-индуцируемый фактор 2 альфа;

HLA-DR – поверхностный рецептор МНС класса II;

HRAS – член подсемейства Ras суперсемейства малых ГТФаз;

IFN α – интерферон альфа;

IFN γ – интерферон гамма;

IgG – иммуноглобулины класса G;

IgH – тяжелая цепь иммуноглобулинов;

IL10 – интерлейкин 10;

IL13 – интерлейкин 13;

IL1 α – интерлейкин 1 альфа;

IL2 – интерлейкин 2;

IL4 – интерлейкин 4;

IL6 – интерлейкин 6;

ILCs – лимфоидные клетки врожденного иммунитета;

KIR – иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток;

KRAS – член подсемейства Ras суперсемейства малых ГТФаз;

LAG-3 – лимфоцит-активирующий ген 3;

LEF – лимфоидный энхансер-связывающий фактор;

MAP киназы – митоген-активированные протеинкиназы;

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор;

MDSC – миелоидные супрессорные клетки;

MET – тирозинпротеинкиназа;

MHCI – молекула главного комплекса совместимости I класса;

MHCII – молекула главного комплекса совместимости II класса;

MICA – MHC класса I, связанная с полипептидной последовательность A, поверхностный гликопротеин;

MICB – MHC класса I, связанная с полипептидной последовательность B, поверхностный гликопротеин;

miR-21 – микроРНК 21;

MMLV – обратная транскриптаза вируса мышиноного лейкоза;

MYC – семейство протоонкогенов MYC;

NF-κB – ядерный фактор энхансера каппа-легкой цепи активированных В-клеток, транскрипционный фактор, являющийся ключевым регулятором иммунного ответа;

NIFTP - non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear feature, неинвазивная фолликулярная опухоль щитовидной железы с ядрами папиллярного типа;

NKG2D – трансмембранный белок семейства CD94/NKG2 лектиноподобных рецепторов C типа;

NKT-клетки – Т-натуральные киллеры;

NK-клетки – натуральные киллеры;

NOS2 – синтаза оксида азота 2;

NOXA – Форбол-12-миристат-13-ацетат-индуцированный белок 1, член семейства генов Bcl-2;

NRAS – член подсемейства Ras суперсемейства малых ГТФаз;

PD-1 – белок программируемой клеточной гибели 1, молекула – иммунологический чекпойнт;

PD-L1 – лиганд белка программируемой клеточной гибели 1, молекула – иммунологический чекпойнт;

PI3-K – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа;

PIP3 – фосфатидилинозитол (3,4,5) –трисфосфат;

PUMA – p53-активированный модулятор апоптоза, член семейства генов Bcl-2;

RAE1 – фактор экспорта мРНК 1;

RAF – серин/треониновые протеинкиназы семейства RAF;

RAS – семейство малых G-белков;

RB – ген ретинобластомы;

RET/PTC1 – онкоген, образованный геном *RET* и *H4/D10S170*;

RET/PTC3 – онкоген, образованный геном *RET* и *RFG/ELE1*;

RFG/ELE1 – ген, выступающий в качестве гетерологичного гена при образовании онкогена *RET/PTC3*;

ROR γ t – тканевый RAR-связанный орфанный гамма-рецептор, транскрипционный фактор Th17 лимфоцитов;

TBE – трис-боратный буфер;

TCGA – The Cancer Genome Atlas, геномный атлас опухолей человека;

TCR – T-клеточный рецептор;

TCRG – гамма-цепь T-клеточного рецептора;

TEMED – тетраметилэтилендиамин;

TERT – теломеразная обратная транскриптаза;

Tfh – фолликулярные T-хелперы;

TGF β – трансформирующий фактор роста бета;

Th1 лимфоциты – T хелперы 1 типа;

Th17 лимфоциты – T хелперы 17 типа;

Th2 лимфоциты – T хелперы 2 типа;

ТНСА – опухоли щитовидной железы;

TIM-3 – T-клеточный белок, содержащий иммуноглобулин- и муцин-домены, молекула – иммунологический чекпойнт;

TNF – фактор некроза опухолей;

TP53 – опухолевый белок 53, ключевой ген-опухолевый супрессор;

Treg – регуляторные T-лимфоциты;

TSP-1 – тромбоспондин 1;

T-киллеры – цитотоксические T-лимфоциты;

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов;

VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов А;
VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов;
АТФ – аденозинтрифосфат;
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;
ГТФ – гуанозинтрифосфат;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
кДНК – комплементарная ДНК;
мРНК – матричная РНК;
МРНЦ – Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;
ОАА – опухоль-ассоциированные антигены;
олиго-dT праймер – праймер, гибридизующийся с polyA последовательностью;
ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
РЩЖ – рак щитовидной железы;
ТЛС – третичные лимфоидные структуры;
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Клетки иммунной системы – неотъемлемый компонент микроокружения неопластической ткани. Часть иммунных клеток (в основном миелоидного ряда) вырабатывают различные провоспалительные факторы и тем самым поддерживают хроническое воспаление и стимулируют прогрессию опухолей. В то же время, согласно теории иммуноредактирования опухолей, многие лимфоидные клетки (Т- и В-лимфоциты, НКТ-клетки и НК-клетки) принимают активное участие в реализации противоопухолевой защиты, оказывая подавляющее воздействие на рост опухоли. Таким образом, для выявления прогностической и диагностической роли иммунного инфильтрата опухолей важна оценка не только его интенсивности, но и субпопуляционного состава образующих его клеток.

Одним из редких гистологических вариантов папиллярного рака щитовидной железы (ПРЩЖ) является Уортино-подобный ПРЩЖ, характеризующийся обильной лейкоцитарной инфильтрацией стромы опухоли. Немногочисленные работы, посвященные описанию отдельных случаев Уортино-подобного ПРЩЖ, указывают на встречающиеся в нем цитологические особенности, характерные для агрессивных вариантов ПРЩЖ. Так, некоторые участки опухоли могут демонстрировать цитологические особенности, характерные для агрессивного ПРЩЖ из «высоких клеток» (обильная эозинофильная цитоплазма и четкие очертания, а также длина клетки, в 2-3 раза превышающая ширину). Тем не менее, прогноз для пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЩЖ благоприятен. Детальный анализ морфологических особенностей Уортино-подобного ПРЩЖ, а также разносторонний анализ иммунного инфильтрата в таких опухолях могут пролить свет на фундаментальные аспекты взаимодействия опухолевых клеток и иммунной системы.

Целью данной работы было изучение морфологических, молекулярно-генетических и иммунологических особенностей Уортино-подобного варианта ПРЩЖ.

В соответствии с данной целью были поставлены следующие задачи:

1. Выявление морфологических особенностей опухолей Уортино-подобного строения, связанных с агрессивным течением ПРЦЖ;
2. Изучение молекулярно-генетических характеристик Уортино-подобного варианта ПРЦЖ (идентификация мутаций в генах *BRAF* и *TERT*, транслокаций *RET/PTC1* и *RET/PTC3*, изучение экспрессионных профилей мРНК и микроРНК) и их сравнение с таковыми в ПРЦЖ из высоких клеток;
3. Характеристика субпопуляционного состава иммунного инфильтрата опухолей Уортино-подобного строения и особенностей его пространственной организации;
4. Анализ клональности Т- и В-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоли Уортино-подобного строения.

Научная новизна работы

В данной работе впервые представлен комплексный морфологический и молекулярный анализ Уортино-подобного варианта ПРЦЖ. Особое внимание было уделено поиску взаимосвязей между молекулярно-генетическими, гистологическими и иммунологическими особенностями этого редкого варианта ПРЦЖ.

Впервые было показано, что, несмотря на прогностическую благоприятность Уортино-подобного ПРЦЖ, в данной опухоли нетипично часто обнаруживается фокальный компонент из так называемых «высоких клеток», ассоциированных с агрессивным течением заболевания.

Кроме того, опухоли Уортино-подобного строения были проанализированы на наличие таких мутаций, как *BRAF V600E*, мутаций в промоторе гена *TERT*, а также транслокаций *RET/PTC1* и *RET/PTC3* (исследованы в контексте Уортино-подобного ПРЦЖ впервые). В результате было продемонстрировано, что наличие мутации *BRAF V600E* коррелирует с наличием компонента из высоких клеток.

Нами впервые был проведен комплексный качественный и количественный анализ субпопуляционного состава иммунного инфильтрата Уортино-подобного ПРЦЖ. В частности, были проанализированы популяции CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD45RO⁺ Т-клеток памяти, CD79α⁺CD20⁺ В-лимфоцитов, CD79α⁺CD20⁻ плазматических клеток, CD21⁺ фолликулярных дендритных клеток, а также CD68⁺ моноцитов/макрофагов. Было показано бимодальное распределение иммунного инфильтрата между стромой опухоли и третичными лимфоидными структурами (ТЛС), а также значительное преобладание плазматических клеток в строме опухоли.

Характеризация субпопуляционного состава ТЛС при Уортино-подобном раке была также проведена впервые. Было продемонстрировано зонирование ТЛС на Т- и В-клеточные зоны, а также наличие в ТЛС фолликулярных дендритных клеток. Кроме того, был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии молекул – иммунологических контрольных точек (чекпойнтов) CTLA-4 и PD-1, а также продемонстрирована их экспрессия частью Т-клеток ТЛС.

Впервые был проведен анализ субпопуляционного состава иммунных клеток для случаев Уортино-подобного ПРЦЖ, выбранных на основании детального патогистологического пересмотра случаев из когорты The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>), с использованием молекулярных сигнатур, описанных в работе Thorsson с соавт. [1]. Было выявлено, что, по сравнению с другими вариантами ПРЦЖ, Уортино-подобный вариант характеризуется не только повышением абсолютной плотности различных иммунных клеток, но также выраженным перераспределением их субпопуляционного состава.

Впервые была проведена *in silico* оценка экспрессии цитокинов и хемокинов, ответственных за привлечение и выживание плазматических клеток, по результатам которой в опухолях Уортино-подобного строения была выявлена значительная сверхэкспрессия цитокина BAFF и хемокинов CXCL9, CXCL10 и CCL25 по сравнению с другими вариантами ПРЦЖ.

Анализ клональности опухоль-инфильтрирующих Т- и В-лимфоцитов Уортино-подобного ПРЦЖ был также проведен впервые. Результаты проведенных исследований продемонстрировали поликлональный характер инфильтрации, свидетельствующий о наличии широкого спектра опухолевых антигенов, распознаваемых опухоль-инфильтрирующими лимфоидными клетками.

Теоретическая и практическая значимость работы

Прежде всего, проведенная работа носит фундаментальный характер, поскольку представляет собой первое комплексное исследование Уортино-подобного варианта ПРЦЖ. Характеризация 27 случаев в когорте Медицинского радиологического научного центра (МРНЦ, г. Обнинск, Россия) вносит значительный вклад в мировой опыт изучения Уортино-подобного ПРЦЖ, поскольку на данный момент в литературе описано всего порядка 200 случаев данной опухоли. Стоит отметить возможность практического применения полученных данных. В частности, они указывают на необходимость тщательной дифференциальной диагностики Уортино-подобного и высококлеточного вариантов ПРЦЖ для оценки прогноза течения заболевания.

Методология и методы диссертационного исследования

В работе использован широкий спектр гистологических/гистохимических и молекулярно-генетических методик, включая иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов, выделение ДНК и РНК, анализ мутаций методом ПЦР с последующим секвенированием получившихся фрагментов, анализ клональности лимфоцитов по протоколу BIOMED-2/Euroclonality (мультиплексная ПЦР с дальнейшим анализом распределения длин получившихся ампликонов). Кроме того, были использованы методы *in silico* анализа экспрессии цитокинов по данным проекта TCGA, мРНК и микроРНК профилей, а также сравнения параметров иммунной инфильтрации в группах пациентов с различными гистологическими вариантами ПРЦЖ.

Основные положения, выносимы на защиту

1. Значительная часть случаев Уортино-подобного варианта ПРЦЖ демонстрирует очаги цитоморфологического строения, характерного для клинически агрессивного варианта ПРЦЖ из высоких клеток. В то же время, эти два варианта значительно различаются с точки зрения клинического течения и прогноза для пациента, что может указывать на противоопухолевый эффект иммунного инфильтрата Уортино-подобного ПРЦЖ.

2. Уортино-подобный вариант ПРЦЖ демонстрирует мРНК, микроРНК и генетические профили, сходные с таковыми для клинически агрессивного варианта ПРЦЖ из высоких клеток. Более того, наблюдается ассоциация между присутствием высококлеточного компонента в ткани Уортино-подобного ПРЦЖ и наличием мутации *BRAF V600E*, наибольшая частота которой характерна для ПРЦЖ из высоких клеток.

3. В иммунном инфильтрате Уортино-подобного варианта ПРЦЖ преобладают плазматические клетки. Более того, данный гистологический вариант характеризуется повышенной экспрессией цитокина BAFF и хемокинов CXCL9, CXCL10 и CCL25 - молекул, необходимых для выживания плазматических клеток и их привлечения в опухолевый очаг. Иммунный инфильтрат представлен диффузно распределенными по строме опухоли иммунными клетками, а также третичными лимфоидными структурами (ТЛС), располагающимися преимущественно на инвазивной границе опухолей.

4. Т- и В-лимфоциты в Уортино-подобном варианте ПРЦЖ демонстрируют поликлональный характер инфильтрации, что может свидетельствовать об иммунном ответе на широкий спектр опухоль-ассоциированных антигенов.

Достоверность полученных результатов

Полученные научные результаты представительны и достоверны. Экспериментальная работа проводилась на современном сертифицированном оборудовании с использованием химических реактивов, полученных от известных

и надежных производителей (Sigma, Thermo Scientific, Leica, Dako и др.). Проводили корректную статистическую обработку полученных данных.

Апробация результатов работы

Результаты диссертационной работы были представлены на международных и отечественных конференциях: российско-германский симпозиум «Immunology and cancer» (Нижний Новгород, Россия, 2014), Cancer Immunology and Immunotherapy – 2015 (Ljubljana, Slovenia, 2015), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2018).

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены автором или при его непосредственном участии. Соискатель принимал участие в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций, написании текста диссертации. При выполнении работы автор продемонстрировал способность самостоятельно проводить исследования, анализировать и представлять данные. Данные, полученные другими участниками научной работы (постановка мультиплексной ПЦР для изучения клональности лимфоцитов, выделение ДНК и РНК из замороженной и парафинизированной ткани, анализ мутаций в гене *BRAF*), оговорены в тексте диссертации.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Основные условия роста опухоли

Развитие опухоли – это патологический процесс, сопровождающийся возникновением мутаций в генетическом аппарате клеток, а также нарушением их роста и дифференцировки. В результате опухолевые клетки начинают бесконтрольно размножаться, что приводит к нарушению метаболизма органов и тканей организма.

Для того чтобы неопластические клетки могли образовать опухоль, которая растет и прогрессирует, необходимо выполнение нескольких условий. Одни из них относятся непосредственно к опухолевым клеткам, тогда как другие затрагивают клетки опухолевого микроокружения. Шесть таких условий были сформулированы Дугласом Ханаханом и Робертом Вайнбергом в 2000 году и составили так называемые «hallmarks of cancer» («признаки рака», рисунок 1) [2]. Позднее, в 2011 году они были дополнены еще четырьмя признаками [3].

Первые шесть признаков опухоли относятся к природе самих неопластических клеток, а именно:

- Поддержание пролиферации;
- Уклонение от супрессоров роста;
- Активация инвазии и метастазирования;
- Приобретение репликативного бессмертия;
- Индукция ангиогенеза;
- Устойчивость к клеточной гибели.

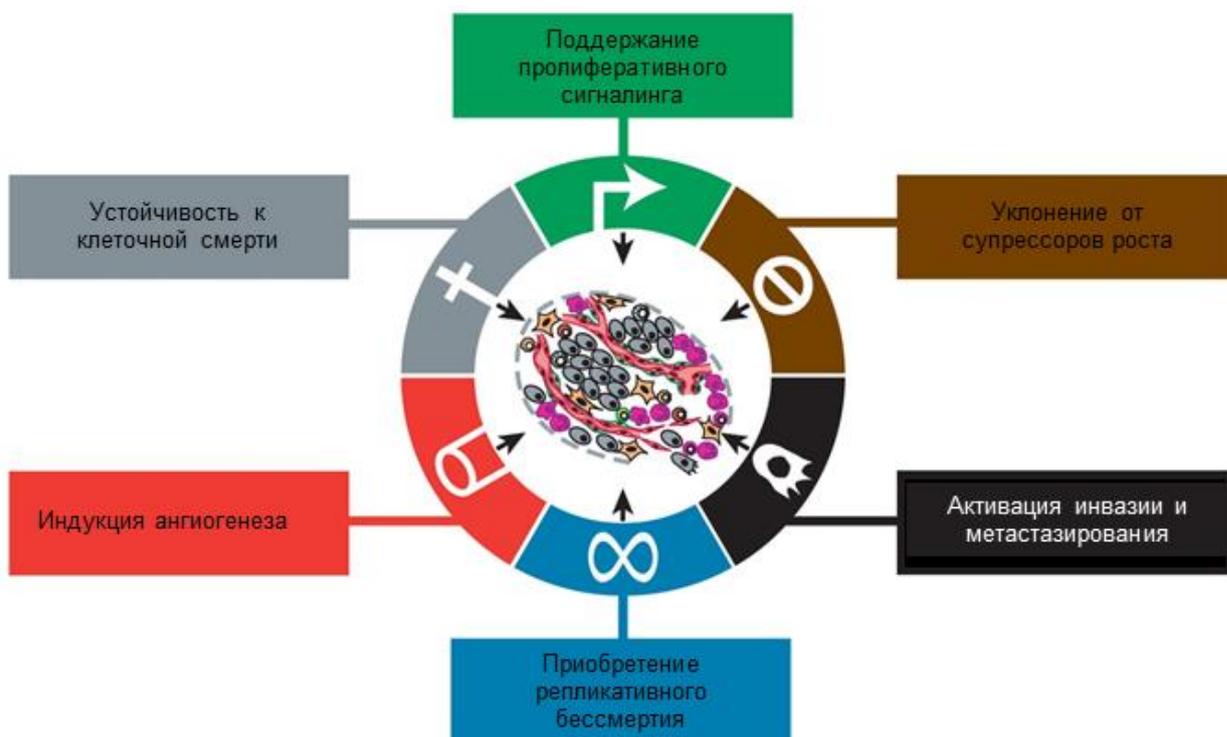


Рисунок 1. Шесть условий опухолевого роста (согласно Hanahan and Weinberg, 2011).

Четыре признака, сформулированные позднее, характеризуют роль как самих опухолевых клеток, так и опухолевого микроокружения в поддержании неопластического роста (рисунок 2). К ним относятся:

- Изменение регуляции энергетического обмена клеток;
- Геномная нестабильность и мутации;
- Ускользание опухоли от разрушения иммунными клетками;
- Воспаление, усиливающее рост опухоли.

Далее мы кратко рассмотрим все десять признаков опухолей, а позже подробно остановимся на роли иммунных клеток в канцерогенезе.

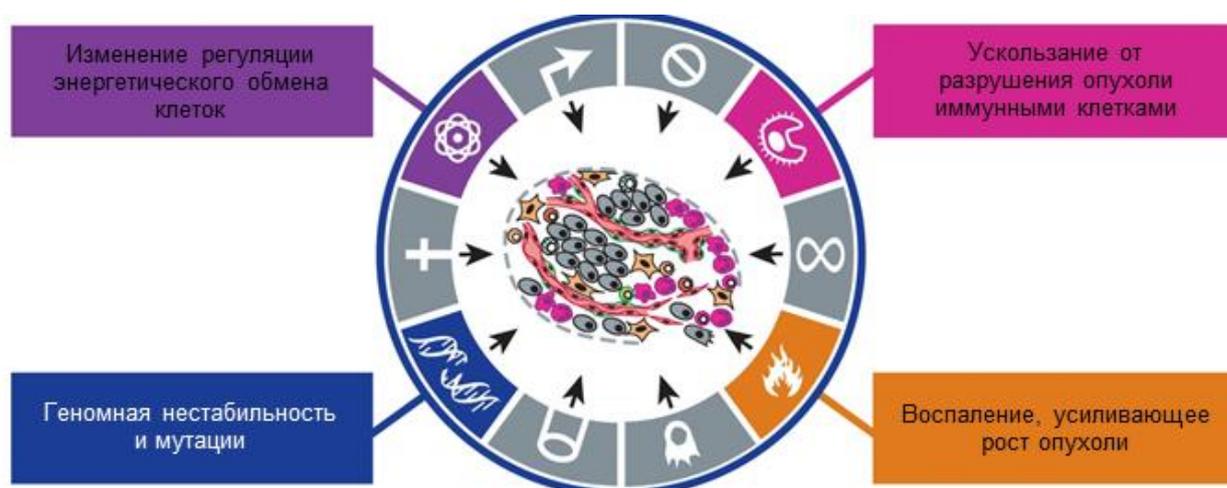


Рисунок 2. Дополнительные условия опухолевого роста (согласно Hanahan and Weinberg, 2011).

Поддержание пролиферации

Основополагающим свойством опухолевой клетки является ее способность к неограниченному делению. Клетки нормальных тканей контролируют продукцию и высвобождение ростовых факторов, поддерживая гомеостаз ткани и ее архитектуру. Опухолевые клетки, в свою очередь, могут обеспечивать продукцию ростовых факторов самостоятельно, а также распространять сигналы, стимулирующие их выработку клетками микроокружения. Кроме того, они способны усиливать экспрессию рецепторов ростовых факторов на своей поверхности, становясь более чувствительными к пролиферативным сигналам [4]–[6]. Мутации в молекулах сигнальных каскадов, отвечающих за пролиферацию, могут стимулировать их постоянную функциональную активность, в не зависящую от присутствия ростового фактора. Высокопроизводительное секвенирование опухолевых клеток выявило наличие значительного количества таких соматических мутаций, например, в генах *BRAF* и *PI3-K*.

В то же время, усиление экспрессии онкогенов, таких как *RAS*, *MYC* и *RAF*, может приводить к запуску процессов старения или апоптоза [7]. Таким образом, опухоли необходимо поддерживать уровень экспрессии данных молекул на среднем уровне, чтобы, с одной стороны, обеспечивать пролиферативный сигнала, с другой стороны, предотвратить запуск программы клеточной смерти. Кроме того,

одним из возможных альтернативных механизмов может являться дисрегуляция сигнальных каскадов, приводящих к клеточной смерти или старению [8].

Уклонение от супрессоров роста

Помимо поддержания конститутивной пролиферации, опухолевые клетки реализуют механизмы, позволяющие им избегать воздействия сигналов, направленных на подавление неограниченного деления [9]. Большинство из этих программ контролируется генами так называемых опухолевых супрессоров. Последние способны подавлять избыточный рост опухолей человека, в большинстве которых обнаружены инактивирующие мутации данных генов. Так, мутации в генах *RB* и *TP53*, встречаются в широком спектре опухолей человека, например, в раке толстой кишки, легкого, молочной железы, печени и т.д.

Дефекты в сигнальных каскадах, ответственных за подавление пролиферативного сигнала, могут также приводить к неограниченному делению клетки. Так, мутации в гене *RAS* могут снижать его ГТФазную активность, которая служит внутренним негативным регулятором передачи сигнала от *RAS* к *PI3-K*. Мутации или метилирование промотора гена *PTEN* приводят к тому, что белок утрачивает функцию негативного регулятора и прекращает деградировать *PIP3*, продукт *PI3-K* [10].

Активация инвазии и метастазирования

Инвазия и метастазирование опухолевых клеток сопровождается перестройкой экспрессионной программы, так называемым эпителиально-мезенхимальным переходом. В ходе данного процесса экспрессия генов, ответственных за образование межклеточных контактов (например, посредством E-кадгерина), должна снижаться, а генов, позволяющих клетке осуществлять миграцию (например, N-кадгерин) - увеличиваться [11]. В ходе эпителиально-мезенхимального перехода активируется множество транскрипционных факторов, функционирующих в процессе эмбриогенеза, таких как *Snail*, *Slug*, *Twist*, *Zeb1/2* и других. Их совместная индукция приводит к тому, что двигательная активность

опухолевых клеток усиливается, они утрачивают межклеточные контакты, изменяют свою морфологию с полигонально-эпителиальной на фибробластоподобную и начинают производить ферменты, деградирующие межклеточный матрикс [12].

Тем не менее, для успешной инвазии и метастазирования опухолевых клеток недостаточно изменения их экспрессионной программы. Важную роль в этом процессе играют и клетки микроокружения опухоли, в частности, мезенхимальные стволовые клетки и иммунные клетки (в первую очередь, макрофаги). Они формируют так называемую преметастатическую нишу, которая позже заселяется опухолевыми клетками [13].

Приобретение репликативного бессмертия

Теломеры, находящиеся на концах хромосом, играют важную роль в поддержании способности клетки к пролиферации. С увеличением количества делений длина теломер уменьшается, что способствует возникновению ошибок в репликации концов хромосом и, соответственно, старению клетки. Теломераза, кодируемая геном *TERT*, является специальной ДНК-полимеразой, обладающей способностью к синтезу теломерной ДНК. Ее экспрессия наблюдается на ранних стадиях онтогенеза в ходе активного деления клеток зародыша, а также в клеточных линиях и опухолях, спонтанно приобретающих способность к неконтролируемому делению. В последнем случае этому могут способствовать мутации в промоторе гена *TERT*, часто обнаруживаемые в неопластической ткани [14].

Исследования последних лет показали, что теломераза может выполнять и другие функции, отличные от поддержания длин теломеров и так же приводящие к выживанию клетки. Так, ее субъединица TERT способна амплифицировать Wnt-опосредованный сигнал, играя роль кофактора в комплексе β -катенин/LEF [15]. Кроме того, TERT вовлечена в процесс репарации повреждений ДНК и функционирования РНК-зависимой РНК-полимеразы [16]. Вклад этих

неканонических функций теломеразы в опухолевую прогрессию требует дальнейшего изучения.

Индукция ангиогенеза

Опухолям, как и нормальным тканям, необходимы питательные вещества и кислород для поддержания метаболизма клеток на необходимом уровне. В процессе образования опухоли активируются сигнальные пути, стимулирующие ангиогенез в неопластической ткани [17]. Интересно, что активация ангиогенеза происходит на ранней стадии развития опухоли, задолго до достижения ею больших размеров. К индукторам ангиогенеза относятся фактор роста сосудистого эндотелия VEGF-A и фактор роста фибробластов (FGF), а к ингибиторам – тромбоспондин-1 (TSP-1). В процессе роста опухоли активируются онкогенные сигнальные каскады (например, Ras- и Мус-опосредованные), а также наблюдается состояние гипоксии, усиливающее экспрессию индукторов ангиогенеза. В свою очередь, TSP-1 связывается с трансмембранными рецепторами, находящимися на поверхности эндотелиальных клеток, теряя способность к подавлению ангиогенеза.

Тем не менее, кровеносные сосуды опухоли, образованные *de novo*, как правило, дефектны и характеризуются наличием незрелых разветвлений капилляров, искривленными увеличенными сосудами, неритмичным током крови, микрокровоизлияниями и подтеканием, а также аномально высокой скоростью пролиферации эндотелия и апоптоза [18].

Устойчивость к клеточной гибели

В последнее время программируемая клеточная гибель (в первую очередь, апоптоз) рассматривается как один из механизмов избегания опухолевого роста [19]. Различные варианты клеточного стресса, включая активацию онкоген-индуцированных сигнальных путей и повреждение ДНК, могут служить сигналом инициации апоптотической программы.

Одну из ключевых ролей в активации апоптоза играет опухолевый супрессор TP53. В ответ на наличие в клетке хромосомных аномалий или повреждений ДНК он усиливает экспрессию белков PUMA и NOXA, важнейших регуляторов запуска апоптоза. Кроме того, недостаточный сигнал от факторов выживания может также стимулировать апоптоз посредством активации про-апоптотического белка BIM. Избыточная экспрессия некоторых онкогенов, таких как cMyc, также может приводить к активации программируемой клеточной гибели. Опухолевые клетки могут препятствовать запуску апоптоза несколькими способами. Во-первых, это может происходить вследствие нарушения функционирования TP53, а, во-вторых, благодаря усилению и снижению экспрессии противо- и проапоптотических белков (BCL-2, BCL-xL и BAX, BIM, PUMA и NOXA, соответственно) [20].

Аутофагия является процессом утилизации клеткой собственных органелл с целью повторного использования их материала в образовании новых структурных компонентов клетки. Аутофагия может стимулировать как выживание, так и гибель опухолевых клеток в зависимости от того, на какой стадии опухолевого роста она активируется [21].

Очаги некроза – варианта клеточной гибели, при котором содержимое клетки выделяется в межклеточное пространство – часто встречаются в центре солидных опухолей. Они могут служить источниками провоспалительных цитокинов, привлекая воспалительные клетки иммунной системы в очаг неоплазии и способствуя прогрессии опухоли. Кроме того, клетки, подвергшиеся некрозу, секретируют IL1 α , который может стимулировать пролиферацию окружающих опухолевых клеток [22].

Изменение регуляции энергетического обмена клеток

Для того чтобы клетки могли постоянно пролиферировать, им необходимо модифицировать свой энергетический обмен. Так, в норме клетки расщепляют глюкозу до пирувата в процессе гликолиза в цитоплазме, а далее в аэробных условиях преобразуют пируват в углекислый газ в митохондриях. В анаэробных же условиях клетки практически всегда ограничиваются гликолизом. Еще в 1930 году

Отто Варбург описал феномен того, что опухолевые клетки даже в аэробных условиях получают энергию в ходе процесса гликолиза; этот вариант энергетического обмена был назван «аэробным гликолизом» или «эффектом Варбурга» [23]. Рост интенсивности гликолиза ассоциирован с активацией онкогенов и дефектами в генах опухолевых супрессоров, а также с увеличением уровня экспрессии транскрипционных факторов HIF1 α и HIF2 α , связанным с состоянием гипоксии [24].

В процессе аэробного гликолиза количество образуемого АТФ практически в 18 раз меньше по сравнению с эффектом аэробного дыхания при участии митохондрий. Опухолевые клетки компенсируют данный эффект активацией транспорта глюкозы в цитоплазму, которая достигается за счёт повышения экспрессии транспортера глюкозы GLUT1 [25]. Причины, по которым опухолевые клетки предпочитают использовать гликолиз, на данный момент остаются не выясненными. Одна из гипотез, предложенная Поттером еще в 50-х годах прошлого века, говорит о том, что промежуточные соединения, образующиеся в результате гликолиза, могут быть использованы опухолевыми клетками для синтеза нуклеозидов и аминокислот, запас которых должен активно пополняться в ходе интенсивного деления клетки. В пользу этой гипотезы свидетельствует то, что эффект Варбурга обнаруживается на стадии активного деления клеток эмбриональных тканей, когда также необходим активный синтез макромолекул.

В последние годы было показано, что популяция опухолевых клеток может быть неоднородна по типу используемого энергетического обмена. Так, в некоторых опухолях показаны две субпопуляции клеток, сосуществующие в симбиотических отношениях. Первая из них осуществляет расщепление глюкозы до лактата в процессе аэробного гликолиза, а вторая захватывает лактат и расщепляет его в цикле трикарбоновых кислот [26].

Геномная нестабильность и мутации

Разнообразные механизмы репарации ДНК осуществляют контроль над уровнем соматических мутаций. Эти механизмы реализуются на следующих

этапах: 1) обнаружение мутаций ДНК и активация механизмов репарации; 2) работа репарационных комплексов; 3) инактивация мутагенных молекул до их контакта с ДНК. Однако в опухолевых клетках наблюдается увеличение количества мутаций вследствие большей восприимчивости к мутагенам, обусловленной нарушениями в системе поддержания генетической стабильности [27]. Кроме того, потеря теломерной ДНК во многих опухолях приводит к росту нестабильности кариотипа клетки и амплификации/делеции хромосомных фрагментов.

Воспаление, усиливающее рост опухоли, а также ускользание опухоли от иммунного надзора

Феномен присутствия значительного количества иммунных клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета в очаге неопластического роста известен в патологической анатомии уже давно. Со временем оказалось, что иммунные клетки могут как поддерживать состояние хронического воспаления, усиливая опухолевый рост, так и способствовать уничтожению опухолевых клеток (этому посвящена вторая глава).

В процессе воспаления в строму опухоли могут выделяться различные биоактивные молекулы, такие как факторы роста и выживания, ангиогенные факторы, ферменты, модифицирующие внеклеточный матрикс, способствующие инвазии и метастазированию опухоли, а также реактивные формы кислорода, увеличивающие скорость мутагенеза опухолевых клеток [28].

Иммунный инфильтрат опухолей человека

Клетки иммунной системы – неотъемлемый компонент микроокружения неопластической ткани. Согласно теории иммунного надзора, предложенной Ф. Бёрнетом в 60-х годах XX века [29] и развитой в теорию иммуноредактирования опухолей Р. Шрайбером [30], иммунциты могут поддерживать состояние хронического воспаления и стимулировать прогрессию опухолей, и в то же время реализовывать различные сценарии противоопухолевой иммунной защиты

(продукция антител, контактный клеточный и комплемент-зависимый цитолиз и др.), ограничивая рост опухоли. Таким образом, для понимания прогностического и диагностического значения иммунного инфильтрата опухоли важна не только его интенсивность, но и субпопуляционный состав образующих его клеток.

В опухолевой ткани могут встречаться практически все типы клеток иммунной системы [31]. В контексте влияния на развитие новообразований наиболее изученными из них являются представители миелоидной линии дифференцировки, такие, как макрофаги, дендритные клетки и миелоидные супрессорные клетки (MDSC), а также лимфоидные клетки - Т-лимфоциты, зрелые и плазматические В-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILCs), к которым относятся и натуральные киллеры (NK-клетки).

Макрофаги составляют значительную часть опухолевой массы солидных новообразований [32]. Их популяцию можно разделить на две субпопуляции, отличающиеся набором поверхностных маркеров, факторов, ответственных за их дифференцировку, и продуцируемых цитокинов. М2-поляризованные клетки (NOS2⁻CD163⁺) [33], дифференцирующиеся *in vitro* из моноцитов в присутствии IL4, IL10 и IL13 [34] и обладающие способностью подавлять иммунные реакции организма, встречаются в опухолевой ткани значительно чаще М1-макрофагов (NOS2⁺CD163⁻) [35]. Считается, что М2-макрофаги способствуют росту и прогрессии опухолей, локально подавляя иммунный ответ в очаге неопластической трансформации. Ингибирование достигается путем продукции высоких доз супрессорного цитокина IL10 (карциномы почки [36]), подавления активности цитотоксических Т лимфоцитов (меланома [37]), привлечения регуляторных Т-лимфоцитов (рак толстой кишки [38]) и др. Согласно данным Zhang с соавт. [39], негативный прогностический эффект наличия макрофагов в опухолевой ткани обнаруживается в случае рака желудка, молочной железы, мочевого пузыря, яичников, гортани и щитовидной железы; аналогичный феномен также наблюдается в случае рака шейки матки [40]. В то же время, увеличение количества М1-поляризованных макрофагов, привлекающих в опухолевый очаг Th1

лимфоциты, благоприятно сказывается на общей выживаемости пациентов с колоректальным раком [39]. Прогностический потенциал наличия опухолеинфильтрирующих макрофагов также зависит от их локализации в опухоли и экспрессии клетками колоректального рака маркера CD47, препятствующего фагоцитозу [41]. Кроме того, соотношение M1- и M2-поляризованных макрофагов в значительной степени зависит от таких характеристик опухоли, как гистогенез, стадия развития и т.д. [42], [43].

Дендритные клетки, «профессиональные» антиген-презентирующие клетки организма, способны захватывать антигены апоптотических и некротических клеток опухоли и презентировать их Т-лимфоцитам, запуская противоопухолевый иммунный ответ [44]. Дендритные клетки часто присутствуют в различных опухолевых тканях, таких как меланома [45], рак толстой кишки [46], щитовидной железы [47] и др. Для реализации противоопухолевых функций дендритных клеток необходимо наличие провоспалительного микроокружения. Так, высокие концентрации цитокинов IFN γ и TNF способствуют созреванию дендритной клетки и ее эффективному функционированию. В свою очередь, незрелая дендритная клетка презентрует антиген Т-лимфоцитам в малых количествах и в отсутствие костимуляции, что приводит к анергии лимфоцитов и развитию иммунной толерантности по отношению к антигенам неопластических клеток [48]. Секреция опухолью IL10, IL6, M-CSF и других молекул вызывает подавление созревания опухолеинфильтрирующих дендритных клеток и приводит к анергии Т-лимфоцитов. Таким образом, наличие незрелых (CD11c⁻) дендритных клеток в иммунном инфильтрате карцином ассоциировано с неблагоприятным прогнозом течения заболевания, что показано для немелкоклеточного рака легкого [49].

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) представляют собой разнородную популяцию клеток врожденного иммунитета, таких как миелоидные предшественники (обогащены в популяции Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺), незрелые мононуклеарные клетки (CD14⁺HLA-DR^{-lo}) и незрелые полиморфноядерные клетки (CD14⁻CD11b⁺CD33⁺CD15⁺ и CD66b⁺) [50]. MDSC могут принимать участие

в ремоделировании опухолевого микроокружения и формировании премеастатической ниши, способствуя росту первичной опухоли и образованию метастазов. Несмотря на то, что большая часть данных по влиянию MDSC на рост и прогрессию опухолей была получена с использованием мышиных моделей, существуют свидетельства о роли данных клеток и в опухолях человека. Так, было показано, что на ранних стадиях роста рака легких MDSC клетки не проявляют иммуносупрессорную активность. Вероятно, это связано с тем, что они накапливаются в опухолевой ткани в ответ на воспалительные стимулы и начинают влиять на прогрессию опухоли позднее [51]. В пользу этого предположения указывают данные об ассоциации накопления MDSC в строме опухоли с негативным прогнозом для пациентов с широким спектром злокачественных новообразований, включая рак легкого [52].

За последнее десятилетие накопилось множество данных, указывающих на корреляцию между наличием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и благоприятным прогнозом для пациентов с широким спектром солидных новообразований [53]. Однако не все субпопуляции лимфоцитов обладают противоопухолевой активностью [54].

Так, одной из значимых субпопуляций опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов являются регуляторные Т-клетки (Treg), экспрессирующие на своей поверхности различные супрессорные молекулы (PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 и др.) и секретирующие ряд супрессорных цитокинов [55], [56]. Treg оказывают подавляющее воздействие на клетки иммунной системы, присутствующие в опухоли, что приводит к ускорению прогрессии последней [57]. В то же время, для некоторых опухолей отмечена корреляция наличия Treg с благоприятным прогнозом для пациентов (карцинома яичника, мочевого пузыря [58], рак головы и шеи [59] и колоректальный рак [60]). Возможно, это связано с тем, что Treg могут не только блокировать противоопухолевую активность эффекторных Т-клеток, но и снижать уровень локального воспаления, приводя к диаметрально противоположным результатам [58]. Соответственно, влияние присутствия

регуляторных Т-лимфоцитов должно быть независимо оценено для каждого типа опухоли.

Значительную часть опухоль-инфильтрирующих Т-клеток составляют цитотоксические Т-лимфоциты. Вслед за антиген-специфической активацией зрелыми дендритными клетками в лимфоузлах, цитотоксические Т-лимфоциты могут мигрировать в неопластическую ткань под воздействием хемокинов, вырабатываемых опухолевыми и стромальными клетками [61]. Проникнув в опухоль, Т-лимфоциты способны уничтожать ее клетки путем перфорин/гранзим-зависимого контактного цитолиза.

CD4⁺ Т-лимфоциты в опухолевой ткани могут быть представлены Т-хелперами и регуляторными Т-клетками (Treg), характеризующимися экспрессией транскрипционного фактора FoxP3. Как правило, CD4⁺ Т-лимфоциты не могут распознать опухолевые клетки, поскольку последние не экспрессируют на своей поверхности молекулы МНСII. Однако некоторые опухоли (например, меланома) могут экспрессировать эту молекулу как конститутивно, так и в условиях индукции IFN- γ и, соответственно, презентировать свои антигены Т-хелперам [62]. CD4⁺ Т-хелперы также могут помогать CD8⁺ Т-киллерам в реализации их функции. Одной из субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов являются фолликулярные Т-хелперы (Tfh), которые важны для соматического гипермутагенеза В-клеточных рецепторов и индукции синтеза В-лимфоцитами антител против опухоль-ассоциированных антигенов [63]. Tfh присутствуют в составе вторичных лимфоидных органов (лимфоузлов) и третичных лимфоидных структур.

CD45RO⁺ Т-клетки памяти (как CD4⁺, так и CD8⁺) также могут встречаться среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. Было показано, что наличие CD45RO⁺ Т-лимфоцитов положительно коррелирует с благоприятным прогнозом для пациентов с различными злокачественными новообразованиями [62].

В строме опухоли также могут присутствовать В-клетки и терминально дифференцированные плазматические клетки. Для многих типов рака продемонстрирована положительная корреляция между интенсивностью В-

лимфоцитарного инфильтрата и выживаемостью пациентов. Однако в различных типах злокачественных новообразований В-клетки могут оказывать как стимулирующий, так и подавляющий эффект на развитие опухоли [64]. Так, в экспериментах с использованием мышинных моделей показано, что В-лимфоциты могут принимать участие в поддержании хронического воспаления [65], непосредственно ингибировать цитотоксическую активность Т-клеток [66] и привлекать в очаг опухолевого роста Treg, вырабатывая TGF β и IL10 [67], [68]. В то же время, наличие клональной амплификации, соматического гипермутагенеза и переключения изотипов опухоль-инфильтрирующих В-лимфоцитов у пациентов с метастатической меланомой может указывать на их вовлеченность в антиген-зависимый противоопухолевый иммунный ответ [69]. Кроме того, В-клетки способны презентировать антиген для активации наивных Т-лимфоцитов и формирования пула Т-клеток памяти [70], а также реактивировать Т-клетки, ранее праймированные дендритными клетками [71] (данные получены в экспериментах на мышах).

В строме опухоли лимфоциты могут располагаться диффузно или же образовывать третичные лимфоидные структуры – клеточные агрегаты, сходные по своему строению с фолликулами вторичных лимфоидных органов и располагающиеся, как правило, по периферии очага опухолевого роста. Третичные лимфоидные структуры имеют Т- и В-клеточную зоны. Первая образована Т-лимфоцитами и зрелыми дендритными клетками, осуществляющими эффективную презентацию антигенов, а вторая состоит из наивных CD20⁺ В-лимфоцитов [72]. В составе третичных лимфоидных структур в небольшом количестве могут встречаться макрофаги и плазматические клетки [73]. Третичные лимфоидные структуры демонстрируют высокую степень васкуляризации, необходимой для эффективного иммунного ответа [64], [74]. Функционирование третичных лимфоидных структур может являться одним из механизмов реализации иммунного надзора над опухолью [75].

Лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILCs) представляют собой гетерогенную группу, которая может как способствовать опухолевому росту, так и подавлять его (согласно данным экспериментов с использованием мышиных моделей канцерогенеза). Как правило, выделяют три подтипа ILCs: ILC1 (включает классические NK-клетки), ILC2 и ILC3, каждый из которых может быть охарактеризован индивидуальным спектром поверхностных маркеров и экспрессируемых цитокинов. На данный момент детальное исследование подтипов ILCs, инфильтрирующих опухоли человека (за исключением NK-клеток), не проводилось.

Присутствие NK-клеток в строме опухоли и степень ее инфильтрации данными клетками может влиять на выживаемость пациентов с солидными опухолями, что было показано в случае колоректального рака [76], плоскоклеточного рака легкого [77] и других новообразований. Однако реальная противоопухолевая активность NK-клеток не всегда пропорциональна их количеству, поскольку она существенно зависит и от цитокинового фона в строме опухоли.

Биоинформатические методы обработки данных высокопроизводительного секвенирования позволяют оценить количество различных субпопуляций опухолю-инфильтрирующих иммуноцитов. Так, существует онлайн-ресурс <http://tcia.at/>, позволяющий исследовать субпопуляционный состав иммунного инфильтрата проб, включенных в базу данных TCGA – The Cancer Genome Atlas (<https://cancergenome.nih.gov/>). Другой веб-инструмент, <http://xcell.ucsf.edu/>, содержащий результаты анализа проб TCGA, также дает возможность загрузить результаты высокопроизводительного секвенирования из любого источника.

В 2018 году была опубликована статья [1], авторы которой разделили опухоли, входящие в TCGA, на 6 кластеров (рисунок 3). Данные группы были выделены на основе экспрессионных профилей опухолю-инфильтрирующих иммунных клеток, относящихся к различным субпопуляциям.

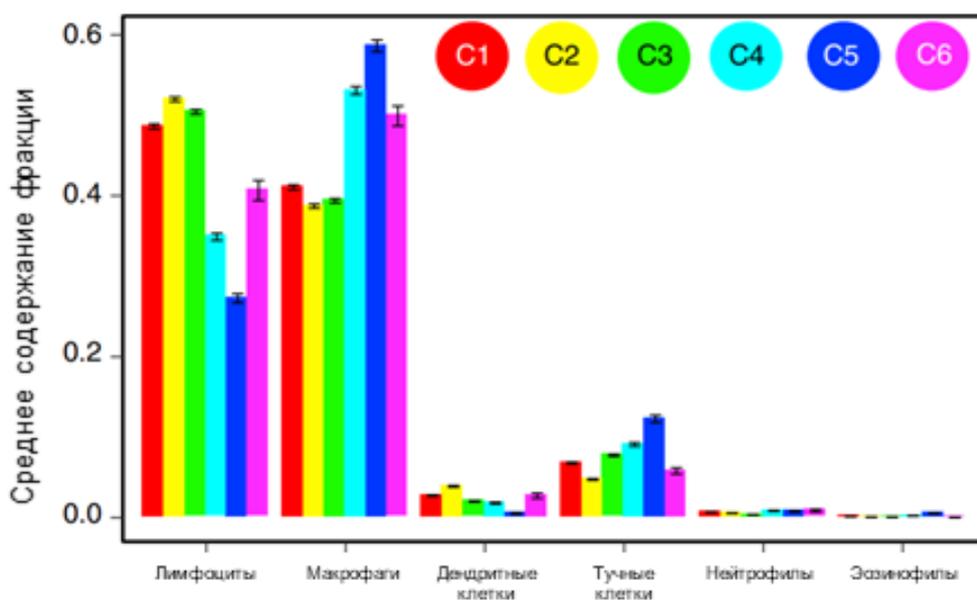


Рисунок 3. Соотношение различных популяций иммунных клеток в шести иммунных кластерах опухолей согласно [1].

Кластер C1 характеризуется повышенной экспрессией генов, вовлеченных в ангиогенез, повышенным уровнем пролиферации клеток и сдвигом лимфоцитарного инфильтрата в сторону Th2 клеток. К нему относится большинство проб колоректального рака, рака толстой кишки, плоскоклеточного рака легкого и др. Кластер C2 (IFN γ -доминантный) характеризуется наибольшим значением отношения M1/M2 макрофагов, сильной CD8-опосредованной передачей сигнала, а также наибольшим разнообразием TCR. В этот кластер входят пробы рака молочной железы, яичников, желудка, шейки матки, а также большая часть проб рака головы и шеи. Так называемый «воспалительный» C3 кластер отличается повышенной экспрессией Th17 и Th1-ассоциированных генов и низким уровнем пролиферации опухолевых клеток. Данный кластер обогащен пробами рака почки, простаты, поджелудочной и щитовидной желез. C4 кластер характеризуется снижением лимфоцитарных генов и повышением генов, ассоциированных с M2-макрофагальным иммунным ответом. В него входят пробы аденокарциномы, феохромоцитомы, параганглиома и другие опухоли. Кластер C5 также отличается большим количеством опухоль-инфильтрирующих M2-макрофагов. В основном, к нему относятся глиомы. Кластер C6,

объединяющий пробы различных типов опухолей без преобладания одного из них, характеризуется повышением экспрессии TGF- β ассоциированных генов и усиленной инфильтрацией опухолей как Th1, так и Th2 лимфоцитами.

В каждом из типов опухолей присутствуют пробы, относящиеся к различным иммунным кластерам (рисунок 4), однако, как правило, можно выделить кластер, который встречается преимущественно в том или ином типе опухолей. Так, для ПРЦЖ (ТНСА) таким кластером является «воспалительный» кластер С3.

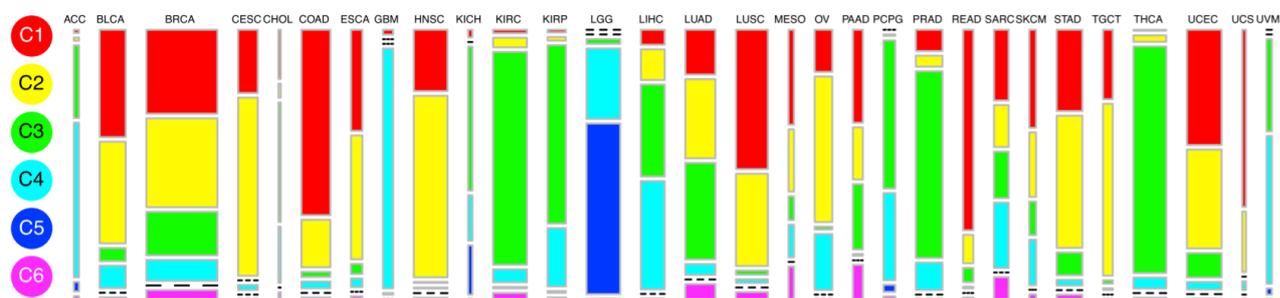


Рисунок 4. Соотношение С1-С6 иммунных кластеров в проанализированных пробах различных типов опухолей (согласно Thorsson et al., 2018).

На данный момент не был проведен биоинформатический анализ иммунного инфильтрата, учитывающий не только локализацию, но и гистологический вариант опухоли. Практически для каждой из проб, входящих в базу данных TCGA, существует окрашенный гематоксилином-эозином гистологический срез, поэтому отнесение той или иной пробы к нужному варианту не является проблемой. Это особенно важно, в частности, для анализа папиллярного рака щитовидной железы, иммунный инфильтрат которого имеет неоднородную интенсивность.

Краткий обзор основных подходов иммунотерапии опухолей

Поскольку иммунные клетки являются важнейшей составляющей опухолевого микроокружения и могут обладать как активирующим, так и ингибирующим действием на опухоль, одним из возможных подходов к терапии злокачественных новообразований является иммунотерапия, то есть направленное вовлечение иммунных клеток в противоопухолевый ответ.

Иммунотерапию в первом приближении можно разделить на четыре типа: клеточная, антительная, пептидная и цитокиновая [78]. В первом случае в качестве иммунотерапевтического агента используются клетки иммунной системы человека, в то время как во втором для модуляции активности иммунной системы, а также для адресной доставки различных терапевтических агентов используются моноклональные антитела. В третьем случае пациенту вводится набор пептидов опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) для выработки специфического эффекторного Т-клеточного ответа. В четвертом случае терапевтическим препаратом являются рекомбинантные цитокины, осуществляющие модуляцию противоопухолевого иммунного ответа пациента.

Рассматривая клеточную иммунотерапию, можно выделить несколько методологических подходов: терапию дендритными клетками, НК и НКТ клетками и цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Дендритные клетки могут быть использованы для активации опухолеспецифических эффекторных Т-лимфоцитов, которые не только уменьшают объем опухоли посредством перфорин-гранзим опосредованного цитолиза ($CD8^+$ Т-клетки), но и формируют иммунологическую память для контроля прогрессии опухоли. В данном случае дендритные клетки могут быть активированы опухолеспецифическим пептидом как *in vivo* (вакцинация мультипептидным коктейлем либо использование антител с конъюгированным пептидом для его направленной доставки), так и *ex vivo* [79]. Этот подход предполагает следующие стадии: выделение мононуклеаров крови пациента; их культивирование с применением подходящей комбинации цитокинов и дифференцировка в дендритные клетки; нагрузка опухоль-специфичным антигеном и инъекция зрелых нагруженных нужным пептидом дендритных клеток пациенту.

НК клетки, являющиеся компонентом системы врожденного иммунитета, способны убивать клетки опухоли без предварительной активации (отсюда и их название – natural killer cells, клетки – натуральные киллеры) [80]. Они распознают

и лизируют клетки-мишени либо по принципу «отсутствия своего», когда на поверхности последних отсутствуют нормальные молекулы МНС класса I (наблюдаемое в опухолевых клетках явление, способствующее ускользанию от контроля CD8⁺ Т-клетками), либо в результате распознавания стресс-индуцированных белков-лигандов активирующими рецепторами, наиболее изученным из которых является NKG2D (к лигандам NKG2D относятся МНС-подобные молекулы МІСА и МІСВ у человека и RAE1 у мыши) [81]. В реальных условиях, судьба клетки-мишени, по-видимому, определяется балансом ингибирующих и активирующих сигналов, полученных НК-клеткой. В 80-х годах прошлого века были проведены эксперименты по изучению противоопухолевой активности НК клеток *in vitro*, а дальнейшие *in vivo* модели на мышах позволили рассматривать данный тип клеток в контексте иммунотерапии рака. Также было показано, что инфильтрация НК-клетками опухолевой ткани мелкоклеточного рака легкого [82], светлоклеточной карциномы почки [83] и рака толстой кишки [84] ассоциирована с благоприятным течением заболевания.

Можно выделить два иммунотерапевтических подхода на основе НК клеток [85]. Первый из них основан на аллогенной трансплантации гематопоэтических стволовых клеток, из которых в организме донора образуются в том числе НК-клетки. Донор подбирается таким образом, чтобы репертуар его KIR-рецепторов, распознающих молекулы главного комплекса гистосовместимости, максимально отличался от репертуара реципиента. В таком случае, НК-клетки донора не смогут распознать МНС I класса ни здоровых, ни опухолевых клеток, но благодаря стрессорным молекулам на поверхности последних будут активироваться и убивать клетки-мишени. Подобную схему можно модифицировать путем культивирования НК клеток донора *in vitro* и их последующего введения в организм пациента. Данный способ исключает попадание цитотоксических лимфоцитов донора в кровотоки реципиента. К сожалению, этот подход является действенным лишь у небольшого количества пациентов с острым лейкозом и миелодиспластическим синдромом. Кроме того, удалось разработать моноклональные антитела против ингибиторных KIR-рецепторов на поверхности

НК клетки [86]–[88]. Таким образом, появилась возможность увеличить противоопухолевую активность НК клеток пациента, не провоцируя аутоиммунные реакции.

Еще одними участниками противоопухолевого иммунного ответа являются НКТ клетки – уникальный класс клеток иммунной системы, которым присущи фенотипические особенности как Т-, так и НК клеток. Однако в большинстве случаев противоопухолевый эффект НКТ клеток обусловлен «downstream» - эффекторами, (НК клетки и $IFN\gamma$), а не цитотоксическим контактом с клеткой-мишенью. Повышенное количество НКТ клеток в инфильтрате опухоли при меланоме, карциномах легких, толстой кишки[89], молочной железы и головы и шеи [90] коррелирует с благоприятным прогнозом лечения. Следовательно, возможна следующая схема клеточной иммунотерапии с использованием НКТ клеток: НКТ клетки вместе с CD1d лиганд-позитивными дендритными клетками изолируются из организма пациента, культивируются совместно для усиления противоопухолевой активности *in vivo* и вводятся обратно пациенту [85].

Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) – основные участники противоопухолевого иммунного ответа. Данные клетки могут узнавать ОАА в контексте главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНСI) на поверхности антиген-презентирующих клеток и осуществлять лизис клетки-мишени по перфорин/гранзим-зависимому механизму [91]. Часто в опухолевом сайте можно обнаружить Т-лимфоциты, которые способны убивать клетки, несущие тот или иной ОАА, осуществляя противоопухолевый ответ [92]. Стоит отметить, что такого ответа, как правило, недостаточно для уничтожения опухоли или ограничения ее распространения вследствие механизмов его супрессии, реализуемых опухолевой тканью [93].

На данный момент основной проблемой в разработке методов иммунотерапии рака является увеличение эффективности киллинга неопластических клеток, опосредованного Т-клетками. Данная проблема может быть отчасти решена несколькими способами: 1) *in vitro* селекцией и активацией

опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов; 2) введением в ЦТЛ Т-клеточного рецептора, полученного генно-инженерными методами и специфичного к ОАА; 3) разработкой химерного антиген-распознающего рецептора и введением его в опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты; 4) использованием трансгенных по МНСI мышей для получения и идентификации TCR, специфичных к опухолевым антигенам человека [94], [95].

Терапия антителами является одним из перспективных направлений в иммунотерапии злокачественных новообразований. Терапевтические антитела можно использовать как для блокировки/активации поверхностных молекул клетки (опухолевой, иммунной клетка либо клетки микроокружения опухоли), так и для направленной доставки токсических агентов в опухолевый сайт [96]. Биспецифические антитела могут также использоваться для увеличения вероятности контакта клетки иммунной системы с клеткой-мишенью [97]. Таким образом, основная задача при разработке биспецифических антител заключается в поиске ОАА, а также комбинаций рецепторов и корецепторов на поверхности иммунных клеток, антитела к которым смогут модулировать силу активирующего сигнала и, следовательно, усиливать противоопухолевый иммунный ответ.

Однако существуют и значительные ограничения для применения моноклональных антител в противоопухолевой терапии: 1) антигенная и рецепторная нестабильность опухоли; 2) недостаточная аффинность антител; 3) наличие компенсаторных сигнальных путей, приводящих к отсутствию эффекта; 4) иммунологическая супрессия; 5) комплемент-зависимое ингибирование эффекта антител и др. [98]. Тем не менее, среди моноклональных антител, одобренных FDA для клинического применения, имеются антитела против дифференцировочных антигенов различных клеток гемопоэтического ряда (CD20, CD30, CD33 и др.), молекул иммунологических «контрольных точек» - чекпойнтов (CTLA-4, PD-1, PD-L1) гликопротеинов, экспрессирующихся в солидных опухолях (EPCAM, CEACAM и др.), гликолипидов (GD2, GD3 и др.), факторов ангиогенеза (VEGF, VEGFR,

различных интегринов и др.), сигналов роста и дифференцировки (EGFR, MET, ERBB и др.), а также антигенов стромы и внеклеточного матрикса (FAP и др.) [99].

Профилактическая вакцинация против различных инфекционных агентов является одним из наиболее значимых достижений медицины XX века, позволившим человечеству справиться со множеством смертельных болезней. Принцип введения чужеродного вещества, являющегося частью инфекционного агента, с целью выработки эффективного иммунного ответа против последнего, может быть применен и к лечению неопластических заболеваний (чужеродным агентом в данном контексте будут выступать трансформированные клетки опухоли)

Для иммунизации могут быть использованы ОАА, которые вызывают антиген-специфический противоопухолевый иммунный ответ. В контексте вакцины, ОАА могут использоваться в нескольких формах [100], [101]:

- рекомбинантные ОАА в виде коротких синтетических пептидов, которые могут связываться непосредственно с молекулами главного комплекса гистосовместимости на антиген-презентирующих клетках *ex vivo*, и длинных пептидов, которые могут процессироваться антиген-презентирующими клетками;
- кодирующие ОАА векторы в форме РНК или ДНК, а также вирусных конструкторов;
- лизат опухолевых клеток;
- фьюжн-белки, обеспечивающие селективный захват ОАА дендритными клетками.

К сожалению, существуют серьезные ограничения в разработке пептидных вакцин на основе ОАА, к которым относятся, в первую очередь, низкая антигенность трансформированных клеток, а также способность опухоли создавать иммуносупрессорное окружение как на локальном, так и на системном уровнях.

Иммунотерапия препаратами цитокинов подразумевает использование рекомбинантных белков интерферона альфа (IFN α) [102] и IL2 [103]. Первый является одним из ключевых цитокинов, активирующих врожденную ветвь иммунного ответа (например, дендритные клетки и макрофаги), тогда как второй играет значительную роль в стимуляции клеток адаптивного иммунитета (Т- и В-лимфоцитов). Введение этих препаратов нацелено на создание оптимальных условий для реализации противоопухолевой функции иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Тем не менее, ввиду широкого спектра действия, применение этих препаратов чревато серьезными побочными эффектами, поэтому их используют при лечении ограниченного количества опухолей и, как правило, в комбинации с другими типами иммунотерапии.

Морфологические особенности папиллярного рака щитовидной железы

Опухоли щитовидной железы составляют около 3% от общего количества онкологических заболеваний. Чаще всего диагностируются опухоли щитовидной железы папиллярного строения, т.н. папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ). Он составляет от 60 до 90% от общего количества опухолей данного органа, однако после недавнего введения диагностической категории «неинвазивная фолликулярная опухоль щитовидной железы с ядрами папиллярного типа» (NIFTP – non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear feature), эта оценка, по-видимому, будет скорректирована в меньшую сторону.

Медиана возраста пациентов с ПРЩЖ составляет 50 лет; около 91% пациентов имеют возраст от 20 до 74 лет. Женщины болеют в три раза чаще мужчин, однако различия между полами снижаются с увеличением возраста. Прогноз для пациентов с ПРЩЖ очень благоприятный по сравнению с новообразованиями других органов: общая пятилетняя выживаемость составляет 96%, 10-летняя – 93%, а 20-летняя – более 90%. Исследования больших когорт пациентов показали, что общий уровень летальности составляет 1-6.5%. Прогноз зависит от стадии заболевания: для I стадии 10-летний уровень выживаемости

составляет 99.8%, тогда как для IV стадии - около 41%. Независимыми факторами риска при ПРЦЖ являются: возраст пациента на момент постановки диагноза (>40-45 лет), размер опухоли (>3-4 см), стадия опухоли, наличие экстрапиреоидного распространения и отдаленного метастазирования [104].

Около 20% случаев ПРЦЖ демонстрируют наличие нескольких фокусов опухолевого роста. Для ПРЦЖ также характерно прорастание лимфатических сосудов и распространение опухоли; соответственно, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах – достаточно частое явление. Прорастание кровеносных сосудов наблюдается намного реже и сопровождается преимущественным поражением легочных сосудов.

Макроскопически, ПРЦЖ обычно представлен инвазивным новообразованием с нечетко очерченными краями, плотной структурой и белой гранулированной поверхностью разреза. Средний диаметр такого узла составляет 2-3 см, однако опухоли диаметром менее 1.5 см составляют от 13.7 до 64% диагностированных случаев [104].

Микроскопически, ПРЦЖ представляет собой фолликулярно-клеточную опухоль, для которой характерно наличие папиллярных (сосочковых) структур. Тем не менее, некоторые подтипы ПРЦЖ, например, фолликулярный вариант ПРЦЖ, не формируют типичные сосочковые структуры, и диагноз ставится на основании наличия ядерных изменений опухолевых клеток. Ядра ПРЦЖ светлые, по типу «часовых стекол». Характерные ядерные изменения включают в себя близкое расположение ядер, их наслаивание друг на друга, увеличение и удлинение, приобретение овальной формы, неровные контуры, наличие ядерных борозд и псевдовключений – внутриядерных инвагинаций цитоплазмы, а также бледную окраску нуклеоплазмы за счет периферической компактизации хроматина вдоль ядерной мембраны.

ПРЦЖ можно разделить на несколько вариантов. Мы подробнее остановимся на ПРЦЖ из высоких, столбчатых клеток и клеток типа «сапожных гвоздей», а также Уортино-подобном ПРЦЖ. Молекулярные сигнатуры,

определяющие цитологические особенности данных вариантов ПРЦЖ, на данный момент не определены. В то же время, их мутационный, мРНК и микроРНК (для ПРЦЖ из высоких клеток) профиль значительно отличается от такового у классического ПРЦЖ, о чем будет рассказано позже.

ПРЦЖ из высоких клеток (tall cell variant)

ПРЦЖ из высоких клеток диагностируют в 3-19% случаев ПРЦЖ [105]. Его клетки демонстрируют обильную эозинофильную цитоплазму и четкие очертания, их длина в 2-3 раза превышает ширину. Для клеток этого варианта характерна особенно яркая выраженность типичных ядерных изменений ПРЦЖ, таких как борозды и псевдовключения. Наличие множественных включений в одном ядре иногда создает картину «мыльных пузырей» (рисунок 5). Параллельное расположение клеток, выстилающих сосочковые и удлиненные фолликулярные структуры, определяет так называемую картину «трамвайных путей» («tram-track» sign), что при малом увеличении может напоминать трабекулярную архитектуру [106] (рисунок 6).

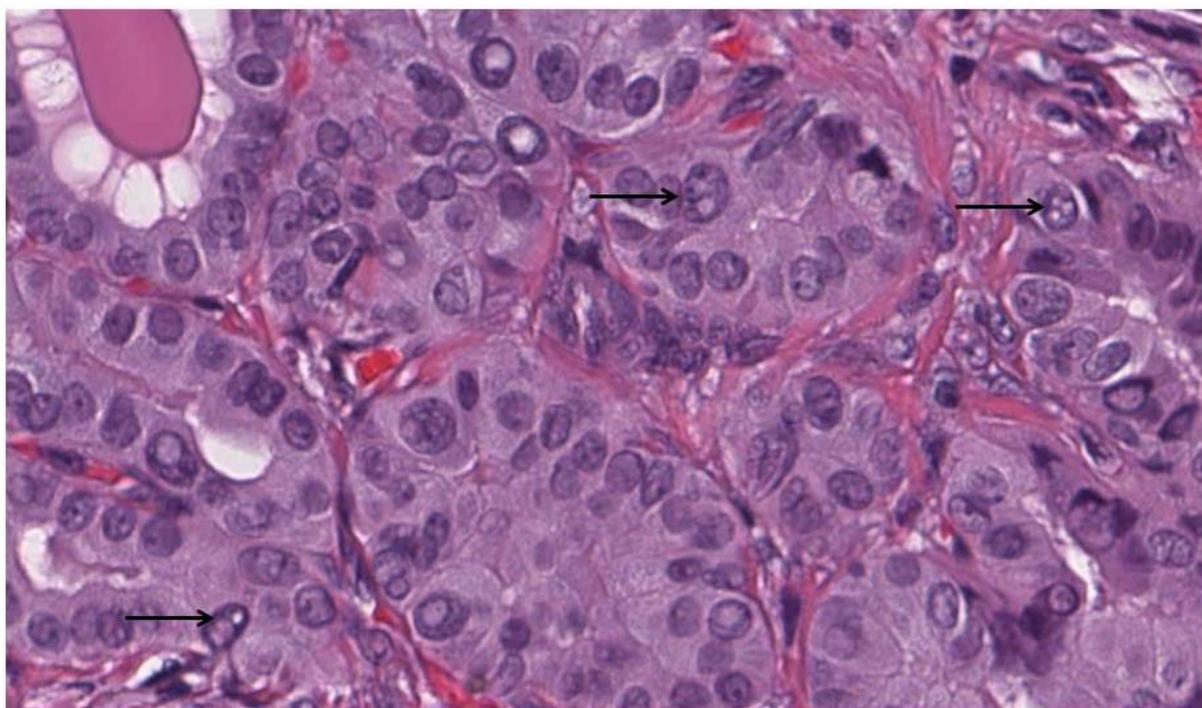


Рисунок 5. Цитологические особенности ПРЦЖ из высоких клеток (случай TCGA-DJ-A130).

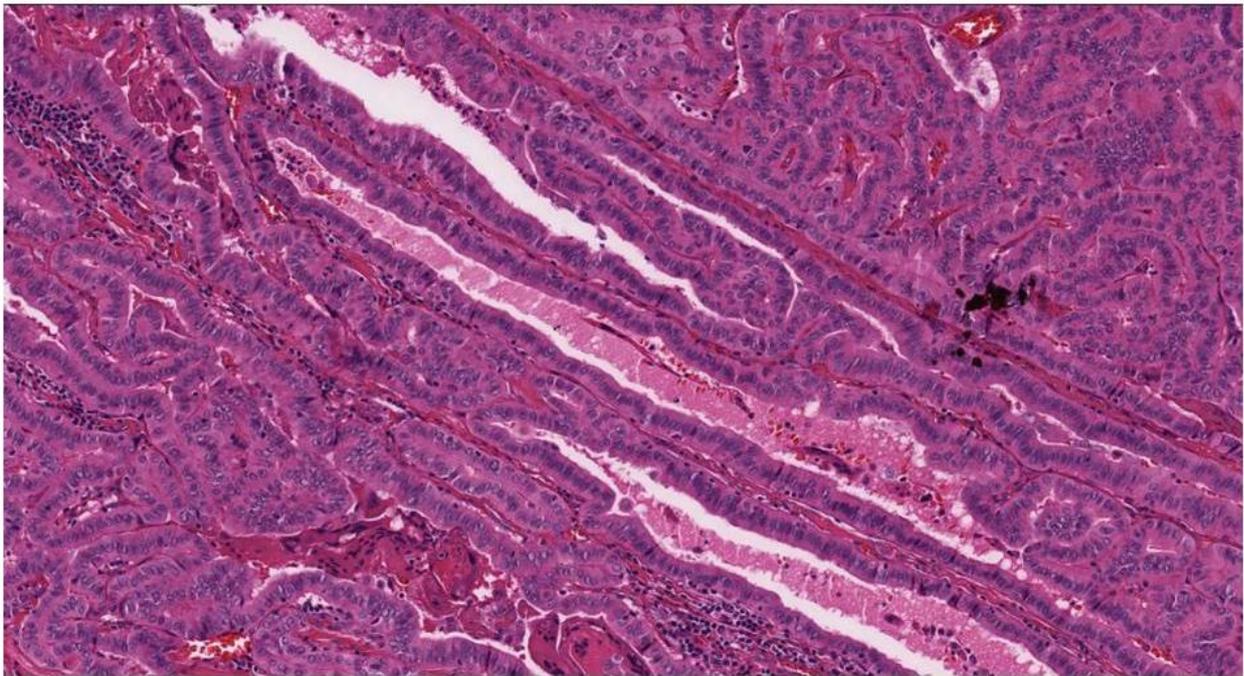


Рисунок 6. Гистологическая картина варианта ПРЦЖ из высоких клеток (случай TCGA-ET-A3DW).

ПРЦЖ из высоких клеток встречается у женщин чаще, чем у мужчин, однако отношение полов несколько ниже, чем при классическом ПРЦЖ (Ж:М=2.9 против 4.1, соответственно [107]). Средний возраст пациентов с ПРЦЖ из высоких клеток выше, чем у пациентов с классическим ПРЦЖ (50.1 против 45.7, соответственно). Согласно анализу литературы, приведенному в работе Wang с соавт. [107], средние показатели частот мультифокального поражения, экстра tireоидного распространения, поражения регионарных лимфоузлов и наличия отдаленных метастазов при ПРЦЖ из высоких клеток выше, чем при классическом ПРЦЖ (45.7%, 63.9%, 59.3% и 8.6% против 32.7%, 33.5%, 33.7% и 3.0%, соответственно). Данные Ghossein с соавт. [108] свидетельствуют о том, что ПРЦЖ из высоких клеток обладает менее благоприятным прогнозом, чем классический ПРЦЖ, вне зависимости от наличия экстра tireоидного распространения. Также вариант ПРЦЖ из высоких клеток составляет значительную часть (до 20%) опухолей щитовидной железы, не поддающихся радиойодтерапии [108].

Фокальный компонент из высоких клеток встречается значительно чаще, чем одноименный вариант, и одним из важных вопросов является количество высоких

клеток, достаточное для отнесения опухоли к гистологическому варианту ПРЦЖ из высоких клеток. В разных работах встречается широкий разброс цифр: от 10 до 75%. Согласно классификации ВОЗ 2017 года [104], пороговое значение составляет 30%. Эта же цифра приведена в работе Hawk и Hazard 1976 года, в которой данный гистологический вариант был впервые описан [109].

В исследовании Ganly с соавт. [110] 453 пациента были разделены на три группы по степени выраженности высококлеточного компонента (<30%, 30-49%, \geq 50% опухоли). Было показано, что оптимальным для выделения отдельного гистологического варианта является порог в 30%, поскольку группы пациентов, процент высоких клеток в опухолях которых был больше 30% (30-49% и \geq 50%), не различались по показателям выживаемости. Кроме того, у 4 из 6 пациентов группы с >30% высоких клеток, умерших от рецидива заболевания, опухоли демонстрировали гистологические признаки снижения дифференцировки вплоть до анапластической трансформации.

В работе Dettmer с соавт. [111] был проведен сравнительный анализ значимости порогов в 10 и 50% высоких клеток на выборке из 125 случаев. Результаты исследования показали, что порог в 10% высоких клеток лучше подходит для выявления наиболее агрессивных опухолей, нежели 50%, поскольку позволяет более строго выделять пациентов с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов и имеющих более низкую общую выживаемость.

Исследование Oh с соавт. [112] также указывает на важность порога в 10% высоких клеток. Согласно его результатам, опухоли, процент высоких клеток в которых составляет 10-30%, более агрессивны, чем карциномы классического ПРЦЖ. В работе проведено сравнение пациентов с вариантом ПРЦЖ из высоких клеток (больше 30% высоких клеток) и пациентов с классическим ПРЦЖ, содержащим фокальный высококлеточный компонент (10-30%). Исследователям не удалось показать статистически значимых различий между этими группами по различным параметрам, отражающим агрессивность опухоли. Однако группы классического ПРЦЖ с высококлеточным компонентом (10-30%) и без него

существенно различались по этим параметрам между собой. Из вышеперечисленного следует, что даже фокальный компонент высоких клеток существенно влияет на агрессивность ПРЦЖ.

ПРЦЖ из столбчатых клеток

Цитологической особенностью ПРЦЖ из столбчатых клеток является удлиненная форма клеток, однако, в отличие от ПРЦЖ из высоких клеток, им не свойственна эозинофилия цитоплазмы. Для опухолевых клеток характерно наличие крупных суб- и супрануклеарных вакуолей, а ядра данного типа клеток не демонстрируют характерных для ПРЦЖ изменений (наличия борозд и псевдовключений) (рисунок 7). Клетки ПРЦЖ из столбчатых клеток часто экспрессируют транскрипционный фактор CDX2, один из важных регуляторов развития кишечного тракта на ранних стадиях эмбриогенеза, что отчасти может объяснить необычную морфологию опухолевых клеток [113]–[115]. Кроме того, столбчатые клетки нередко формируют псевдостратификацию эпителия. В классификации ВОЗ не приведены данные относительно процента столбчатых клеток, достаточного для отнесения опухоли к отдельному гистологическому варианту.

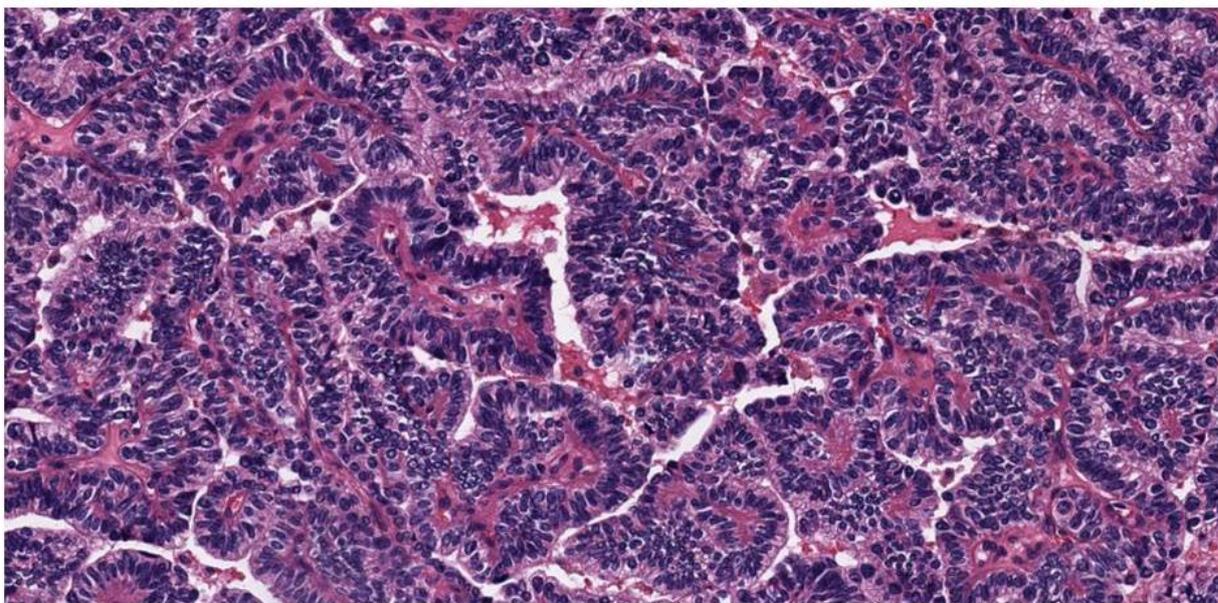


Рисунок 7. Гистологическая картина варианта ПРЦЖ из столбчатых клеток (случай TCGA-FY-A40M).

ПРЦЖ из столбчатых клеток чаще встречается у пациентов старшего возраста (средний возраст составляет 53 года, согласно исследованию Enriques с соавт. [113]), данные же по гендерному распределению противоречивы (в упомянутой работе соотношение М:Ж 10:1, тогда как в работе Chen с соавт. – 4:5 [116]). ПРЦЖ из столбчатых клеток свойственно агрессивное течение: в работе Chen с соавт. [116] у пяти из девяти пациентов наблюдались такие клинические проявления, как экстратиреоидное распространение, ларинготрахеальная инвазия, наличие отдаленных метастазов. Трое из пяти пациентов погибли от опухолевой прогрессии спустя 17-45 месяцев после изначальной постановки диагноза.

ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» (horn nail variant)

Вариант ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» достаточно редок и встречается в 1-2% случаев ПРЦЖ [117]. Средний возраст пациентов с этим вариантом ПРЦЖ составляет 54,1 год, что больше, чем средний возраст пациентов с классическим ПРЦЖ; соотношение же женщин и мужчин ниже, чем у классического ПРЦЖ (3,0 против 4,1) [118]. ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» представлен папиллярными структурами, выстланными клетками с крупной эозинофильной цитоплазмой и апикальным смещением ядер. Такие клетки практически не имеют межклеточных контактов и располагаются на поверхности папиллярных структур, напоминая шляпку гвоздя на ножке (рисунок 8).

Согласно классификации ВОЗ 2017 года, при достижении 30% клеток вышеописанной цитоморфологии, опухоль может быть выделена в отдельный вариант ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» [104]. Некрозы, большое количество митозов, инвазивный рост за пределы органа и в кровеносные сосуды являются характерными чертами ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей». Так, у 7/12 (58.3) пациентов с этим вариантом ПРЦЖ, описанных в работе Lubitz с соавт. [118], наблюдалось экстратиреоидное распространение опухоли, а у 9/12 (75%) – метастатическое поражение шейных лимфоузлов жировой клетчатки

центральной зоны. Кроме того, у 2/12 (16.7%) пациентов были найдены очаги с гистологической картиной недифференцированного (анапластического) рака ЩЖ.

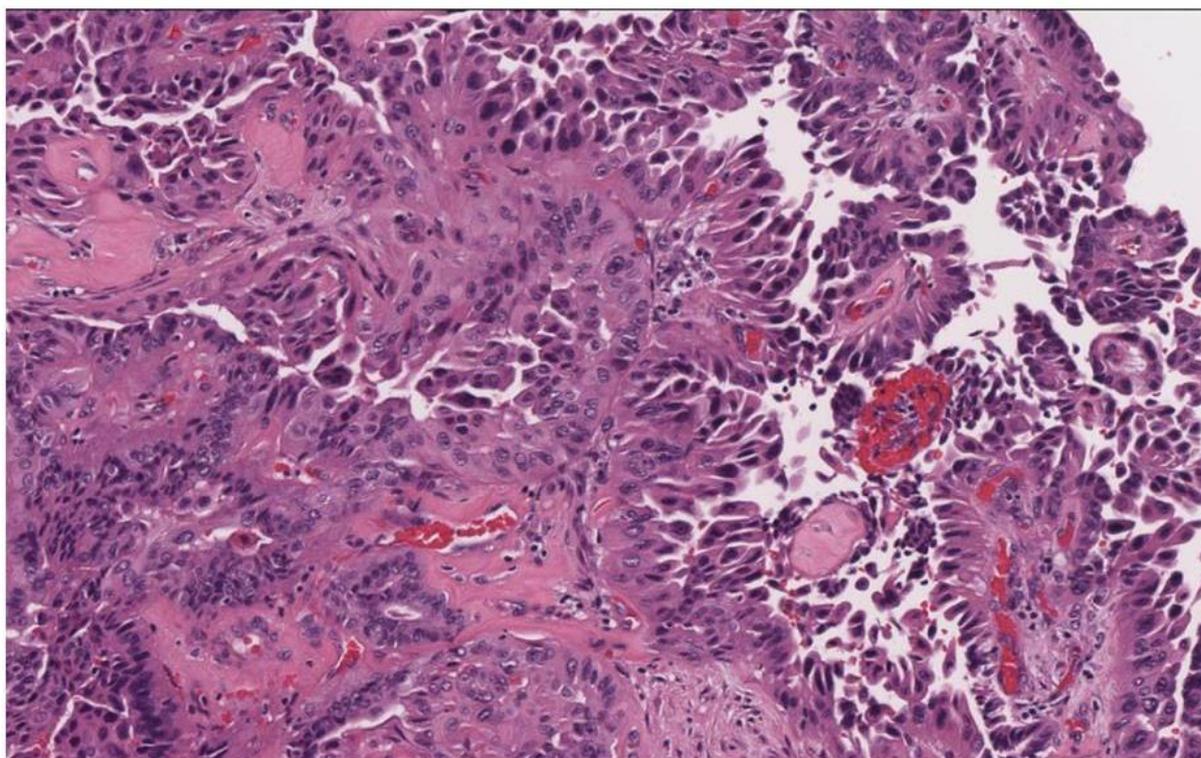


Рисунок 8. Гистологическая картина варианта ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» (случай TCGA-VJ-A0Z9).

Уортино-подобный вариант ПРЦЖ

Уортино-подобный вариант ПРЦЖ характеризуется оксифилией цитоплазмы опухолевых клеток и наличием значительного количества (до 80%) иммунных клеток в строме опухоли (рисунок 9) [119]. Как правило, данному варианту ПРЦЖ сопутствует хронический лимфоцитарный тиреоидит. Ряд работ рассматривает Уортино-подобный вариант ПРЦЖ как обладающий более благоприятным прогнозом по сравнению с классическим ПРЦЖ, однако результаты последних исследований не подтверждают данную точку зрения [120].

Ввиду малого количества охарактеризованных случаев, комплексный анализ клинико-патологических характеристик Уортино-подобного варианта ПРЦЖ затруднен. В 2017 году Kim с соавт. был опубликован систематический анализ литературы, в который вошли 32 исследования, описывающие случаи Уортино-

подобного ПРЦЖ (всего 156 случаев) [120]. Согласно данному анализу, возраст пациентов варьирует от 17 до 60 лет, и большинство из них являются женщинами. У пациентов с Уортино-подобным ПРЦЖ в 31% случаев наблюдаются метастазы в лимфоузлах, и их частота не отличается от таковой при классическом ПРЦЖ. В то же время, вопрос о том, какой из гистологических компонентов, классический или Уортино-подобный, является источником метастазирования, практически не исследовался.

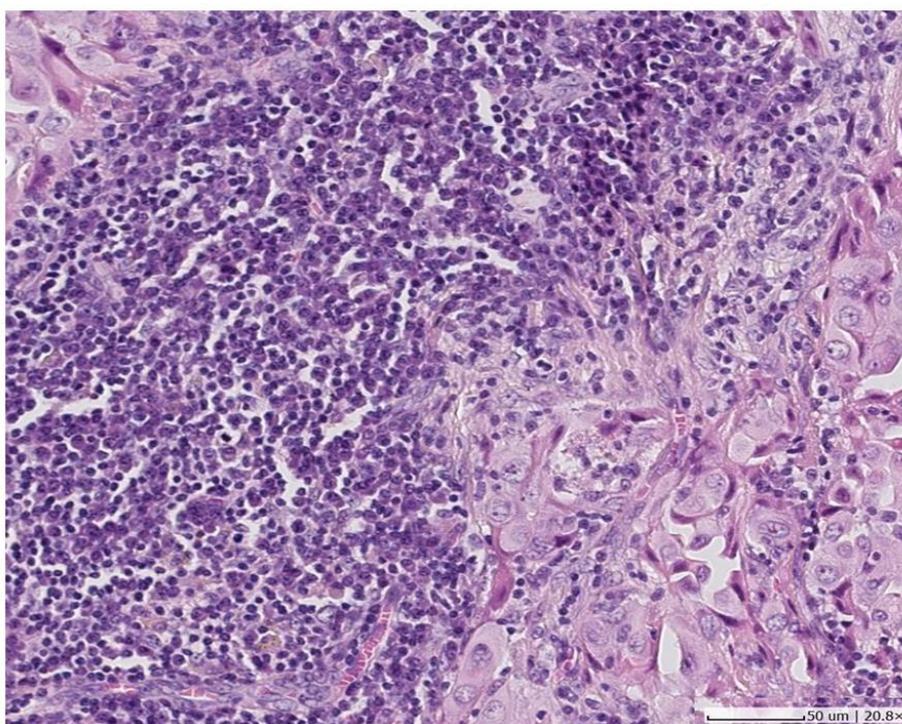


Рисунок 9. Гистологическая картина Уортино-подобного варианта ПРЦЖ.

Сосуществование различных цитоморфологических компонентов ПРЦЖ в пределах одного опухолевого очага

Участки с цитоморфологическими особенностями вышеописанных вариантов ПРЦЖ могут сосуществовать в одном опухолевом очаге. Так, в работе Lubitz с соавт. [118], посвященной анализу ПРЦЖ из клеток по типу «сапожных гвоздей», у 4/10 (40%) случаев наблюдались очаги из высоких клеток, занимающие 20-50% опухоли. В работе Teng с соавт. [117] фокальные компоненты из высоких и столбчатых клеток присутствовали в 5/18 (28%) случаев ПРЦЖ из клеток по типу «сапожных гвоздей».

В работе Ozaki с соавт. [121] было описано 13 случаев, которые авторы охарактеризовали как вариант ПРЦЖ из высоких клеток с интенсивной лимфоцитарной инфильтрацией стромы. Спустя некоторое время, эти случаи были переклассифицированы в Уортино-подобный вариант. Дифференциальная диагностика между Уортино-подобным и высококлеточным вариантами ПРЦЖ значительно затруднена, поскольку фокальные компоненты высоких клеток часто встречаются на фоне интенсивной иммунной инфильтрации стромы ПРЦЖ. Тем не менее, исследование данного феномена до сих пор не проводилось.

Иммунный инфильтрат опухолей щитовидной железы

Иммунный инфильтрат обнаруживается в 38% случаев опухолей щитовидной железы папиллярного и фолликулярного строения [122]. Наличие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов коррелирует с более благоприятным прогнозом для пациентов, что связано с меньшей частотой опухолевой инвазии, а также сниженным риском наличия отдаленных метастазов и рецидивов. Уровень долговременной выживаемости, согласно данным Matsubayashi с соавт., коррелирует с наличием в иммунном инфильтрате макрофагов и дендритных клеток, способных презентировать антигены опухолевых клеток лимфоцитам, и активировать последние [122].

Согласно данным Vagnasco с соавт., несмотря на практически идентичный субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов и опухолевом инфильтрате, цитолитическая активность последних в функциональных тестах была выше [123]. Это может свидетельствовать о вовлеченности Т-клеток в противоопухолевые иммунные реакции. В пользу данного предположения говорит и экспрессия костимуляторных молекул на поверхности тиреоцитов при болезни Грейвса и аутоиммунном тиреоидите [79], а также на опухолевых клетках при ПРЦЖ и фолликулярном раке щитовидной железы [124]. По-видимому, в ткани щитовидной железы происходит активация специфического Т-клеточного иммунного ответа на антигены, ассоциированные с опухолевой прогрессией и аутоиммунной патологией.

Дендритные клетки привлекаются в неопластический очаг хемокинами, выделяющимися в ходе роста опухоли или при сопровождающем ее аутоиммунном тиреоидите [125]. Большинство опухоль-инфильтрирующих дендритных клеток имеют незрелый фенотип: они могут активировать регуляторные Т-лимфоциты, а также секретировать активные формы кислорода, ингибирующие активность эффекторных и хелперных Т-клеток [126]. Таким образом, при раке щитовидной железы презентация опухолевых антигенов малоэффективна, поскольку функциональность дендритных клеток оказывается существенно снижена. В то же время, роль антиген-презентирующих клеток могут выполнять непосредственно опухолевые клетки.

Ассоциация аутоиммунного тиреоидита и опухолей щитовидной железы была отмечена учеными еще в 50-х гг. прошлого века, однако вопрос о роли аутоиммунного тиреоидита в биологии карцином щитовидной железы до сих пор не имеет однозначного ответа [127]. С одной стороны, наличие аутоиммунного тиреоидита коррелирует с благоприятным прогнозом для пациентов с опухолями щитовидной железы, а также с низкой частотой экстра-тиреоидного распространения опухоли, регионального и отдаленного метастазирования. С другой стороны, аутоиммунный тиреоидит и сопутствующее ему хроническое воспаление могут играть роль в инициации опухолевого роста. Повышение уровня апоптоза и пролиферации тиреоцитов в ходе аутоиммунного заболевания может увеличивать риск повреждения ДНК и, следовательно, приводить к опухолевой трансформации клеток [128]. Так, согласно данным Arif с соавт., онкогенные реаранжировки *RET/PTC* в препаратах аутоиммунного тиреоидита [129] были найдены во всех исследованных пробах вне зависимости от наличия в них микроскопических карцином. Исходя из этих данных, можно предположить, что аутоиммунный тиреоидит предшествовал развитию опухолей. В то же время, данные аналогичного исследования Mechler с соавт., не подтверждают результатов Arif с соавт.: реаранжировки *RET/PTC* были обнаружены ими исключительно в опухолевой, но не в нормальной ткани щитовидной железы [130].

Различные варианты рака щитовидной железы с разной частотой встречаются на фоне аутоиммунного тиреоидита. Так, согласно данным систематического анализа литературы, приведенного в работе Kim с соавт., большая часть описанных случаев Уортино-подобного варианта ПРЩЖ (72.4%) сопровождается аутоиммунным тиреоидитом [120]. Общий же процент случаев ПРЩЖ, протекающих на фоне аутоиммунного тиреоидита, составляет 21.6% [131].

Генетическая характеристика опухолей щитовидной железы

Жизнедеятельность клеток щитовидной железы поддерживается комплексом молекулярных сигнальных каскадов, инициируемых факторами роста (например, IGF-I) через MAP киназы и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), а также тиреотропным гормоном через cAMP. Показано, что мутации молекул, вовлеченных в сигнальные каскады, могут играть ключевую роль в развитии неоплазий щитовидной железы. Так, основными драйверными мутациями ПРЩЖ, встречающимися в более чем 70% случаев, являются мутации в генах *BRAF* и *RAS*, а также образование онкогена *RET/PTC* [132].

Мутации в гене RAS

Ген *RAS* представлен тремя высокогомологичными изоформами: *NRAS*, *HRAS* и *KRAS*. Белок *RAS* играет важную роль в передаче сигнала от тирозиновой киназы *RET* и рецепторов, связанных с G-белком, к эффекторным молекулам *MAPK* и *PI3K-AKR* сигнальных каскадов (рисунок 12). Активность *RAS* регулируется гидролизом GTP в GDP: GTP-связанная форма *RAS* является активной. Точечные онкогенные мутации в гене *RAS* приводят к конститутивной aberrантной активации *MAPK* и *PI3K-AKR* сигнальных каскадов, что является важным этапом в неопластической трансформации эпителия щитовидной железы [133].

Опухоли щитовидной железы могут быть ассоциированы со всеми тремя мутантными изоформами *RAS*, однако самой распространенной является мутация *NRAS61*. Чаще всего мутации в гене *RAS* наблюдаются в фолликулярных опухолях

щитовидной железы (фолликулярные аденомы – 26%, фолликулярный рак – 40%), частота мутаций при ПРЦЖ составляет около 11% (от 0 до 21% в различных исследованиях) [133]. Большая часть мутаций в ПРЦЖ обнаруживается в фолликулярном варианте ПРЦЖ. По данным Zhu с соавт., исследовавшего 30 случаев фолликулярного варианта ПРЦЖ и 46 случаев ПРЦЖ других вариантов, частота мутаций в первой группе составила 43%; при этом во второй группе не было найдено ни одного пациента, имевшего мутацию [134].

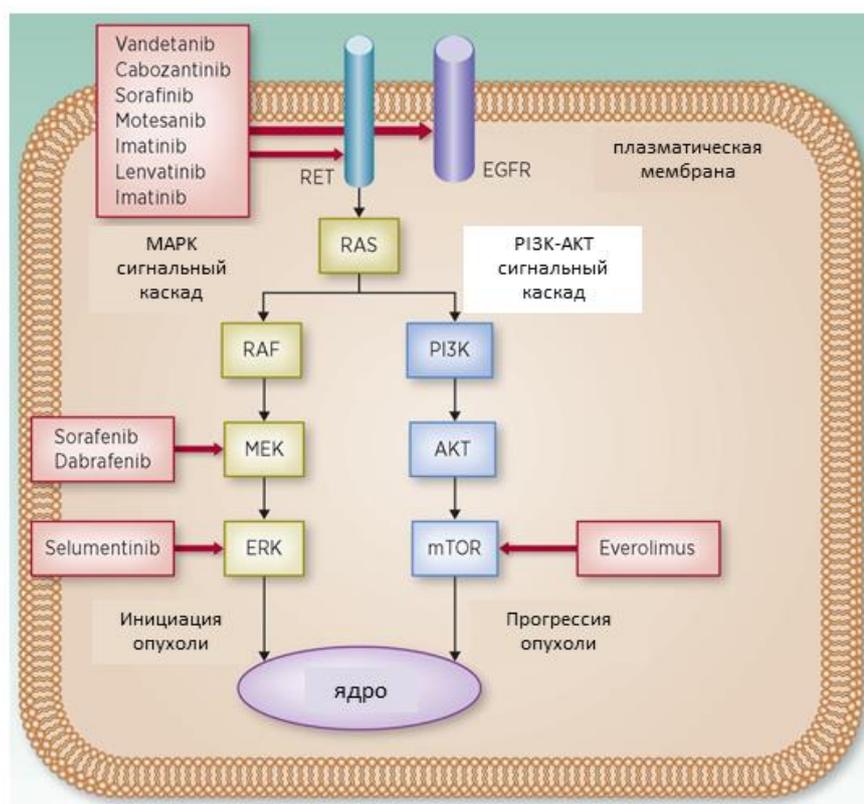


Рисунок 10. RAS-опосредованный сигнальный каскад. По [135]

Мутации в гене BRAF

В клетках млекопитающих существует три изоформы серин-треониновой киназы RAF: A-RAF, B-RAF и C-RAF (RAF1). Последняя экспрессируется повсеместно, тогда как B-RAF синтезируется преимущественно в гематопоетических клетках, нейронах и клетках тестикул, а также в клетках фолликулярного эпителия щитовидной железы [136]. Все изоформы RAF активируют MEK, однако B-RAF имеет большую аффинность к MEK1 и 2 и, по сравнению с другими изоформами, более эффективно их фосфорилирует.

Соматические мутации *BRAF* были обнаружены в большинстве доброкачественных невусов и меланоме, а также в небольшом количестве карцином яичников и толстой кишки [137]. Около 98% этих мутаций составляла замена тимина на аденин в позиции 1796, приводящая к замене валина на глутамат в 600 положении (*BRAF V600E*). Результаты кристаллографического анализа выявили влияние данной мутации на свойства BRAF: мутации, происходящие в положениях G596-V600 или G464-V471, ослабляют гидрофобные взаимодействия между этими участками и дестабилизируют неактивное состояние фермента. Большинство, но не все известные онкогенные мутации BRAF приводят к активации его киназной активности, индуцируя фосфорилирование ERK [138].

Мутация *BRAF V600E* – наиболее часто встречающаяся мутация в ПРЦЖ, ее частота в различных исследованиях составляет 30-90%. Также описаны мутация *BRAF K601E*, небольшие вставки и делеции около 600-го кодона, а также хромосомные перестройки (например, АКАР9-BRAF). Наличие мутаций BRAF характерно для определенных гистологических вариантов. Так, значительный процент ПРЦЖ из высоких клеток, а также недифференцированный и анапластический рак щитовидной железы демонстрируют наличие BRAF мутаций [139].

RET/PTC онкоген

Авария на Чернобыльской атомной электростанции привела к выбросу значительного количества радиоактивных элементов в атмосферу, что стало причиной повышения частоты встречаемости ПРЦЖ у детей. Генетический анализ опухолей показал, что в патогенез таких опухолей вовлечен онкоген RET. RET – это рецепторная тирозинкиназа, экспрессирующаяся в клетках нервного гребня. Под воздействием радиации в клетках щитовидной железы происходят хромосомные перестройки и образуется слитный белок, включающий внутриклеточный тирозинкиназный домен RET и N-концевой фрагмент гетерологичного гена [140].

Было идентифицировано несколько форм *RET/PTC* онкогена, различающихся геном, вовлеченным в реаранжировку. Чаще всего встречаются онкогены типа *RET/PTC1* и *RET/PTC3*. В первом случае в качестве гетерологичного гена выступает ген *H4/D10S170*, во втором – ген *RFG/ELE1*. Оба располагаются на десятой хромосоме, так же, как и сам *RET*. Слитные белки димеризуются и конститутивно активируют тирозинкиназную функцию *RET* [141].

RET/PTC онкоген встречается в 66-87% случаев рака щитовидной железы у детей после Чернобыльской аварии [142]. Тем не менее, такая хромосомная перестройка встречается и среди спорадических случаев ПРЦЖ у детей, однако ее частота сильно ниже (около 40%). При ПРЦЖ у взрослых *RET/PTC* реаранжировки встречаются в 15-20% случаев, однако их количество значительно варьирует в различных типах ПРЦЖ [143].

На данный момент накоплено большое количество данных, свидетельствующих о том, что образование *RET/PTC* онкогена может являться ключевым событием в патогенезе рака щитовидной железы. Во-первых, *in vitro* облучение клеток недифференцированного рака щитовидной железы и эмбриональных клеток щитовидной железы приводило к индукции *RET/PTC* реаранжировок в дозозависимой манере [144]. Во-вторых, значительная часть микрокарцином ПРЦЖ экспрессируют *RET/PTC* онкоген [145]. В-третьих, анализ ДНК папиллярных карцином у детей, подвергнутых воздействию радиации в результате Чернобыльской аварии, показал, что *RET/PTC3* появляется в результате двунитевых разрывов ДНК, опосредованных облучением. Кроме того, в интерфазе в клетках щитовидной железы линейная десятая хромосома изгибается таким образом, что участки генов *RET* и *H4* оказываются рядом друг с другом, и при наличии двунитевых разрывов, обусловленных ионизирующим излучением, формируют *RET/PTC1* онкоген [146], [147].

Мутации в промоторе гена TERT

Обратная транскриптаза теломеразы (telomerase reverse transcriptase, TERT) – это каталитическая субъединица теломеразы, которая совместно с РНК

субъединицей и несколькими дополнительными белками комплекса осуществляет синтез теломер на концах хромосом. Теломераза экспрессируется на высоком уровне в зародышевых и стволовых клетках, а также нередко реактивируется во множестве опухолей, способствуя неограниченному делению неопластических клеток. TERT также модулирует экспрессию генов, контролирующих рост, напрямую регулирует экспрессию NF-κB-зависимых генов и стабилизирует уровень MYC [148].

Полногеномные исследования ассоциаций выявили несколько мутаций в гене TERT, встречающихся в опухолях различного происхождения и, в частности, в раке щитовидной железы. Наиболее частыми оказались мутации в промоторе гена *TERT* *C228T* и *C250T*. Начиная с 2013 года, проведено множество исследований, направленных на определение частоты встречаемости этих мутаций в опухолях щитовидной железы. В среднем, около 11% случаев ПРЦЖ имеют мутации в промоторе *TERT*, причем их наличие коррелирует с различными клинико-патологическими характеристиками опухолей. Так, согласно данным Liu с соавт., наличие мутаций связано с большей агрессивностью опухолей (инвазией сосудов, экстрагитреоидным распространением, наличием отдаленных метастазов и метастазов в регионарных лимфоузлах) и неблагоприятным прогнозом для пациента [148].

Генетические особенности отдельных вариантов ПРЦЖ

По степени дифференцировки рак щитовидной железы, как правило, разделяют на высоко-, низко- и недифференцированный варианты. К первому типу относятся фолликулярный рак щитовидной железы и ПРЦЖ. В то же время, различные гистологические варианты ПРЦЖ могут быть ранжированы и по степени дифференцировки, исходя из уровня экспрессии тиреоспецифичных генов. В исследовании Agrawal с соавт. [149] был проведен полногеномный анализ 496 случаев ПРЦЖ, из которых 324 случая (69.4%) были охарактеризованы как классический ПРЦЖ, а 35 случаев (7.5%) – как вариант ПРЦЖ из высоких клеток.

Согласно этим данным, степень дифференцировки увеличивается в ряду вариант ПРЦЖ из высоких клеток – классический ПРЦЖ – фолликулярный вариант ПРЦЖ. В этом же ряду снижается процент опухолей, позитивных по *BRAF V600E* мутации и мутациям в промоторе гена *TERT*, а также агрессивность течения заболевания.

Интересно, что с гистологическим вариантами ПРЦЖ из высоких клеток связаны особые кластеры мРНК и микроРНК: мРНК кластер 5 и микроРНК кластер 6 (86/106 опухолей, входящих в мРНК кластер 5, одновременно принадлежат к микроРНК кластеру 6, содержащему 144 пробы). Эти кластеры характеризуются самой высокой частотой мутации *BRAF V600E*, а также самыми низкими значениями показателей дифференцировки и соотношения *BRAF/RAS* мутаций (значения обратно коррелируют со степенью дифференцировки и количеством *BRAF V600E* мутаций). Детального анализа генов, входящих в тот или иной кластер, в статье не приведено, однако указывается, что одной из микроРНК, характеризующей вариант ПРЦЖ из высоких клеток, является miR-21, чья экспрессия связана с повышенной агрессивностью опухолей [149].

В отличие от других вариантов ПРЦЖ, ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» описавшие его авторы относят к умеренно дифференцированному, а не к высокодифференцированному раку [150].

Наибольшая частота *BRAF V600E* мутации среди ПРЦЖ (60-95%) наблюдается у варианта ПРЦЖ из высоких клеток. Частота *BRAF V600E* мутации в ПРЦЖ с клетками типа «сапожных гвоздей» также значительно выше, чем у классического ПРЦЖ и варьирует от 40 до 95% по данным различных исследований [117]. В ПРЦЖ из столбчатых клеток мутации в гене *BRAF* встречаются значительно реже по сравнению с классическим ПРЦЖ, их частота составляет 30-35% [114], [116]. При Уортино-подобном ПРЦЖ частота мутаций гена *BRAF* не отличается от таковой при классическом ПРЦЖ [139].

Мутации в промоторе гена *TERT* встречаются в ПРЦЖ достаточно редко, однако в ПРЦЖ из высоких клеток их процент достаточно велик (около 5-30%)

[111], [151]. Единственный случай ПРЦЖ из столбчатых клеток, приведенный в работе Liu с соавт. [151], был также позитивен по *TERT C228T*. В исследовании Teng с соавт. [117] был проведен анализ мутаций в промоторе *TERT* при ПРЦЖ с клетками типа «сапожных гвоздей» и обнаружен 1 из 17 случаев, позитивный по мутации *TERT C228T*. В тоже время, в одном из исследований случаев ПРЦЖ с клетками типа «сапожных гвоздей» мутаций в промоторе гена *TERT* обнаружено не было [152]. Анализ наличия мутаций в промоторе *TERT* при Уортино-подобном варианте ПРЦЖ проведен не был. Таким образом, наличие мутаций в *TERT* промоторе коррелирует с агрессивным течением опухоли.

Процент *RET/PTC* транслокаций при ПРЦЖ невелик, и их частота в классическом ПРЦЖ и варианте ПРЦЖ из высоких клеток практически одинакова. Частота образования *RET/PTC* онкогена при Уортино-подобном ПРЦЖ не исследована. Анализ наличия реаранжировок *RET/PTC* в ПРЦЖ из клеток типа «сапожных гвоздей» был проведен в трех исследованиях. В двух из них была обнаружена *RET/PTC1* транслокация (2/8, 25% в исследовании Lubitz с соавт. СС, 2014, и 1/8, 12.5% в исследовании Ieni с соавт., 2016) [118], [153]. В статье Teng с соавт. ни одной реаранжировки найти не удалось [117]. Авторы предполагают, что подобный эффект может быть обусловлен недостаточно высоким качеством ДНК, выделенной из парафиновых блоков, и призывают интерпретировать эти данные с осторожностью.

Мутации в гене *RAS* встречаются в ПРЦЖ значительно реже (0-15% для классического ПРЦЖ), при этом в варианте ПРЦЖ из высоких клеток они не были обнаружены [149]. Анализ наличия *RAS* мутаций в Уортино-подобном ПРЦЖ, варианте ПРЦЖ из столбчатых клеток и клеток типа «сапожных гвоздей» не проводился.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

Когорта пациентов из Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба

27 случаев Уортино-подобного ПРЦЖ были выбраны из архива отделения патоморфологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба (МРНЦ, г. Обнинск, Россия). Для всех случаев имелся опухолевый материал в виде парафинового блока, для 9 также была доступна замороженная ткань. В таблице 1 приведена клинико-патологическая информация о пациентах, участвующих в исследовании. В приложении 1 представлены данные по каждому пациенту индивидуально.

Когорта пациентов из базы данных TCGA

Для формирования дополнительной выборки пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ доступные гистологические препараты для 486 случаев ПРЦЖ из базы данных TCGA (<http://www.cbioportal.org/>), были исследованы на наличие очагов с Уортино-подобной гистологией. В ходе работы было выявлено 4 случая опухоли, в которых Уортино-подобный гистологический компонент занимал более 75% площади, 9 случаев с 25-75% площади и 13 случаев, у которых Уортино-подобная гистология наблюдалась в 10-25% площади опухоли. В литературе не обозначена нижняя граница площади гистологического компонента, по которой опухоль классифицируют как Уортино-подобный вариант ПРЦЖ. Поэтому нами была сформирована когорта, состоящая из 13 пациентов, в опухолях которых Уортино-подобная гистологическая картина наблюдалась больше чем на 25% площади опухоли. В таблице 1 приведена клинико-патологическая информация о пациентах, отобранных для исследования. В приложении 2 представлены данные по каждому пациенту индивидуально.

Таблица 1. Клинико-патоморфологический анализ когорт пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ, участвующих в исследовании.

	МРНЦ (г. Обнинск, Россия)	База данных TCGA	Совокупность пациентов
Общее количество случаев	27	13	40
Возраст (среднее значение)	17-71 (51.7)	18-69 (38.1)	17-71 (47.3)
Пол (Ж:М)	24:3	13:0	37:3
Размер опухоли, см (среднее значение)	0.1-4.0 (1.2)	0.6-4.0 (2.3)	0.1-4.0 (1.6)
Метастатическое поражение лимфоузлов	9/26 (34.6%)	5/13 (38.5%)	14/39 (36.0%)
Наличие экстратиреоидного распространения	5/27 (18.5%)	5/13 (38.5%)	10/40 (25%)
Наличие сопутствующего аутоиммунного тиреоидита	26/26 (100%)	10/10 (100%)	36/36 (100%)

Для анализа мРНК и микроРНК профилей Уортино-подобного и высококлеточного вариантов ПРЦЖ также была сформирована выборка из 31 случая ПРЦЖ из высоких клеток (клинико-патологическая информация представлена в приложении 3).

Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов

Окрашивание срезов ткани антителами к различным маркерам иммуноцитов было проведено по стандартной методике с использованием пероксидазной системы детекции с DAB (Dako). Список антител, использованных для окрашивания, приведен в таблице 2.

Предварительно подготовленные срезы толщиной 3-5 мкм были подвергнуты депарафинизации в четырех порциях ксилола в течение 5 минут с последующим обезвоживанием в последовательности из шести спиртов нисходящей концентрации (от 95⁰ до 80⁰) по 3 минуты в каждом. Далее срезы промывали в

дистиллированной воде и проводили демаскировку эпитопа в буферах Dako Target Retrieval Solution I или II в соответствии с инструкцией к антителу.

После промывания стекол дистиллированной водой проводили блокировку эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода в течение 10 минут, трехкратное промывание дистиллированной водой и трис-буфером (20x буфер – 1мМ Трис, 3М NaCl, 1% Твин-20). Далее срезы окрашивали первичными антителами (таблица 2), разведенными в Dako Antibody Diluent в соответствии с инструкцией. После трехкратного промывания стекол трис-буфером на срез наносили вторичные антитела (Dako EnVision FLEX/HRP) и инкубировали 30 минут, после чего смывали избыток антител трехкратным промыванием трис-буфером. Окрашивание проводили посредством инкубации с диаминобензидином (EnVision FLEX DAB+ Chromogen), разведенным в соответствующем буфере (Dako EnVision FLEX Substrate buffer), в течение 5 минут. После окраски стекла промывали дистиллированной водой, окрашивали гематоксилином в течение 1 минуты с последующей дегидратацией в батарее из 6 спиртов, 2 видов ацетона и 3 ксилолов и заключением с использованием канадского бальзама.

Окрашивание антителами к CD4, CD8, CD45RO, CTLA-4 и PD-1 проводили с использованием автоматического иммуногистостейнера Leica BOND и фирменных реактивов Leica.

Для окрашивания гематоксилином-эозином срезы депарафинизировали, как было описано ранее, далее обрабатывали гематоксилином в течение 5-7 минут, после чего промывали в дистиллированной воде, дифференцировали окраску в 1% растворе HCl, приготовленном на 70⁰ этаноле, до побурения срезов. Далее стекла промывали дистиллированной водой и 0.5% раствором аммиака до посинения срезов и окрашивали раствором эозина в течение 30 секунд. Стекла промывали в дистиллированной воде, дегидратировали и заключали, как описано ранее.

Таблица 2. Антитела, использованные при иммуногистохимическом анализе.

Антиген	Антитело	Разведение
CD3	Dako, клон F7.2.38	1/50
CD79 α	Dako, клон JCB117	1/50
CD4	Leica, клон 4B12	-*
CD8	Leica, клон 4B11	-*
CD45RO	Leica, клон UCHL1	-*
CD20	Dako, клон L26	1/200
CD21	Dako, клон 1F8	1/50
CD68	Dako, клон PG-M1	1/100
CTLA4	Bio SB, клон BSB 2884	1/50
PD-1	Sigma Aldrich, клон HPA035981	1/50

* - готовые к использованию антитела для автоматической окраски с использованием системы Leica

Выделение нуклеиновых кислот

Тотальную РНК и ДНК выделяли из замороженной и парафинизированной ткани с использованием наборов RNEasy FFPE Kit (Qiagen) и QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen), соответственно, согласно протоколу производителя. Данный этап работы проводили сотрудники ЗАО Евроген. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора MMLV RT Kit (Евроген, Москва, Россия), используя 2 мкг тотальной РНК и олиго-dT праймер, согласно протоколу производителя.

Анализ клональности опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

Анализ клональности опухоль-инфильтрирующих В- и Т-лимфоцитов проводили с использованием геномной ДНК пациентов.

Оценку клональности опухоль-инфильтрирующих В-клеток проводили в два этапа. На первом этапе клональность оценивали методом ПЦР для IgH, описанным в статье Hansen с соавт. [154]. Гипервариабельный участок IgH амплифицировали с использованием следующих праймеров:

IgH_Fwd (5'-GGACACGGCT[G/C]TGTATTACTG-3')

IgH_Rev (5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3').

Продукты амплификации разделяли в 12.5% денатурирующем полиакриламидном геле с мочевиной (подробная методика описана у Summer с соавт. [155]). В частности, готовили полиакриламидный гель (8 М мочевины, 12.5% акриламид-бисакриламид (29:1) на TBE (трис-боратный буфер, 5x: 450 мМ Трис, 450 мМ борная кислота, 10 мМ ЭДТА, pH 8), персульфат аммония (1/100 v/v 10% стокового раствора) и TEMED (1/1000 v/v), заливали его между стеклами для вертикального электрофореза и оставляли до момента полимеризации (толщина геля 1 мм). Гель помещали в ячейку для вертикального электрофореза, удаляли гребенку и проводили первый этап электрофореза в течение 30 минут при температуре геля 45-55⁰С (при необходимости изменяя напряжение в пределах 15-25 В на гель). Вносили пробы, разведенные 1:1 в буфере для нанесения образцов (90% формальдегид, 0.5% ЭДТА, 0.1% ксиленианол и 0.1% бромфеноловый синий) и прогретые 2-3 минуты при температуре 90⁰С, в предварительно промытые от мочевины ячейки. Второй этап электрофореза проводили при температуре 55⁰С. Далее гель аккуратно вынимали и фиксировали в 7.5% уксусной кислоте в течение 10 минут.

Окрашивание геля осуществляли с помощью серебра согласно протоколу Bassam& Gresshof [156]. После 10-минутной фиксации в 7.5% уксусной кислоте тщательно промывали гель дистиллированной водой 3 раза по 2 минуты и инкубировали в 15% растворе формальдегида в течение 10 минут. После этого гель помещали в раствор нитрата серебра (0.1 г на 100 мл) и инкубировали в течение 20 минут. После быстрого промывания дистиллированной водой (15 сек) гель помещали в охлажденный до 4⁰С буфер для визуализации (3 г Na₂CO₃ в 100 мл

дистиллированной воды с добавлением 50 мкл 25 мМ раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) и окрашивали гель до необходимой степени яркости. Реакцию останавливали погружением геля в охлажденный раствор 7.5% уксусной кислоты. Пробы далее дополнительно анализировали методом мультиплексной ПЦР (протокол BIOMED-2/Euroclonality). Данный анализ проводила Светлана Смирнова, сотрудница лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Мультиплексную ПЦР на генные реаранжировки IgH (VH-JH FR1/FR2/FR3) и TCRG проводили согласно статье van Dongen с соавт. [157]. Смесь для ПЦР генов IGН и TCRG объемом 25 мкл содержала 10 пмоль каждого праймера (Синтол, Россия), 100–200 нг ДНК и 12,5 мкл 2xPCR Master Mix (Promega, USA). Реакцию проводили на амплификаторе Thermocycler DNA Engine (BioRad, USA) при следующих условиях ПЦР: 95°C (7 мин), 35 циклов: 95° (45 сек), 60° (45 сек), 72° (45сек) и финальная элонгация 72° (10 мин).

Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Для этого 2 мкл ПЦР-продукта, разведенного в 20 раз, смешивали с 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, USA) и 0,04 мкл GeneScan 500-LIS Size Standard (Applied Biosystems, USA). После денатурации при 95°C в течение 3 мин и последующего охлаждения, 10 мкл смеси наносили в лунку 96-луночного планшета и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems, USA). Флуоресценцию и размеры продуктов анализировали в программе GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, USA).

Анализ транслокаций *RET/PTC1* и *RET/PTC3*

Анализ *RET/PTC1* и *RET/PTC3* транслокаций проводили с использованием кДНК. Для амплификации методом ПЦР использовали следующие праймеры: *RET/PTC1_Fwd* 5'-GCCTGGAGGAGCTCACCAA-3',
RET/PTC1_Rev 5'-CTCTGCCTTTCAGATGGAA-3',

RET/PTC3_Fwd 5'-ACCTGCCAGTGGTTATCAAGCT-3',

RET/PTC3_Rev 5'-TTCGCCTTCTCCTAGAGTTTTTCC-3'.

Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.5 мкг/мл.

Мутационный анализ *BRAF V600E*

Поиск мутаций в гене *BRAF* (экзон 15) в ДНК проводили сотрудники ЗАО Евроген (Москва, Россия) методом мутационно-специфичной ПЦР в режиме реального времени с использованием набора Insider Mutation Detection Kit (Евроген, Москва, Россия) согласно протоколу производителя. Анализируемую ДНК в концентрации 100 нг/66 мкл добавляли в предварительно приготовленные 44 мкл смеси для ПЦР, содержащей ПЦР-растворитель (41.85 мкл) и ДНК-полимеразу (2.15 мкл), после чего распределяли по четырем пробиркам с высушенной реакционной смесью (25 мкл/пробирка). Амплификацию проводили со следующими условиями ПЦР: 95°C (2 мин), 50 циклов: 95° (15 сек), 55° (40 сек), 72° (60 сек). Далее осуществляли проверку положительных и сомнительных результатов методом секвенирования ПЦР-продуктов. Результаты секвенирования сравнивались с референсной последовательностью соответствующего региона генома человека из базы данных EnSEMBL (<http://www.ensembl.org>, Release 69).

***In silico* анализ экспрессии хемокинов и цитокинов в опухолевой ткани**

Для сравнения уровня экспрессии хемокинов CXCL12, CXCL9, CXCL10, CCL25, CCL28 и цитокинов BAFF (TNFSF13B) и APRIL (TNFSF13) в классическом и Уортино-подобном вариантах ПРЦЖ данные об экспрессии мРНК были экспортированы из базы данных TCGA в виде z-score. Сравнение проводили в программе GraphPad Prism 6, там же проводили статистическую обработку результатов и их визуализацию.

***In silico* сравнительный анализ мРНК и микроРНК профиля Уортино-подобного и высококлеточного вариантов ПРЦЖ**

Для сравнения мРНК и микроРНК профиля между Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ и ПРЦЖ из высоких клеток данные о мРНК и микроРНК кластерах, к которым принадлежали пробы согласно работе Agrawal с соавт. [149], были извлечены из базы данных TCGA. Проверку на статистическую значимость различий проводили при помощи точного критерия Фишера.

***In silico* анализ иммунного инфильтрата опухолей щитовидной железы**

Для *in silico* анализа субпопуляций опухоль-инфильтрирующих иммунцитов Уортино-подобного варианта ПРЦЖ были использованы результаты анализа иммунома из базы данных TCGA, опубликованные в работе Thorsson с соавт. [1]. Из таблицы, представленной в дополнительных материалах, были экстрагированы результаты анализа для 503 случаев ПРЦЖ. Был проведен сравнительный анализ всех параметров иммунного ответа между группами Уортино-подобного варианта ПРЦЖ (13 образцов) и группой всех остальных случаев ПРЦЖ (490 образцов). Сравнение проводили в программе GraphPad Prism 6, статистическую обработку результатов проводили там же.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 6. Для сравнения частоты встречаемости мутации *BRAF V600E*, наличия гистологического компонента из высоких клеток, а также сравнения мРНК и микроРНК профилей групп пациентов использовали точный критерий Фишера. При оценке различий в экспрессии хемокинов и цитокинов, а также различных параметров иммунологического статуса опухолей между группами Уортино-подобного варианта ПРЦЖ и другими ПРЦЖ использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для анализа размера эффекта параметров, ассоциированных с иммунной инфильтрацией, использовали индекс *d* – Коэна.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая блок-схема исследования приведена на рисунке 11.

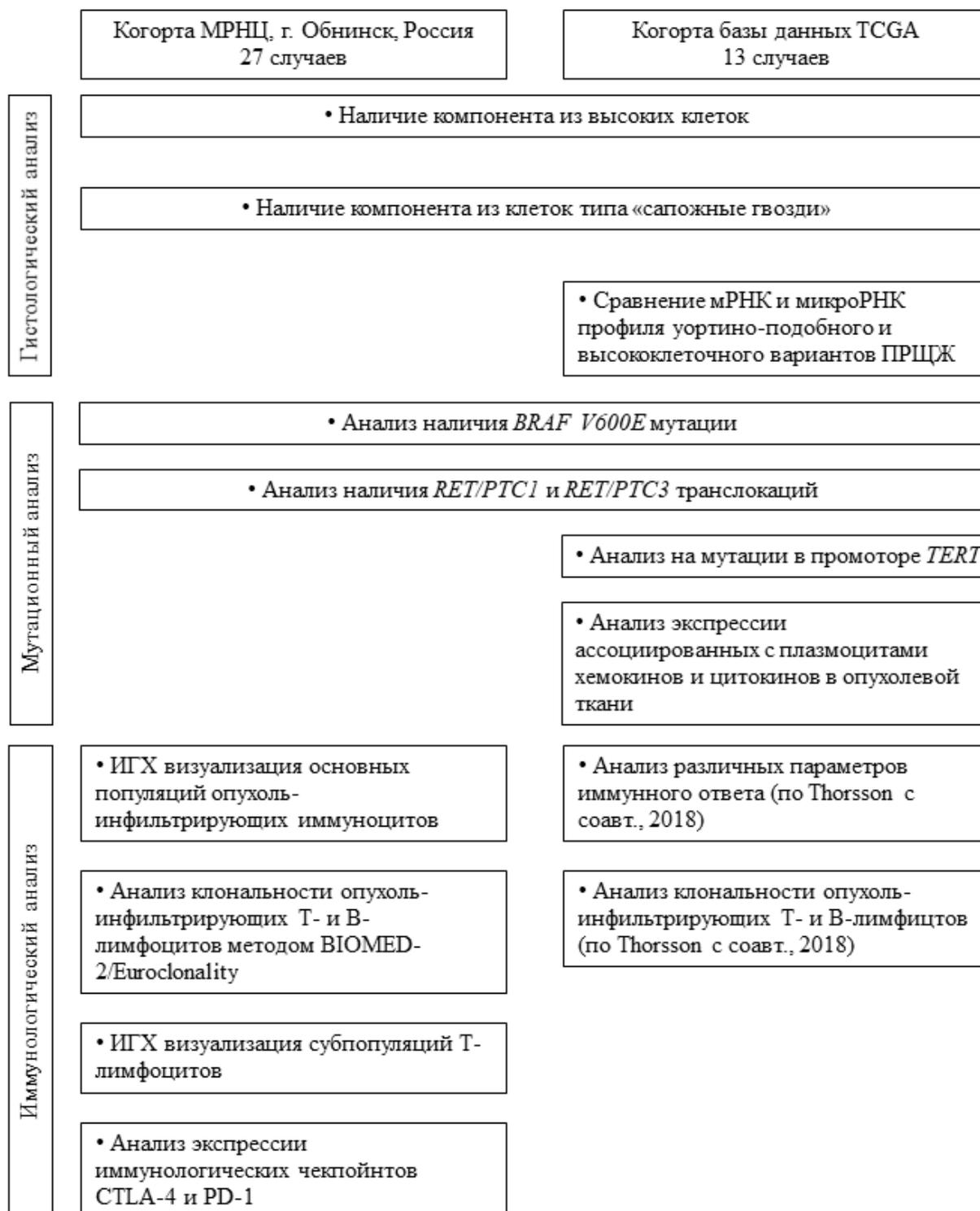


Рисунок 11. Схема исследования.

Клинико-патоморфологический анализ проб Уортино-подобного варианта ПРЦЖ

Детальная клинико-патоморфологическая характеристика проб Уортино-подобного варианта ПРЦЖ была проведена с использованием парафиновых срезов, окрашенных гематоксилином-эозином. Всего было проанализировано 27 пациентов из МРНЦ им. А.Ф. Цыба (г. Обнинск, Россия). Данные для пациентов из базы TCGA были взяты из патологического описания, выложенного в открытом доступе. Результаты клинико-патоморфологического анализа приведены в таблице 1.

Анализ структурных гистологических компонентов Уортино-подобного ПРЦЖ

Среди опухолей Уортино-подобной гистологии из когорты МРНЦ, 4/27 (14.8%) демонстрировали наличие компонента высоких клеток, занимавшего более 30% опухоли, и 4/27 (14.8%) – 10-30% опухоли (таблица 3, рисунок 12). В когорте из 13 пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ из базы данных TCGA у 8/13 (61.5%) был обнаружен гистологический компонент из высоких клеток: у 2/13 (15.4%) он составил более 30% опухоли, а у 6/13 (46.2%) - 10-30% опухоли (таблица 2). Кроме того, у 2/13 (15.4%) пациентов был обнаружен незначительный компонент из клеток типа «сапожных гвоздей». Один из этих пациентов также демонстрировал наличие фокального компонента из высоких клеток.

Статистически значимой ассоциации между наличием фокального компонента из высоких клеток и агрессивным течением заболевания обнаружить не удалось. Тем не менее, такая тенденция наблюдается: в объединенной выборке из 15 опухолей, имевших более 10% высоких клеток, у 6 (40%) наблюдалось метастазирование в лимфоузлы, а у 5 (31%) происходило экстрапериоидное распространение опухоли. В группе Уортино-подобного ПРЦЖ без высококлеточного компонента данные параметры были равны 8/24 (33%) и 5/24 (21%), соответственно (таблица 3).

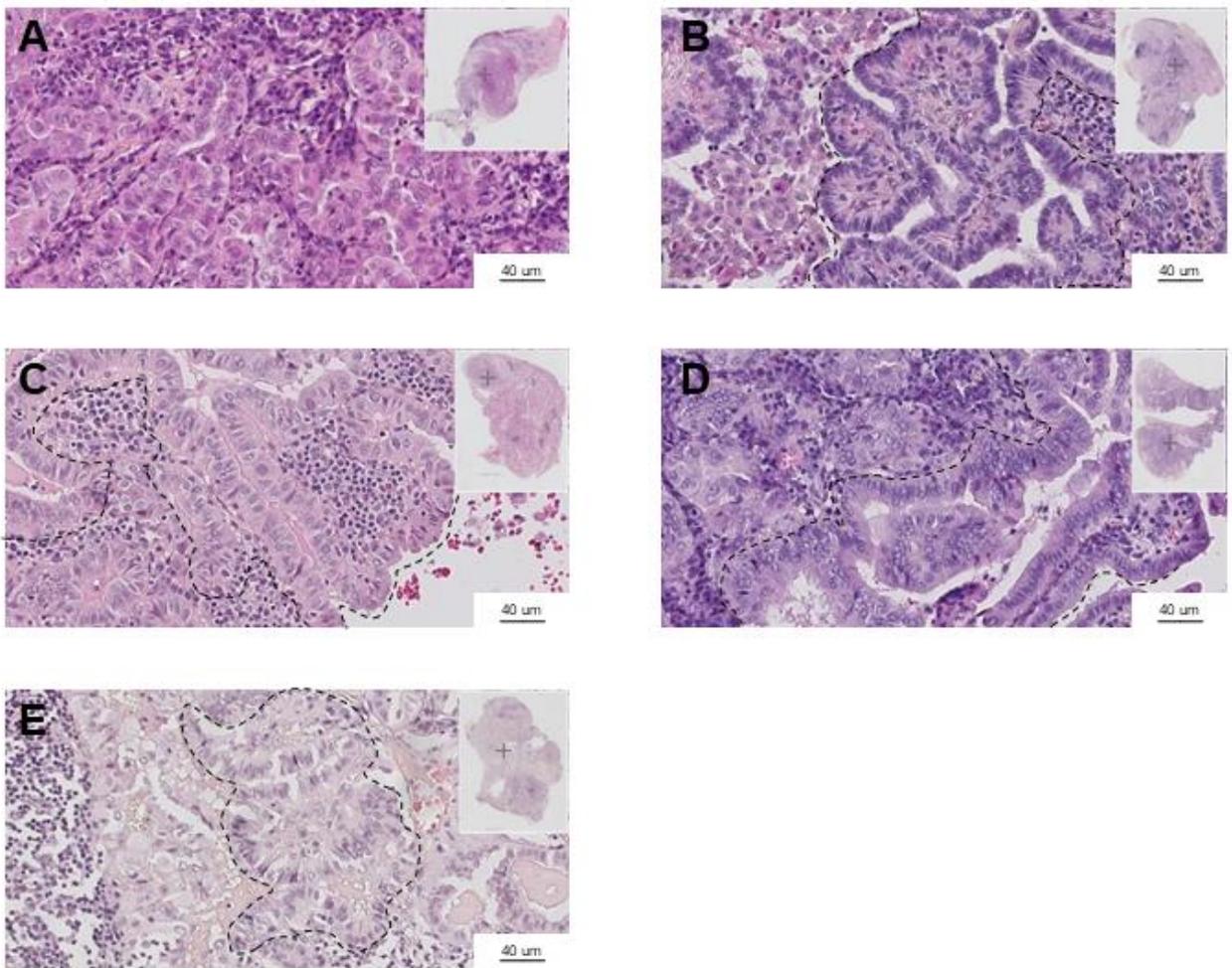


Рисунок 12. Примеры гистологического компонента из высоких клеток, сопровождающего Уортино-подобный вариант ПРЦЖ (когорта МРНЦ).

Таблица 3. Наличие компонента из высоких клеток в опухолях Уортино-подобного варианта ПРЦЖ.

	МРНЦ (г. Обнинск, Россия)		База данных TCGA		Совокупность пациентов	
Общее количество случаев	27		13		40	
	Высокие клетки >10%	Отсутствие высоких клеток	Высокие клетки >10%	Отсутствие высоких клеток	Высокие клетки >10%	Отсутствие высоких клеток
	8 (29.6%)	19 (70.4%)	8 (61.5%)	5 (38.5%)	16 (40%)	24 (60%)
Метастатическое поражение лимфоузлов	4/7 (57%)	5 (26%)	2 (25%)	3 (60%)	6/15 (40%)	8 (33%)
Наличие экстратиреоидного распространения	1 (12.5%)	4 (21%)	4 (50%)	1 (20%)	5 (31%)	5 (21%)
Наличие <i>BRAF V600E</i> мутации	8 (100%)	11 (58%)	7 (88%)	4 (80%)	15/16 (94%)	15 (62.5%)

Анализ основных драйверных мутаций в Уортино-подобном ПРЦЖ

Нами был проведен анализ мутаций *BRAF V600E* и транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3* в опухолевой ткани Уортино-подобного варианта ПРЦЖ. Частота *BRAF V600E* мутации составила 19/27 (70.4%) (таблица 2, 4, рисунок 13). Транслокация *RET/PTC1* была обнаружена у 1/15 пациентов, транслокация *RET/PTC3* в выборке не встречалась (рисунок 14).

В случаях Уортино-подобного варианта ПРЦЖ из базы данных TCGA было обнаружено 11/13 (84.6%) случаев, позитивных по *BRAF V600E* (таблица 2, таблица 4), и 2/13 (15.4%) случаев, имеющих мутации в гене TERT промотора. Транслокаций *RET/PTC1* и *RET/PTC3* обнаружено не было (таблица 4).

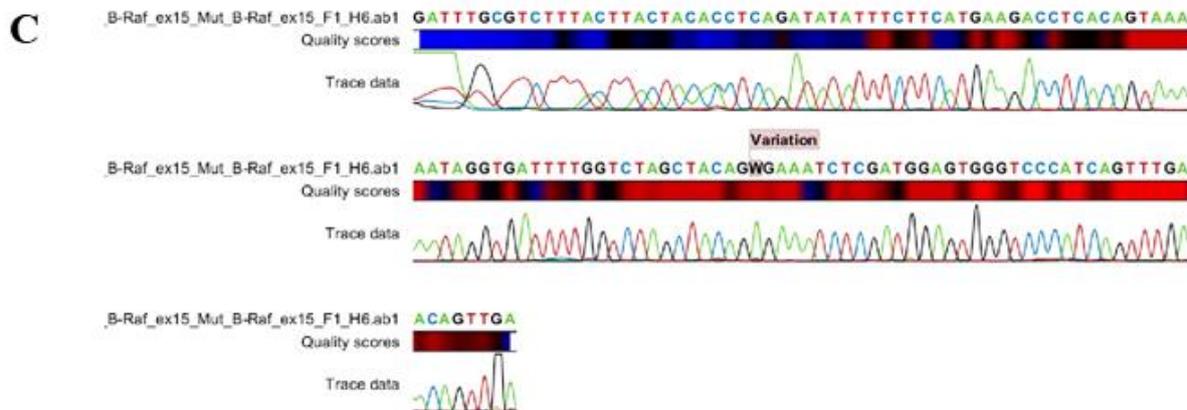
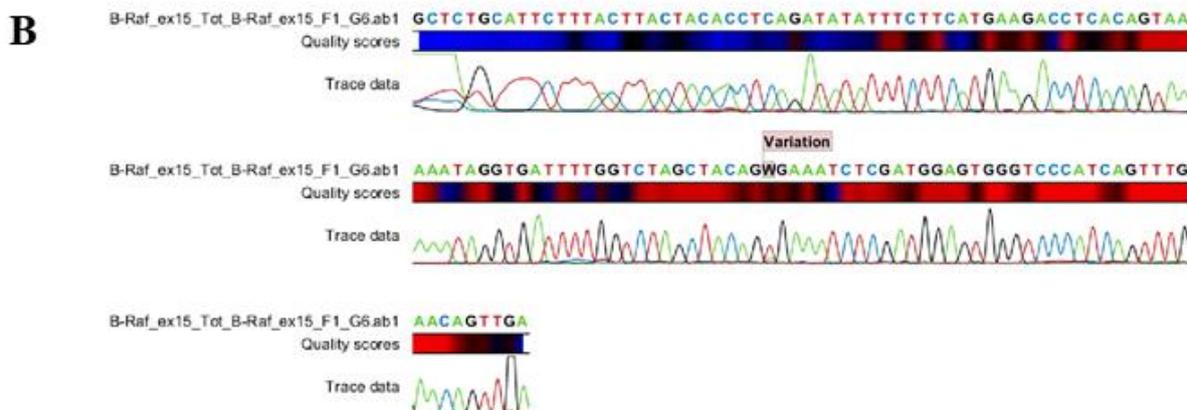
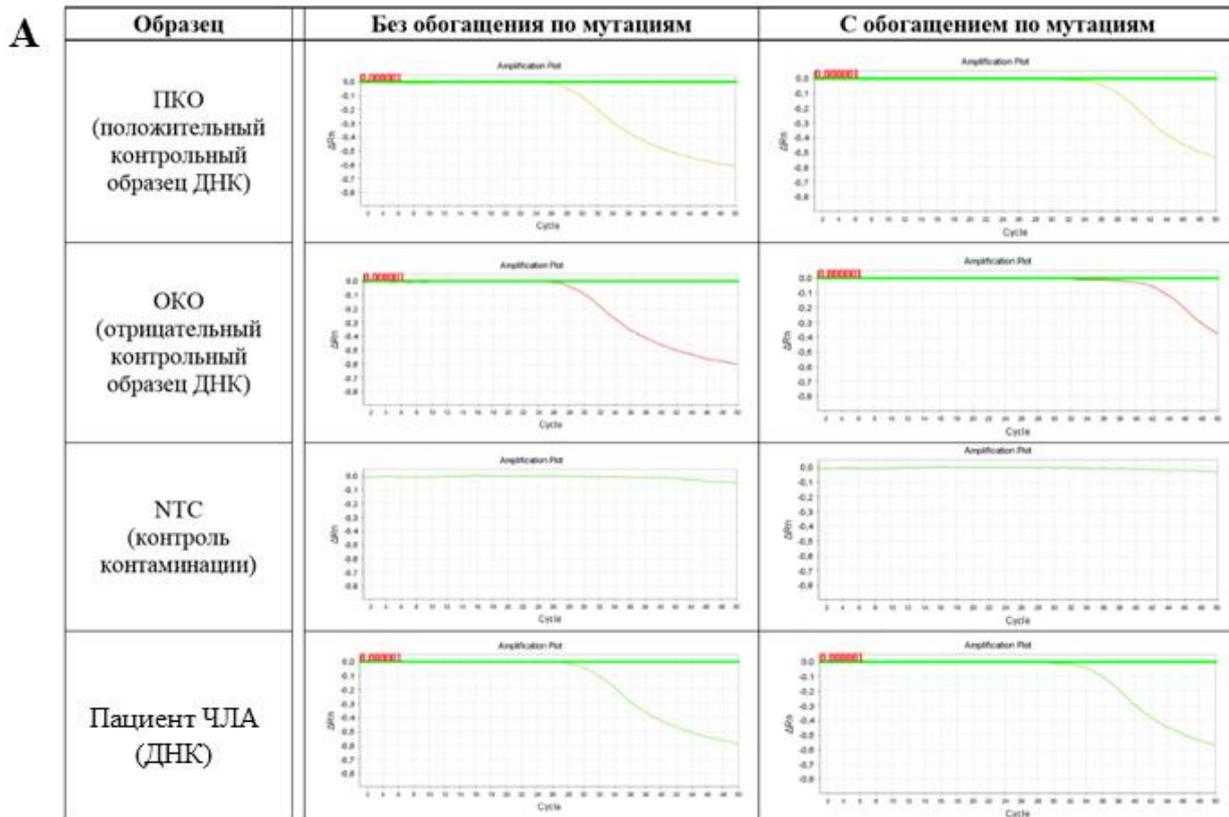


Рисунок 13. Пример мутационно-специфичной ПЦР в реальном времени (A), а также секвенирования экзона 15 гена *BRAF* (с/без обогащения по мутациям) для пациента из когорты МРНЦ (B, C).

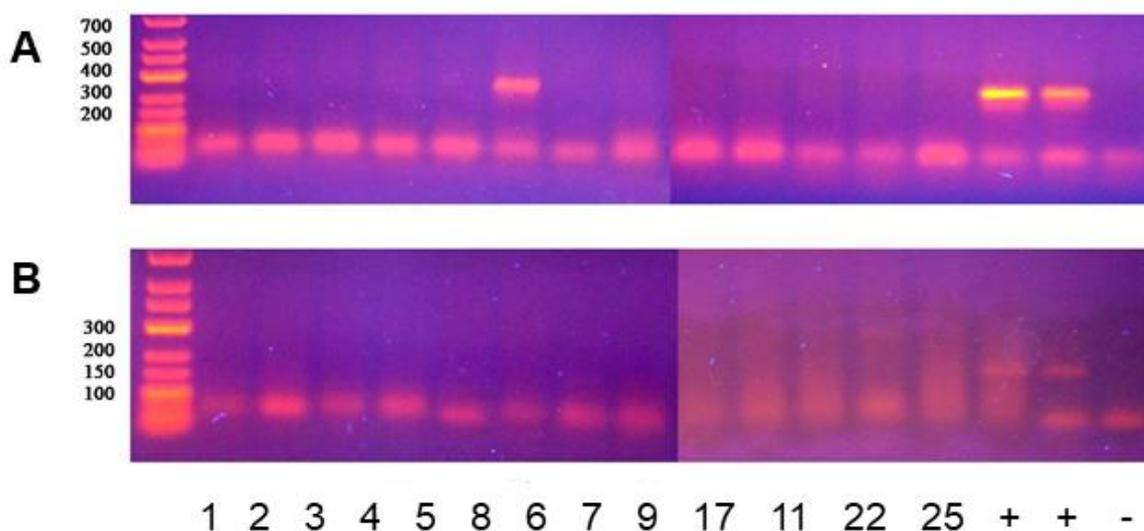


Рисунок 14. Результаты анализа проб 13 пациентов на наличие *RET/PTC1* (А) и *RET/PTC3* (В) транслокаций.

Корреляция между наличием гистологического компонента из высоких клеток и *BRAF V600E* мутацией

Нами была исследована ассоциация между гистологической картиной Уортино-подобного варианта ПРЦЖ и его мутационным профилем. Было обнаружено, что наличие *BRAF V600E* мутации в опухолевых клетках коррелирует с присутствием высококлеточного компонента. В когорте МРНЦ 8/8 (100%) пациентов с Уортино-подобным ПРЦЖ, имеющим высококлеточный компонент в более, чем 10% опухоли, были позитивны по *BRAF V600E*. В то же время в группе пациентов, опухоль которых не имела высококлеточного компонента, *BRAF V600E* мутация была обнаружена лишь у 11/19 (57.9%) пациентов. Данные различия являются статистически значимыми ($p=0.03$).

Данные по когорте TCGA в целом подтверждают эти наблюдения, однако статистически значимых различий показать не удалось. В опухолевых клетках одного из двух пациентов, не имеющих мутацию *BRAF V600E*, отсутствовал высококлеточный компонент.

Таблица 4. Мутационный профиль опухолей Уортино-подобного строения (когорты МРНЦ, TCGA).

Пациент	<i>BRAF V600E</i>	Промотор <i>TERT</i>	<i>RET/PTC1</i>	<i>RET/PTC3</i>
1	+	NA	-	-
2	+	NA	-	-
3	+	NA	-	-
4	+	NA	-	-
5	-	NA	-	-
6	+	NA	-	-
7	-	NA	-	-
8	-	NA	+	-
9	-	NA	-	-
10	+	NA	NA	NA
11	+	NA	-	-
12	+	NA	NA	NA
13	-	NA	NA	NA
14	+	NA	NA	NA
15	+	NA	NA	NA
16	+	NA	NA	NA
17	-	NA	-	-
18	+	NA	NA	NA
19	+	NA	NA	NA
20	-	NA	NA	NA
21	-	NA	NA	NA
22	+	NA	-	-
23	+	NA	NA	NA
24	+	NA	NA	NA
25	+	NA	-	-
26	+	NA	NA	NA
27	+	NA	NA	NA
TCGA-BJ-A3PR	+	-	-	-
TCGA-DJ-A3UW	+	+	-	-
TCGA-E8-A2JQ	NA	-	-	-
TCGA-E8-A419	+	-	-	-
TCGA-EL-A3CN	+	-	-	-
TCGA-EL-A4JX	+	-	-	-
TCGA-EM-A4FQ	+	-	-	-
TCGA-ET-A3BO	+	+	-	-
TCGA-ET-A3DO	+	-	-	-
TCGA-ET-A3DU	+	-	-	-
TCGA-ET-A4KN	NA	-	-	-
TCGA-FE-A23A	+	-	-	-
TCGA-IM-A3EB	+	-	-	-

В совокупной выборке частота *BRAF V600E* мутации в группе пациентов, имеющих высококлеточный компонент в более, чем 10% опухоли, составила 95%, а в группе, в которой отсутствовал компонент из высоких клеток, 62.5%. Данные различия являются статистически значимыми ($p=0.03$). Таким образом, наличие *BRAF V600E* мутации коррелирует с присутствием гистологического компонента из высоких клеток.

Сравнительный анализ мРНК и микроРНК профилей Уортино-подобного и высококлеточного вариантов ПРЦЖ (база данных TCGA)

Для изучения генетического сходства Уортино-подобного ПРЦЖ и варианта ПРЦЖ из высоких клеток нами был проведен сравнительный анализ кластеров мРНК и микроРНК соответствующих проб, согласно данным, приведенным в работе [149]. Мы сравнили данные параметры между группой из 13 пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ и 31 пациентом группы ПРЦЖ из высоких клеток (приложение 2 и 3, соответственно). Анализ показал, что значительная часть опухолей из группы высококлеточного и Уортино-подобного вариантов ПРЦЖ входит в мРНК кластер №5 (83.3% и 84.6%, соответственно) и микроРНК кластер №6 (83.9% и 100%, соответственно). Таким образом, эти два гистологических варианта ПРЦЖ генетически значительно сходны между собой.

Иммуногистохимический анализ иммунного инфильтрата Уортино-подобного ПРЦЖ

С помощью иммуногистохимического анализа нами была проведена детальная характеристика иммунного инфильтрата Уортино-подобного варианта ПРЦЖ на когорте МРНЦ, г. Обнинск. Для 9 пациентов было проведено окрашивание и подсчет содержания В- ($CD20^+CD79\alpha^+$) и Т- ($CD3^+$) лимфоцитов и плазматических клеток ($CD20^+CD79\alpha^+$) в опухолевой ткани (рисунок 15). Для дополнительной выборки из 9 пациентов был проведен качественный анализ содержания субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RO^+$), а также экспрессирующихся на Т-клетках молекул иммунологических «контрольных точек» (чекпойнтов) CTLA-4 и PD-1.

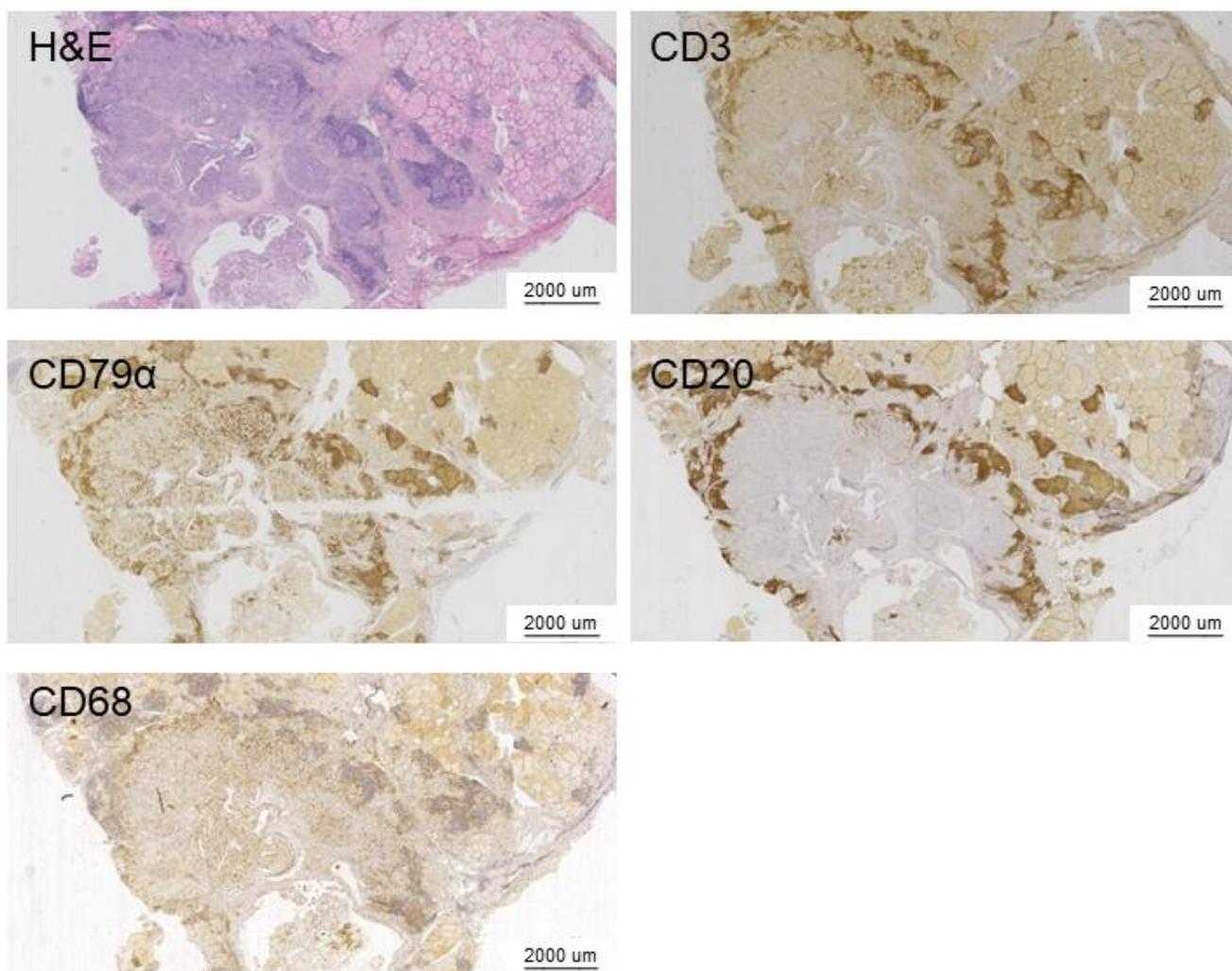


Рисунок 15. Иммуногистохимическое окрашивание срезов Уортино-подобного ПРЦЖ: окрашивание гематоксилином-эозином, CD3⁺ Т-клетки, CD79α⁺ клетки В-лимфоцитарного ряда (преимущественно плазмоциты), CD20⁺ В-клетки, CD68⁺ моноциты/макрофаги.

Наибольшее количество опухоль-инфильтрирующих иммуноцитов составляют плазматические клетки, диффузно расположенные в строме опухоли (рисунок 16). Такое же диффузное распределение характерно и для CD68⁺ моноцитов/макрофагов. Вследствие характерной морфологии подсчет данного типа клеток затруднен, однако частота их встречаемости в опухолевой ткани значительна.

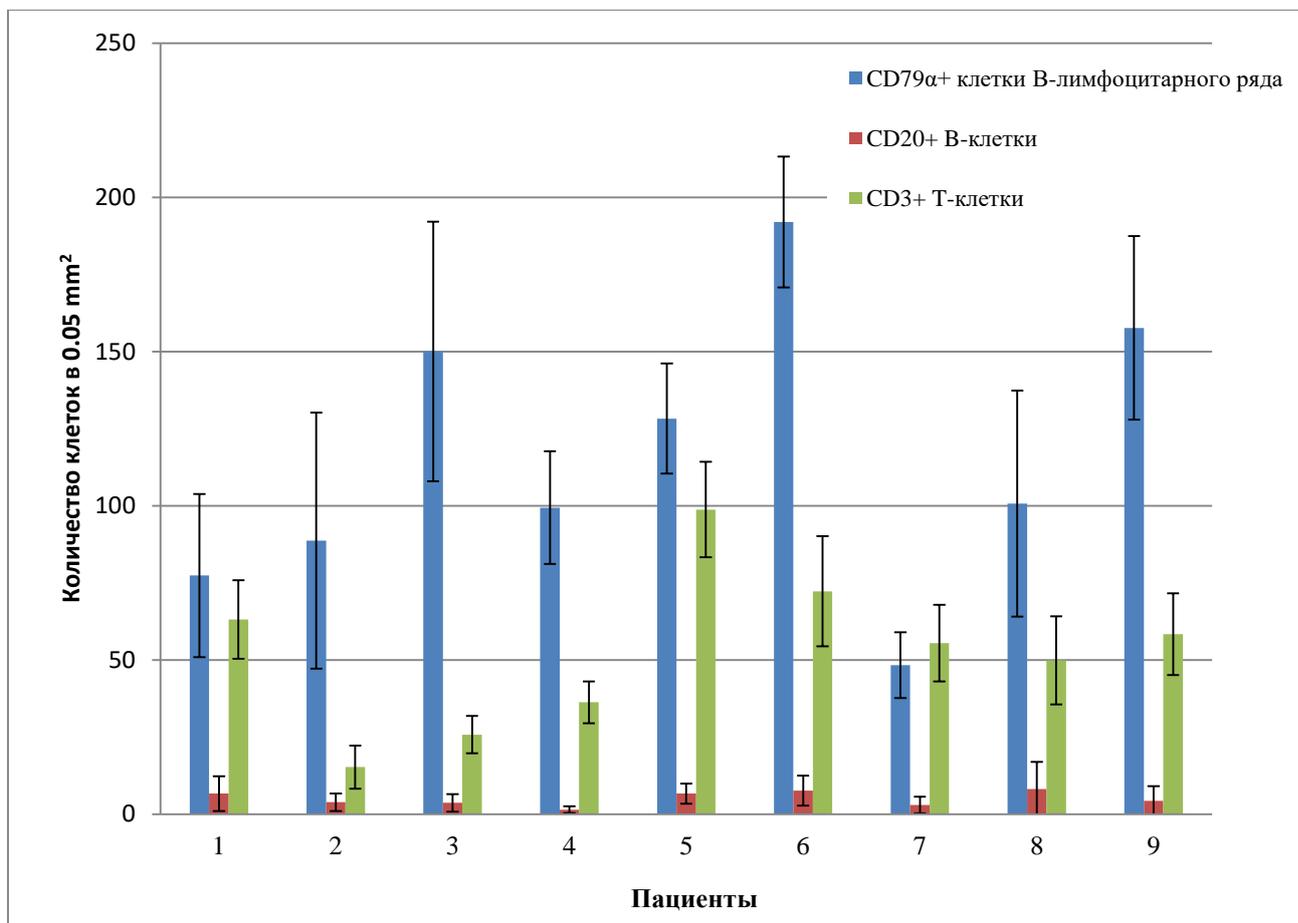


Рисунок 16. Подсчет опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток показывает, что большинство из них составляют CD79 α ⁺CD20⁻ плазматические клетки. Клетки были подсчитаны в 10 полях зрения площадью 0,05 мм².

Характер распределения Т-лимфоцитов по опухолевой строме бимодален. Так, значительное количество диффузно распределено между опухолевыми клетками, тогда как другая часть формирует тесные скопления – так называемую Т-клеточную зону третичных лимфоидных структур.

Т-лимфоциты, инфильтрирующие строму опухоли, представлены преимущественно CD8⁺ цитотоксическими Т-клетками, однако в строме опухоли также обильно представлены CD45RO⁺ и CD4⁺ Т-лимфоциты (рисунок 17).

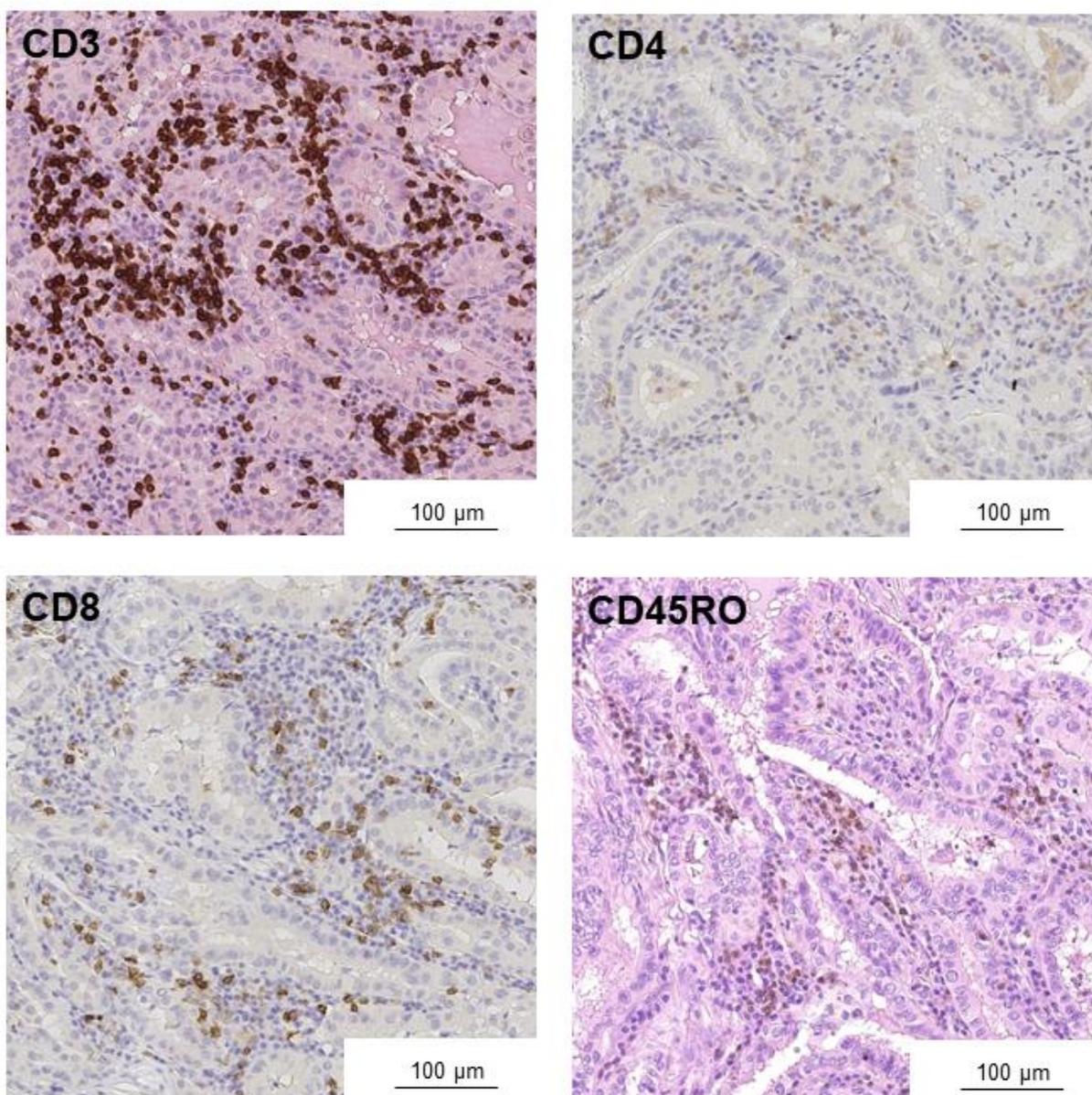


Рисунок 17. Иммуногистохимическое окрашивание срезов Уортино-подобного ПРЦЖ на CD3, CD4, CD8 и CD45RO.

Третичные лимфоидные структуры располагаются по периферии опухоли на ее инвазивной границе и состоят из Т- ($CD3^+$) и В-клеточных ($CD20^+CD79\alpha^+$) зон. В В-клеточной зоне также располагаются $CD21^+$ фолликулярные дендритные клетки (рисунки 18, 19). Основной субпопуляцией Т-лимфоцитов ТЛС являются $CD4^+$ Т-клетки, которые, по-видимому, представлены преимущественно Т-фолликулярными хелперами и фолликулярными регуляторными Т-лимфоцитами (рисунок 19). Цитотоксические Т-лимфоциты и Т-клетки памяти также присутствуют на периферии ТЛС (рисунок 19).

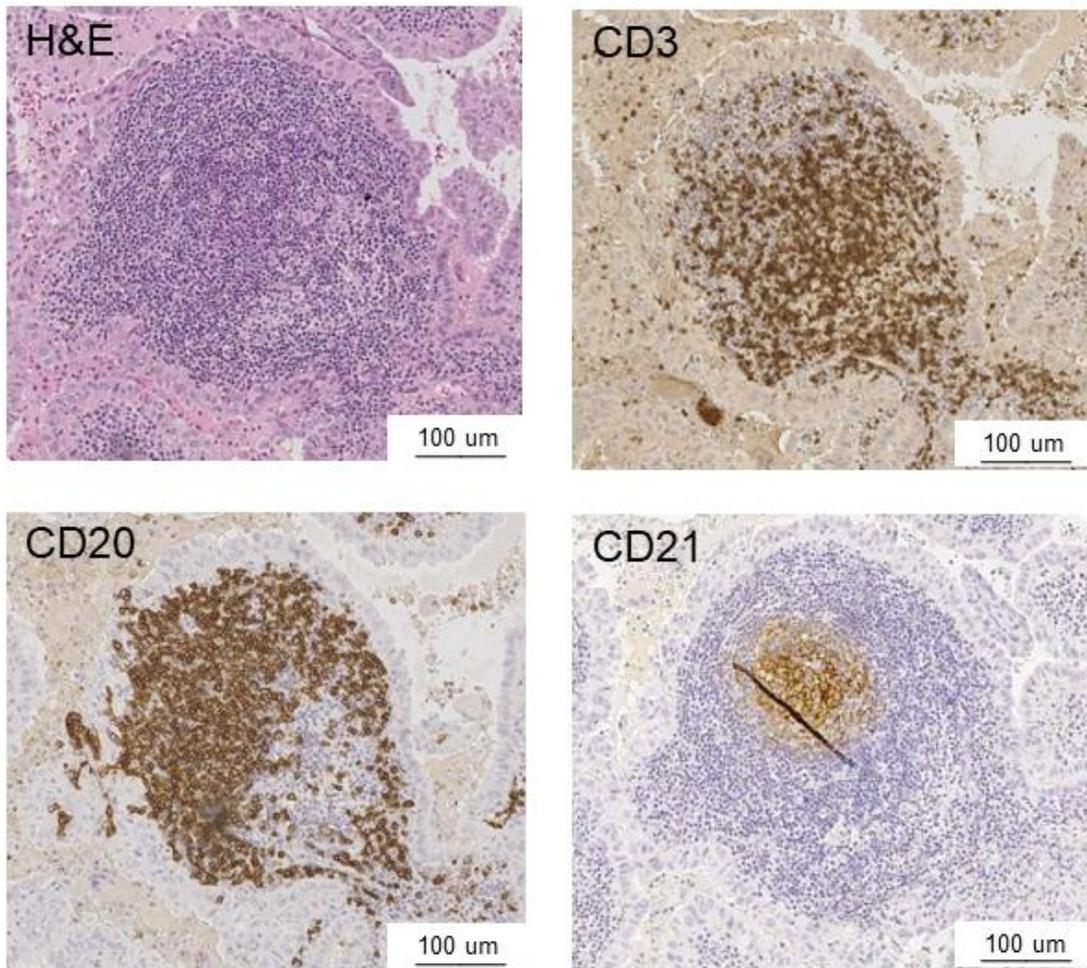


Рисунок 18. Строение третичных лимфоидных структур, выстилающих инвазивную границу опухолей Уортино-подобного строения. CD21+ фолликулярные дендритные клетки являются организующим компонентом CD3+ Т- и CD20+ В-клеточных зон третичных лимфоидных структур.

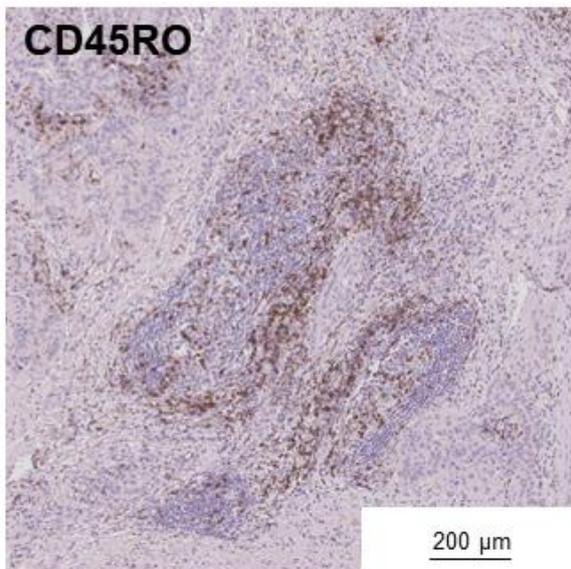
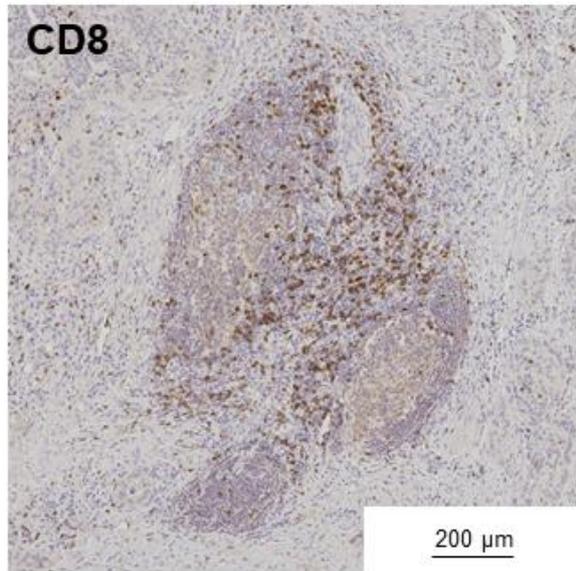
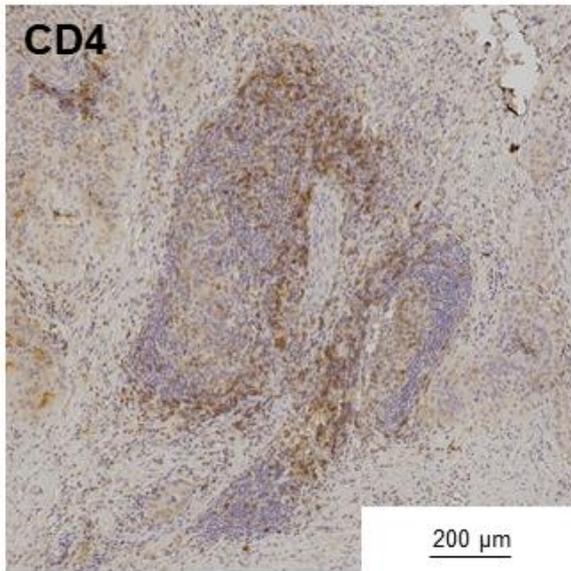
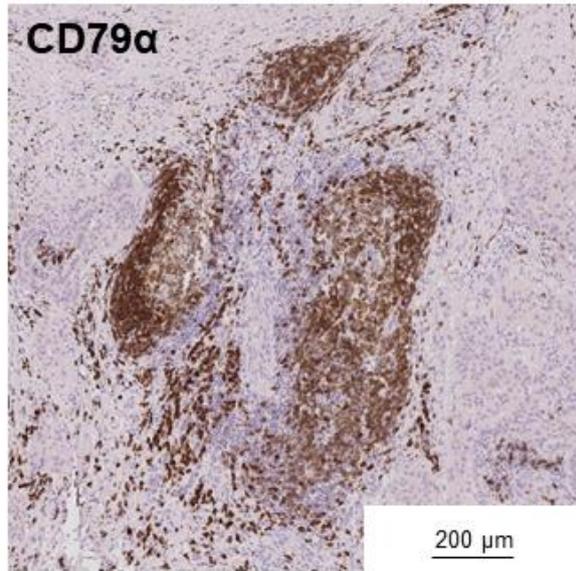
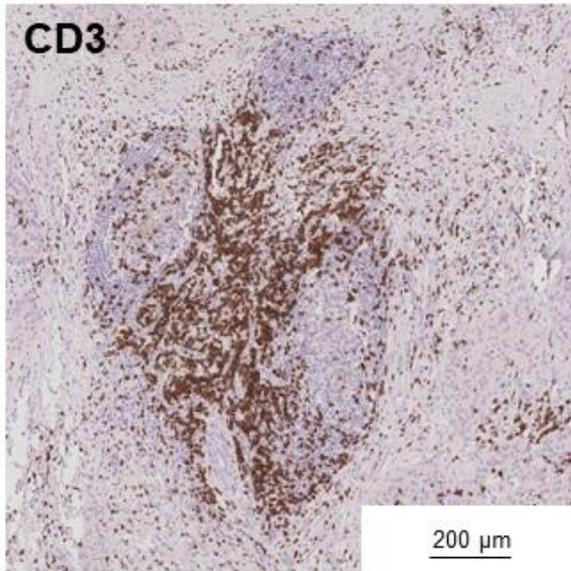


Рисунок 19. Распределение различных субпопуляций Т-лимфоцитов в третичных лимфоидных структурах Уортино-подобного варианта ПРЦЖ.

Результаты иммуногистохимического анализа показали, что экспрессия CTLA-4 и PD-1 наблюдается в Т-лимфоцитах третичных лимфоидных структур, но не в Т-клетках, инфильтрирующих строму опухоли (рисунок 20).

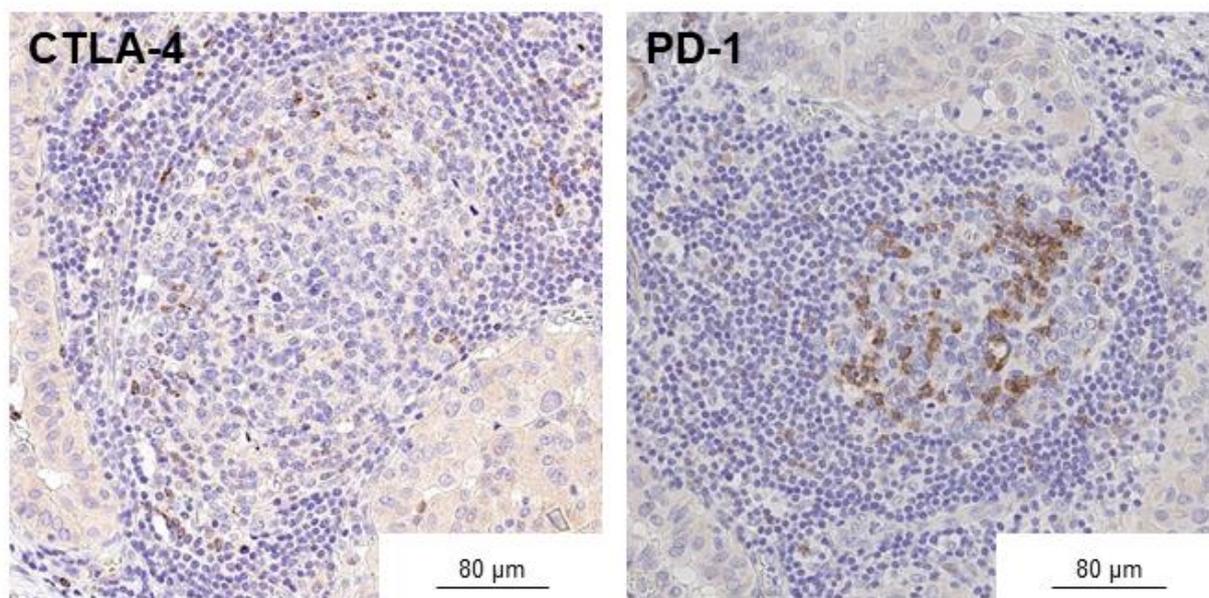


Рисунок 20. Экспрессия молекул иммунологических чекпойнтов CTLA-4 и PD-1.

***In silico* анализ иммунологического статуса опухолей Уортино-подобного строения**

Для анализа иммунного инфильтрата Уортино-подобного варианта ПРЦЖ в базе данных TCGA было идентифицировано 13 опухолей, имеющих Уортино-подобное строение. Из результатов анализа иммунома статьи Thorsson с соавт. [1] были отобраны данные для всех проб ПРЦЖ, после чего были выделены параметры, наиболее интересные для сравнения иммунного инфильтрата опухолей Уортино-подобного строения и всех остальных вариантов ПРЦЖ (рисунок 21).

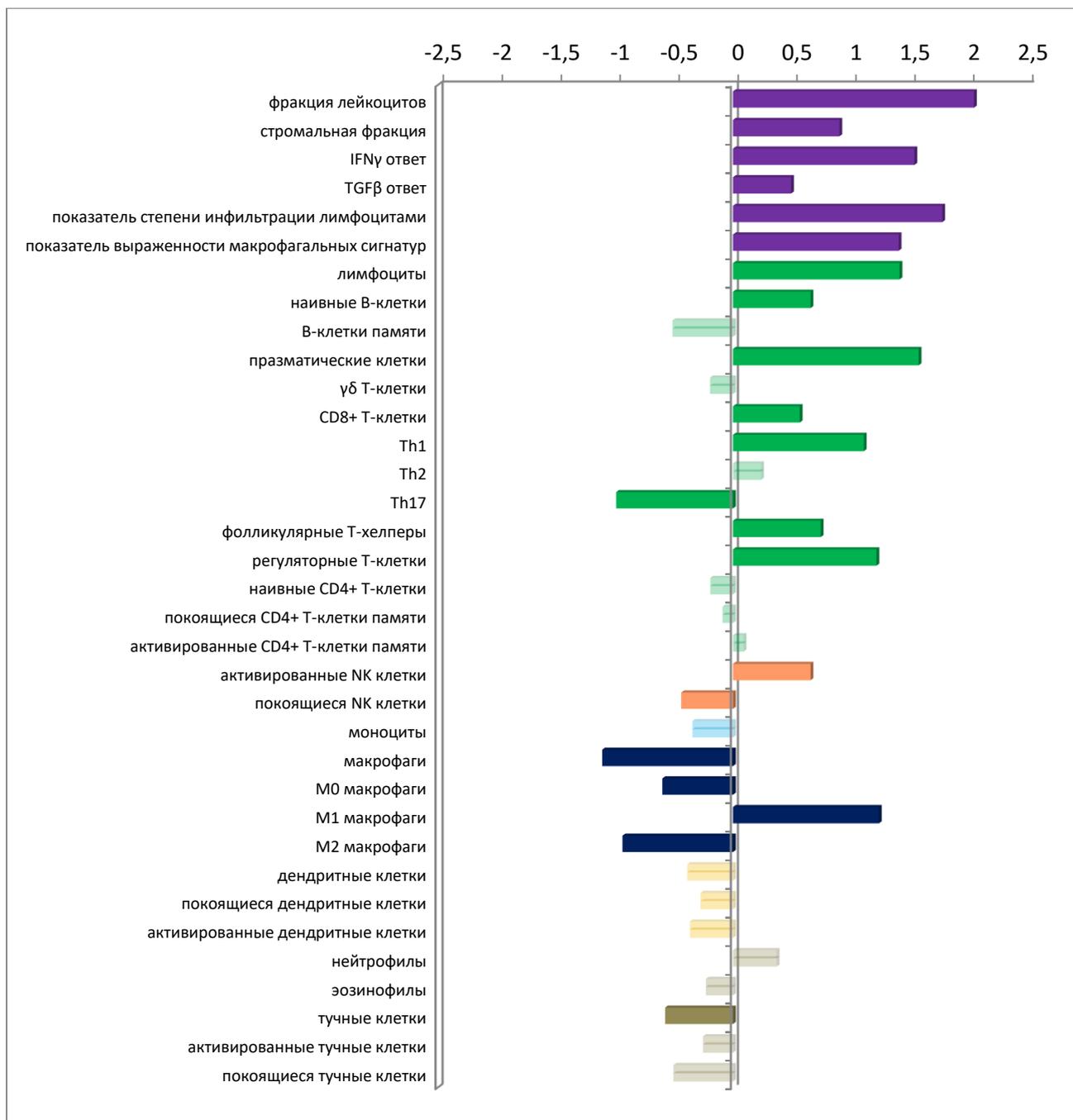


Рисунок 21. Результаты анализа размера эффекта для всех параметров, ассоциированных с иммунной инфильтрацией (индекс d – Коэна).

Для оценки интенсивности иммунного инфильтрата были взяты показатели Leukocyte Fraction (количество опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов), а также Lymphocyte Infiltration Signature Score (индекс инфильтрации лимфоцитами). Оба параметра были значительно выше в группе Уортино-подобного ПРЦЖ (среднее значение 0.37 против 0.13 и 1.7 против -0.35, соответственно; $p < 0.0001$) (рисунок 22). В соответствии с результатами иммуногистохимического анализа, значение

экспрессионных сигнатур, характеризующих фракцию плазматических клеток, значительно выше в группе Уортино-подобного ПРЦЖ (0.14 против 0.05, $p < 0.0001$) (рисунок 22).

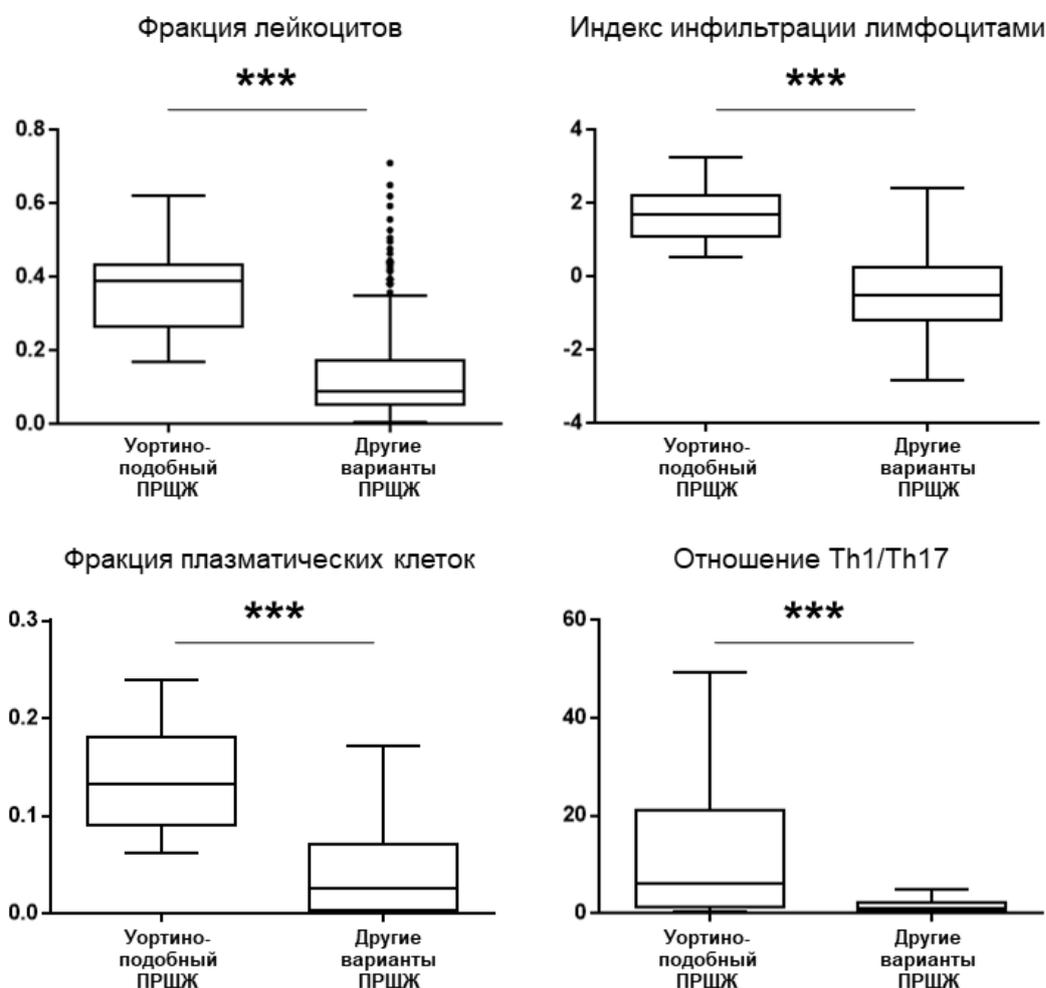


Рисунок 22. Показатели интенсивности иммунного инфильтрата, а также количество плазматических клеток и отношение Th1/Th17 в группах пациентов с Уортино-подобным вариантом и другими вариантами ПРЦЖ.

Интересно, что отношение двух субпопуляций Т-хелперов, Th1 и Th17, значительно отличалось в двух группах сравнения. Поскольку данные показатели могут принимать как отрицательные, так и положительные значения, они были переведены в формат ранговых переменных, после чего был проведен сравнительный анализ отношения Th1/Th17. В группе Уортино-подобного ПРЦЖ этот показатель был значительно выше, нежели в группе остальных ПРЦЖ (рисунок 22).

Мы сравнили этот показатель между опухолями двух иммунных типов, выделенных в публикации Thorsson с соавт. [1]: С2, в которых преобладает IFN γ -опосредованный иммунный ответ, и С3, в которых иммунный инфильтрат отличается воспалительным характером (inflammatory). Оказалось, что высокое значение показателя Th1/Th17 характерно для С2-опухолей, тогда как в опухолях С3, к которым относится большая часть проб ПРЦЖ, значение Th1/Th17 снижено. Данное наблюдение также подтверждается результатом анализа отношения Th1/Th17 в группах пациентов с опухолями молочной железы (РМЖ), принадлежащих к С2 и С3 кластеру (таблица 5).

Таблица 5. Сравнение отношения Th1/Th17 в группах опухолей, принадлежащих к С2 и С3 иммунным кластерами.

	Кластер С2; медиана (интерквартильный размах)	Кластер С3; медиана (интерквартильный размах)
все опухоли	1.44 (0.67-2.82)	0.85 (0.44-1.27)
РМЖ	1.19 (0.71-2.23)	0.54 (0.29-0.91)

Стоит отметить, что содержание опухоль-инфильтрирующих макрофагов в группе Уортино-подобного ПРЦЖ снижено (среднее значение 0.27 против 0.41, $p < 0.0001$). Кроме того, соотношение М1 и М2 макрофагов в двух группах различно: в обеих группах субпопуляция М2 макрофагов преобладает над М1, однако отношение М1 макрофагов к М2 макрофагам значительно выше в группе Уортино-подобного ПРЦЖ (среднее значение 0.36 против 0.09, $p < 0.0001$). В группе Уортино-подобного ПРЦЖ значительно выше значение показателя выраженности макрофагальных экспрессионных сигнатур (0.65 против -0.24, $p < 0.0001$) (рисунок 23).

что экспрессия (z-score) BAFF (рисунок 24, А), а также хемокинов CXCL9, CXCL10, CCL25 в группе Уортино-подобного ПРЦЖ значительно выше, нежели в группе других вариантов ПРЦЖ ($p < 0.0001$) (рисунок 24, В-Д).

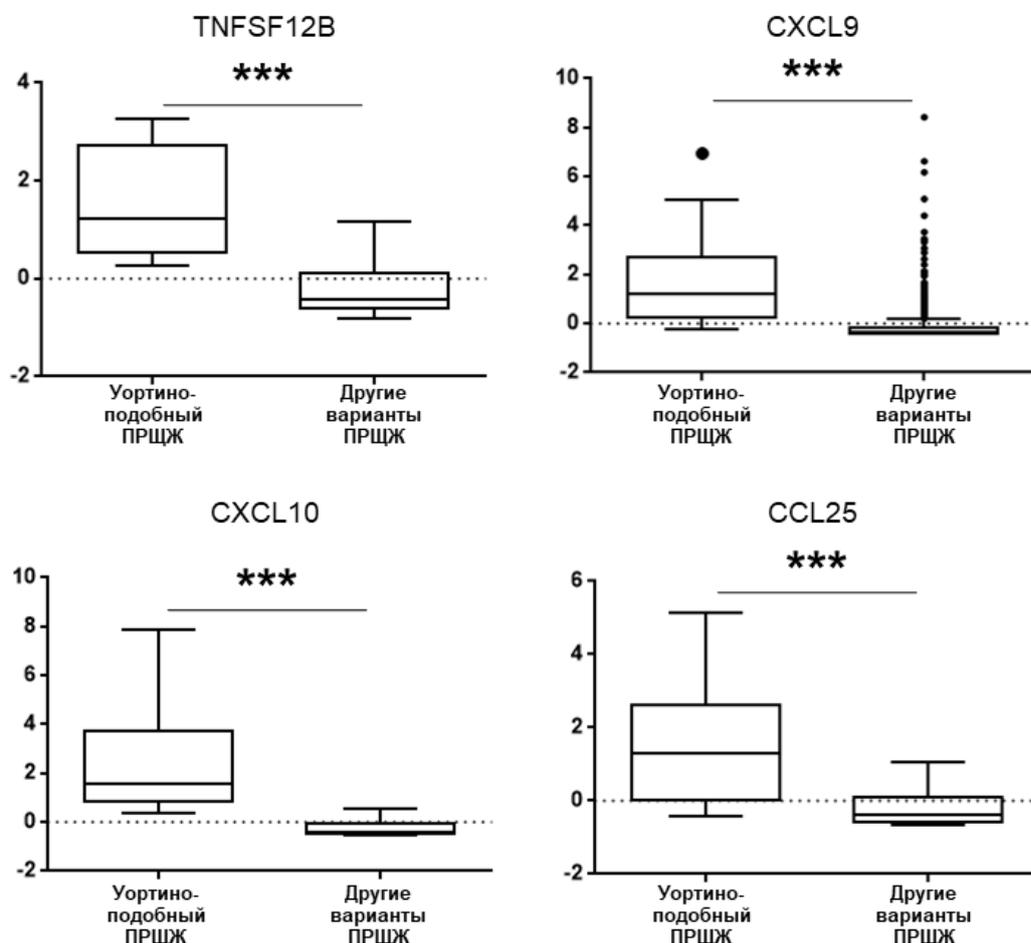


Рисунок 24. Сравнение экспрессии (z-score) цитокина BAFF (TNFSF12B) и хемокинов CXCL9, CXCL10 и CCL25 в опухолевом очаге Уортино-подобного ПРЦЖ и ПРЦЖ других гистологических вариантов (***) $p < 0.0001$).

Анализ клональности опухоль-инфильтрирующих Т- и В-лимфоцитов

Анализ клональности В- и Т-лимфоцитов был проведен с применением мультиплексной ПЦР по протоколу BIOMED-2. Клональность В-клеток оценивалась по результатам фрагментного анализа генных реаранжировок IgH (VH-JH FR1/FR2/FR3), а клональность Т-клеток – реаранжировок TCRG. Результаты показали, что и Т-, и В-лимфоциты, инфильтрирующие опухолевую ткань Уортино-подобного варианта ПРЦЖ, поликлональны (рисунок 25).

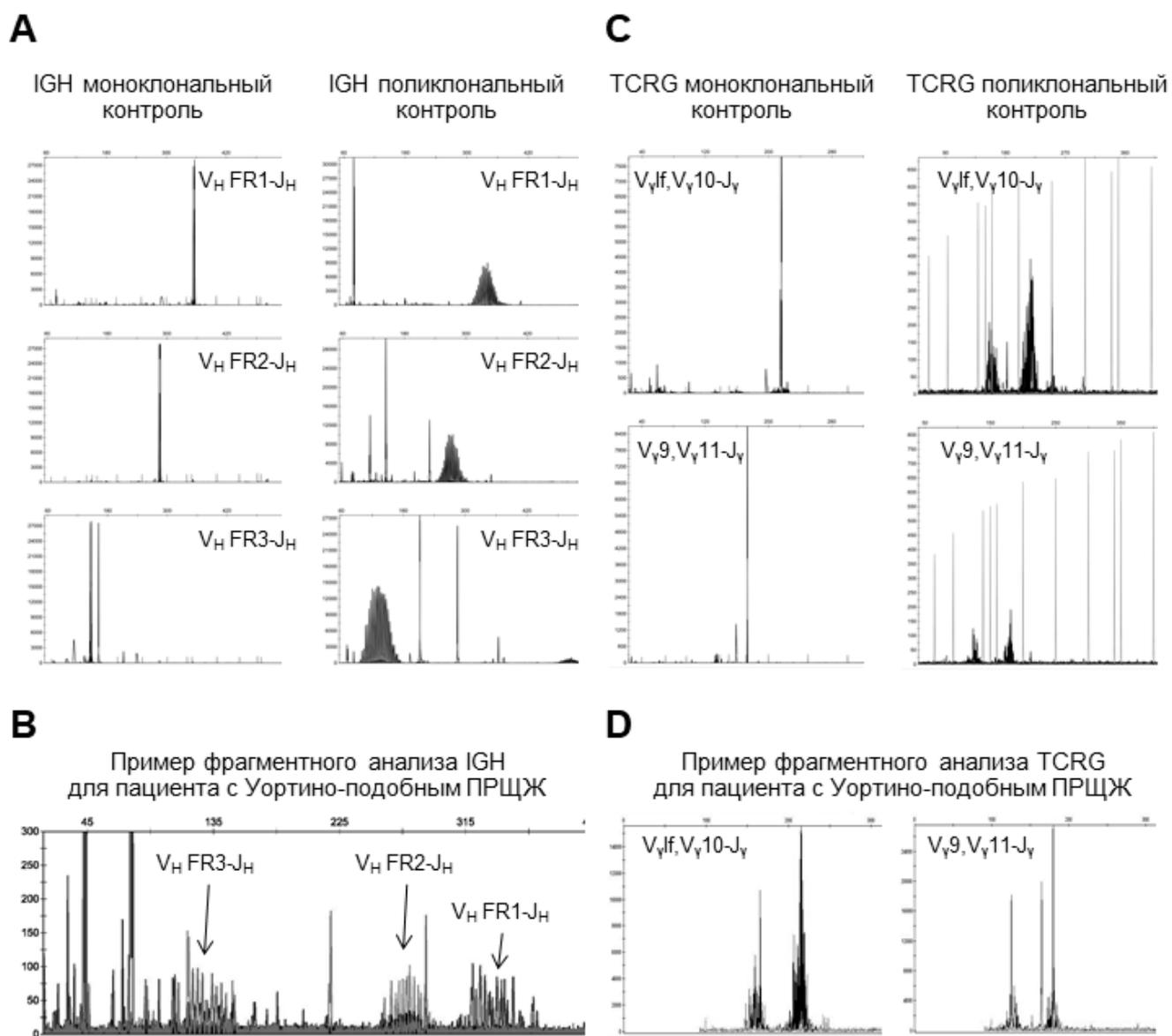


Рисунок 25. Фрагментный анализ ПЦР-продуктов реаранжировок IgH (A – моноклональный и поликлональный контроли, B – пациент 3) и TCRG (C – моноклональный и поликлональный контроли, D – пациент 3), демонстрирующий поликлональность фракций опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов Уортино-подобного варианта ПРЦЖ.

Согласно данным Thorsson с соавт. [1], популяции опухоль-инфильтрирующих T- и B-лимфоцитов поликлональны во всех случаях Уортино-подобного варианта ПРЦЖ. Несмотря на то, что обогащение BCR и TCR (показатель BCR/TCR Richness) в Уортино-подобном ПРЦЖ значительно выше, чем в остальных пробах ПРЦЖ (среднее значение 175.6 против 43.6 для BCR и

57.0 против 14.5 для TCR), их разнообразие (показатели BCR/TCR Evenness и BCR/TCR Shannon) одинаково (рисунок 26). Эти данные подтверждают результаты анализа клональности, проведенного на когорте из МРНЦ.

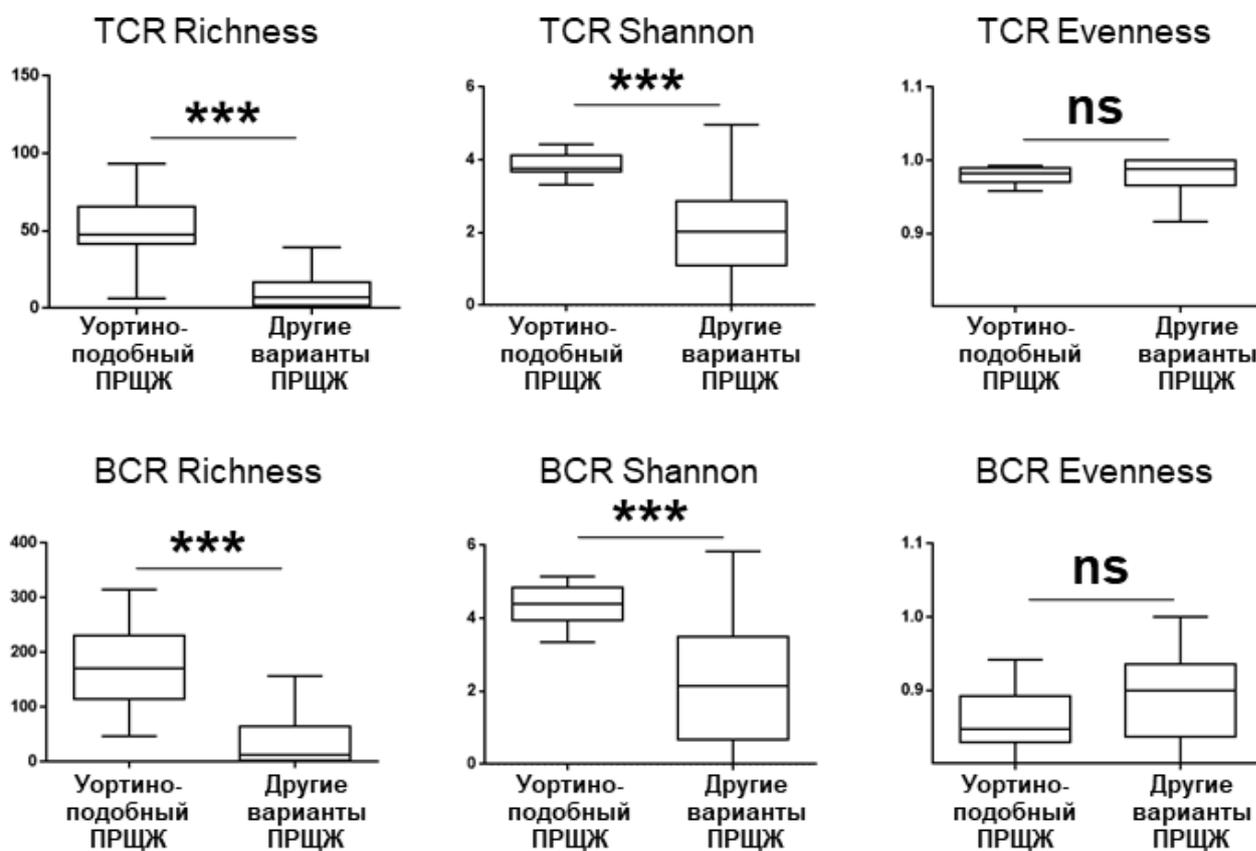


Рисунок 26. Сравнение показателей клональности опухоль-инфильтрирующих В- и Т-лимфоцитов в группах Уртино-подобного варианта ПРЩЖ и других ПРЩЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уортино-подобный вариант ПРЦЖ – редкая опухоль щитовидной железы, характеризующаяся папиллярной архитектурой, выраженной оксифилией клеток и обильной лимфоцитарной инфильтрацией стромы опухоли. Уортино-подобный вариант был впервые описан в работе Arel с соавт., в которой был проведен гистологический анализ 13 случаев ПРЦЖ, обладавших значительным лимфоцитарным инфильтратом стромы опухоли [119]. Большая часть случаев Уортино-подобного ПРЦЖ описана в формате описания отдельных случаев (максимальный объем выборки был приведен в исследовании Yeo с соавт. [158] и составил 40 случаев; как правило, количество описанных случаев не превышает 2-3). В систематическом обзоре литературы, опубликованном Kim с соавт., было отобрано 32 исследования, в включающие анализ Уортино-подобного ПРЦЖ [120]. Общее количество описанных пациентов составило 156 человек.

Однако есть основания предполагать, что данная оценка несколько занижена. Так, многие патологи напрямую не упоминают Уортино-подобный ПРЦЖ, а называют его «классическим ПРЦЖ с обильной лимфоцитарной инфильтрацией». В ходе проведенного нами анализа литературы было обнаружено 178 случаев Уортино-подобного ПРЦЖ. Тем не менее, все оценки частоты встречаемости Уортино-подобного варианта ПРЦЖ позволяют говорить о том, что данный тип опухоли действительно является редким.

Согласно систематическому обзору литературы Kim с соавт., основные клиничко-патологические характеристики Уортино-подобного варианта ПРЦЖ не отличаются от таковых у пациентов с классическим ПРЦЖ [120]. Так, возраст пациентов варьирует от 17 до 60 лет, причем большинство пациентов являются женщинами. Средний размер опухолевого очага составляет 0.5-6 см. Около 72% случаев демонстрируют наличие аутоиммунного тиреоидита в окружающей опухоль ткани щитовидной железы, а в 31% случаев обнаруживается метастатическое поражение регионарных лимфоузлов. Частота *BRAF V600E* мутаций составляет 75%, что сопоставимо с таковой при классическом ПРЦЖ.

Основные клинико-патологические характеристики выборок, отобранных для исследования (27 пациентов из МРНЦ, г. Обнинск, Россия и 13 пациентов из базы данных TCGA), не отличались от представленных в работе Kim с соавт. (см. таблицу 1). Таким образом, исследованные нами выборки являются репрезентативными для данного варианта ПРЦЖ.

Опухолевые очаги различного гистологического строения (например, классического, из высоких клеток и Уортино-подобного), согласно литературным данным, нередко колокализуются. Тем не менее, детального изучения сосуществования компонента из высоких клеток и обильной лимфоцитарной инфильтрации стромы опухоли не проводилось. В статье Ozaki с соавт. описано 13 случаев ПРЦЖ из высоких клеток, которые характеризуются обильной лимфоцитарной инфильтрацией стромы опухолей [121]. Более поздние работы говорят о том, что эти случаи следует относить именно к Уортино-подобному варианту ПРЦЖ [159].

Ввиду редкости Уортино-подобного варианта ПРЦЖ, единых диагностических критериев его определения не сформулировано. В частности, остается невыясненным, следует ли в контексте типичной для Уортино-подобного варианта гистологической картины обращать внимание на цитологические особенности опухолевых клеток, в частности, на наличие высоких клеток (рисунок 12), которые в других вариантах ПРЦЖ ассоциированы с агрессивным течением заболевания.

Среди анализируемых нами опухолей встречаются те, в которых содержание высоких клеток составляет 1-30%, а также те, которые, согласно последней классификации ВОЗ 2017 г., могут быть отнесены к гистологическому варианту ПРЦЖ из высоких клеток, поскольку количество высоких клеток составляет более 30% опухоли. Так, в когорте МРНЦ пациентов у 4/27 (14.8%) наблюдалось наличие компонента высоких клеток, занимавшего более 30% опухоли, и у 4/27 (14.8%) – 10-30% опухоли. В когорте TCGA у 2/13 (15.4%) высококлеточный компонент составил более 30% опухоли, а у 6/13 (46.2%) - 10-30% опухоли.

Статистически значимой ассоциации между наличием фокального компонента из высоких клеток и других клиничко-морфологических признаков агрессивности опухоли в когорте МРНЦ ым течением заболевания обнаружить не удалось, хотя на уровне тенденции данный эффект тем не менее прослеживался: . Тем не менее, такая тенденция наблюдается: в объединенной выборке из 15 опухолей, имевших более 10% высоких клеток, у 6 (40%) наблюдалось метастазирование в лимфоузлы, а у 5 (31%) происходило экстратиреоидное распространение опухоли. В группе Уортино-подобного ПРЦЖ без высококлеточного компонента данные параметры были равны 8/24 (33%) и 5/24 (21%), соответственно.

Частота мутации *BRAF V600E* в группе Уортино-подобного варианта ПРЦЖ достаточно высока. В работе Trovisco с соавт., была исследована частота мутации *BRAF V600E* для широкой выборки пациентов с ПРЦЖ, в том числе, для 8 пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ [139]. Частота соответствующей мутации в этом гистологическом варианте составила 75%, тогда как в классическом ПРЦЖ она была равна 46%. В анализируемых нами когортах частота мутации *BRAF V600E* была также велика и составила 70.4% и 84.6% для когорты МРНЦ и TCGA, соответственно (таблица 3, 4).

Исследования мутационного статуса варианта ПРЦЖ из высоких клеток указывают на то, что частота *BRAF V600E* мутации в этом гистологическом варианте значительно выше, чем в классическом ПРЦЖ, и составляет от 60 до 95%. Эта цифра сравнима с таковой для Уортино-подобного варианта ПРЦЖ, как в работе Trovisco с соавт., так и в анализируемых нами когортах пациентов. Также нами было показано, что в когорте МРНЦ наличие *BRAF V600E* мутации статистически значимо коррелирует с присутствием компонента из высоких клеток.

Таким образом, мы видим, что Уортино-подобный вариант ПРЦЖ часто выявляется на фоне присутствия высоких клеток, а также демонстрирует

повышенную по сравнению с классическим ПРЦЖ частоту *BRAF V600E* мутаций, сравнимую с таковой в варианте ПРЦЖ из высоких клеток.

Нами также был проведен анализ *RET/PTC1* и *RET/PTC3* транслокаций в пробах Уортино-подобного варианта ПЦЖ и обнаружен лишь один случай, в котором присутствует *RET/PTC1* транслокация (рисунок 14, таблица 4). Подобный анализ был проведен в единственной работе D'Antonio с соавт., где было проведено иммуногистохимическое окрашивание срезов антителами против ТК-домена *RET* которое показало, что 3/3 проб ПРЦЖ Уортино-подобного строения имели *RET/PTC* транслокации [160]. Тем не менее, к данным результатам следует относиться с осторожностью, поскольку окрашивание антителами нередко может давать ложноположительные результаты, требующие дополнительной проверки. Однако, релевантные контроли окрашивания в статье не приведены и, по-видимому, не были сделаны.

Для анализа молекулярного сходства Уортино-подобного варианта ПРЦЖ и варианта ПРЦЖ из высоких клеток нами был проведен анализ их мРНК и микроРНК профилей, взятых из базы данных TCGA (согласно результатам, представленным в работе Agrawal с соавт. [149]). Мы сравнили распределение проб между мРНК и микроРНК кластерами для групп из 13 пациентов с Уортино-подобным вариантом ПРЦЖ и 31 пациентом ПРЦЖ из высоких клеток (приложение 2 и 3). Анализ показал, что значительная часть опухолей из группы высококлеточного и Уортино-подобного вариантов ПРЦЖ входит в мРНК кластер №5, названный в вышепротитированной работе «высококлеточным» («tall cell-like») (83.3% и 84.6%, соответственно) и микроРНК кластер №6 (83.9% и 100%, соответственно). Таким образом, профили экспрессии двух данных вариантов ПРЦЖ в значительной степени совпадают.

Вариант ПРЦЖ из высоких клеток считается одним из агрессивных вариантов ПРЦЖ, характеризующихся повышенной частотой экстраклатреоидной инвазии и метастазирования. В свою очередь, Уортино-подобный вариант ПРЦЖ изначально считался одним из наиболее благоприятных гистологических

вариантов, однако с увеличением выборки оказалось, что прогноз для пациентов с данным вариантом ПРЦЖ не отличается от такового для классического ПРЦЖ. В то же время, полученные нами данные о частоте *BRAF V600E* мутации, присутствии фокального высококлеточного компонента, а также молекулярной картине мРНК и микроРНК профилей Уортино-подобного ПРЦЖ и варианта ПРЦЖ из высоких клеток свидетельствуют о сходстве данных типов опухолей. Таким образом, различия в прогнозе для пациента могут быть обусловлены наличием в опухолях Уортино-подобного строения обильного лимфоцитарного инфильтрата, который, вероятно, обладает протективным действием и предупреждает агрессивное распространение опухоли.

Анализ популяционного состава опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов был проведен посредством иммуногистохимического анализа девяти случаев Уортино-подобного варианта ПРЦЖ. Были визуализированы опухоль-инфильтрирующие В- ($CD20^+CD79\alpha^+$) и Т- ($CD3^+$) лимфоциты, $CD21^+$ фолликулярные дендритные клетки, а также плазматические клетки ($CD20^-CD79\alpha^+$) и $CD68^+$ моноциты/макрофаги (рисунок 15). Кроме того, для выборки из 9 пациентов был проведен качественный иммуногистохимический анализ различных субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD4^+$ Т-лимфоциты, $CD8^+$ цитотоксические Т-лимфоциты, $CD45RO^+$ Т-клетки памяти), а также молекул иммунологических чекпойнтов CTLA-4 и PD-1, экспрессирующихся на поверхности Т-клеток (рисунок 17, 19, 20).

Подобный анализ популяционного состава инфильтрирующих опухоль иммунных клеток в Уортино-подобном варианте ПРЦЖ ранее был проведен в нескольких работах. Наибольшая выборка (3 пациента) была представлена в исследовании D'Antonio с соавт., в котором иммунный инфильтрат опухолей Уортино-подобного вариант ПРЦЖ был окрашен антителами к CD3, CD4, CD8, CD79 α , CD21 [160]. Тем не менее, обсуждения взаимного расположения субпопуляций иммунных клеток, а также их количественной оценки проведено не было. Кроме того, иммуногистохимическое окрашивание иммуноцитов было

осуществлено в четырех статьях формата «описание случая» (case report), а именно в работах Urano с соавт. [161] (1 пациент, антитела против CD45RO, CD20), Vera-Sempere с соавт. [162] (1 пациент, антитела против CD45RO, CD20, CD3), Lam с соавт. [163] (1 пациент, антитела против CD3, CD20), Amico с соавт. [164] (1 пациент, антитела против CD3, CD20). Все вышеупомянутые работы говорят о наличии специфического окрашивания использованными ими антителами на маркеры лимфоцитов, однако никак его не обсуждают. Визуализация же моноцитов/макрофагов ранее не проводилась.

Мы осуществили количественный (рисунок 16) и качественный анализ популяционного состава иммунных клеток и показали, что характер инфильтрации бимодален: плазматические клетки, часть Т-лимфоцитов и моноциты/макрофаги распределены диффузно по строме опухоли, причем количество плазмоцитов значительно превосходит другие клетки. Кроме того, иммунные клетки формируют так называемые третичные лимфоидные структуры на инвазивной границе опухоли, которые включают Т- и В-клеточные зоны, а также значительное количество фолликулярных дендритных клеток (рисунок 18). В их составе практически не встречаются плазматические клетки, а также моноциты/макрофаги. Количественную оценку содержания клеток в третичных лимфоидных структурах, а также моноцитов/макрофагов провести не удалось: в первом случае клетки расположены настолько компактно, что велика вероятность их некорректного подсчета, а во втором случае множественные отростки клеток макрофагального ряда не позволяют однозначно установить их клеточную принадлежность и могут привести к некорректной оценке количества клеток как в большую, так и в меньшую сторону.

Мы показали, что Т-лимфоциты в строме опухолей преимущественно представлены CD8⁺ Т-клетками; в то же время, инфильтрация CD4⁺ Т-лимфоцитами и CD45RO⁺ Т-клетками памяти также достаточно интенсивна (рисунок 17). В составе же третичных лимфоидных структур различные субпопуляции Т-лимфоцитов распределены неравномерно: большую их часть

составляют CD4⁺ Т-лимфоциты (предположительно, Т-фолликулярные хелперы и фолликулярные регуляторные Т-лимфоциты), в то время как CD8⁺ Т-клетки и CD45RO⁺ Т-клетки памяти представлены единичными клетками на периферии ТЛС (рисунок 19). Такое соотношение клеток соответствует организации вторичных лимфоидных органов.

Нами впервые был проведен иммунологический анализ экспрессии молекул – иммунологических контрольных точек (чекпойнтов) CTLA-4 и PD-1 в Уортино-подобном варианте ПРЦЖ (рисунок 19, 20). Было показано, что эти молекулы экспрессируются Т-лимфоцитами третичных лимфоидных структур. Соответственно, молекулярный и клеточный состав третичных лимфоидных структур, выстилающих границу между опухолевой и нормальной тканью щитовидной железы, имеет много общего с таковым во вторичных лимфоидных органах.

Наличие молекул-иммунологических чекпойнтов на поверхности лимфоцитов, входящих в состав лимфоузлов и ТЛС, может служить параметром, косвенно указывающим на их функциональную активность, поскольку для адекватного прохождения процессов созревания В-лимфоцитов в лимфоузлах необходимо наличие отрицательных регуляторов иммунного ответа. Было показано, что экспрессия PD-1 в лимфоидной ткани имеет комплексный эффект [165]. С одной стороны, она ингибирует привлечение в фолликулы активированных Т-хелперов, в результате чего привлекаются Т-лимфоциты, имеющие высокий уровень экспрессии костимуляторного рецептора ICOS, который необходим для активации и функционирования Т-лимфоцитов. В то же время, экспрессия PD-1 помогает фолликулярным Т-хелперам концентрироваться в герминальных центрах В-клеточной зоны, тем самым способствуя соматическому гипермутагенезу В-лимфоцитов. Экспрессия молекул иммунологических контрольных точек может наблюдаться и на Treg, которые также присутствуют в составе ТЛС. На мышинной модели рака легкого было показано, что данные клетки вносят вклад в подавление противоопухолевого иммунного ответа [166].

Исходя из вышеперечисленного, уровень экспрессии CTLA-4 и PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов в составе ТЛС нельзя рассматривать исключительно как благоприятный прогностический признак, поскольку необходимо учитывать субпопуляционный состав экспрессирующих клеток. Тем не менее, немногочисленные работы, посвященные исследованию продукции CTLA-4 и PD-1 Т-клетками ТЛС [167], указывают на существование корреляции экспрессии данных молекул с развитием активного иммунного ответа в ТЛС.

Интенсивность иммунного инфильтрата в опухолях Уортино-подобного строения по сравнению с другими ПРЦЖ была также оценена *in silico* с использованием молекулярных сигнатур из работы Thorsson с соавт. [1]. Были отобраны данные для всех проб ПРЦЖ, после чего были выделены параметры, наиболее интересные для сравнения иммунного инфильтрата опухолей Уортино-подобного строения и всех остальных вариантов ПРЦЖ.

Для оценки интенсивности иммунного инфильтрата были взяты показатели Leukocyte Fraction (количество опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов), а также Lymphocyte Infiltration Signature Score (показатель степени инфильтрации лимфоцитами) (рисунок 22). Значения обоих параметров были значительно выше в группе Уортино-подобного варианта ПРЦЖ, что подтвердило результаты проведенных нами экспериментов по иммуногистохимической идентификации опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток. Кроме того, содержание плазматических клеток было также значительно выше в группе Уортино-подобного ПРЦЖ (рисунок 22).

Отношение двух субпопуляций Т-хелперов, Th1/Th17, используется для характеристики аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита. Было показано, что сниженные значения данного показателя, обусловленные ростом количества Th17 клеток, коррелируют с тяжестью заболевания, указывая на активацию воспалительного иммунного ответа. Уортино-подобный вариант ПРЦЖ часто сопровождается присутствием аутоиммунного тиреоидита (тиреоидита Хашимото) в ткани, окружающей опухоль. Для описания данного

заболевания отношение Th1/Th17 не используется, однако оценка уровня транскрипционных факторов этих субпопуляций показывает, что повышенная экспрессия факторов Th17 (например, ROR γ t) ассоциирована с усилением аутоиммунного ответа.

Отношение Th1/Th17 значительно отличалось в группах Уортино-подобного варианта ПРЦЖ и других ПРЦЖ. Поскольку данные показатели могут принимать как отрицательные, так и положительные значения, они были переведены в формат ранговых переменных, после чего был проведен сравнительный анализ отношения Th1/Th17. В группе Уортино-подобного ПРЦЖ этот показатель был значительно выше, нежели в группе остальных ПРЦЖ (рисунок 22).

Исходя из этих данных можно предположить, что иммунный инфильтрат опухолей Уортино-подобного строения носит опухоль-специфический характер и, соответственно, может иметь противоопухолевый потенциал, тогда как иммунный компонент опухолей других гистологических вариантов ПРЦЖ преимущественно может быть описан как воспалительный. Таким образом, иммунный инфильтрат Уортино-подобного варианта ПРЦЖ не является идентичным иммуноцитам, вовлеченным в патогенез аутоиммунного тиреоидита.

Нами была проведена оценка корректности подобной интерпретации для различных случаев опухолевого роста. Для этого были выделены все пробы опухолей различного происхождения, описанные в работе Thorsson с соавт. как относящиеся к С2 иммунологическому кластеру (данный кластер отличается преобладанием IFN γ -опосредованного иммунного ответа), а также пробы, относящиеся к С3 (воспалительному) иммунному кластеру. Для всех проб были определены показатели отношения Th1/Th17 и показано, что высокое значение показателя Th1/Th17 характерно для С2-опухолей, тогда как в опухолях С3, к которым и относится большая часть проб ПРЦЖ, значение Th1/Th17 снижено (таблица 5).

Субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих макрофагов также различается в группах Уортино-подобного ПРЦЖ и других опухолей ПРЦЖ.

Содержание макрофагов в первой группе ниже, нежели во второй, кроме того, отношение M1- к M2-макрофагам значительно выше в группе Уортино-подобного ПРЦЖ (рисунок 23). Это также указывает на потенциальный противоопухолевый эффект иммунного инфильтрата опухолей Уортино-подобного строения.

Как было сказано ранее, значительную часть иммунного инфильтрата опухолей Уортино-подобного строения составляют плазматические клетки. Для оценки экспрессии молекул, являющихся факторами выживания и привлечения плазмоцитов в опухолевой ткани, нами был проведен *in silico* анализ экспрессии хемокинов CXCL12, CXCL9, CXCL10, CCL25, CCL28, а также цитокинов BAFF (TNFSF13B) и APRIL (TNFSF13) в группах опухолей Уортино-подобного строения (13 случаев) и других вариантов ПРЦЖ (473 случая) из базы данных TCGA. Было показано, что уровень экспрессии большинства этих молекул, а именно цитокина BAFF, являющегося фактором выживания плазматических клеток, и хемокинов CXCL9, CXCL10, CCL25 значительно выше в опухолевой ткани Уортино-подобного варианта ПРЦЖ по сравнению с таковым в остальных пробах ПРЦЖ (рисунок 24).

Одной из характеристик опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов может быть наличие либо отсутствие клональности В- и Т-клеток, т.е. доминирование нескольких V(D)J-рекомбинационных событий над другими. Такая олигоклональность может быть косвенным свидетельством того, что иммунные клетки инфильтрировали опухоль по антиген-опосредованному пути и, следовательно, распознают в ней конкретные опухоль-ассоциированные антигены. Эти антигены в дальнейшем могут быть использованы для разработки персонализированных методов лечения онкологических больных.

Исследование клональности Т-клеток – сравнительно распространенная процедура, в то время как анализ клоногенного репертуара В-клеток и плазматических клеток встречается в литературе относительно редко. Во-первых, это можно объяснить, малым количеством инфильтрирующих опухоль В-лимфоцитов, а, во-вторых, сравнительно небольшим массивом данных,

указывающих на ассоциацию обилия инфильтрирующих В-клеток с прогнозом заболевания. Кроме того, немаловажной причиной является сложность секвенирования гипервариабельных участков В-клеточного рецептора, обусловленная их гипермутагенезом [168]. Тем не менее, подобный анализ, проведенный для неоплазий со значительным количеством опухоль-инфильтрирующих В-лимфоцитов, может значительно расширить наши представления о совокупности В-клеточных антигенов в опухоли.

В частности, была проведена серия работ по изучению клональности опухоль-инфильтрирующих В-клеток медуллярного рака и инфильтрирующей карциномы молочной железы. По результатам анализа библиотеки фрагментов константного участка вариабельных доменов IgG группе исследователей удалось продемонстрировать олигоклональность опухоль-инфильтрирующих плазматических клеток, а также идентифицировать их мишень – белок цитоскелета актин, фрагменты которого могут образовываться путем опухолеспецифического протеолиза при участии гранзима В и детектироваться в ткани медуллярного рака молочной железы [154]. В другом исследовании в качестве такого антигена был идентифицирован ганглиозид D3 [169].

Нами был проведен анализ клональности Т- и В-лимфоцитов, инфильтрирующих 9 случаев Уортино-подобного варианта ПРЦЖ. Для этого был использован протокол мультиплексной ПЦР BIOMED-2, созданный для оценки клональности лимфоцитов. Результаты экспериментов показали, что все проанализированные случаи имеют поликлональные популяции опухоль-инфильтрирующих Т- и В-клеток (рисунок 25).

Оценка клональности лимфоцитов была также проведена по показателям TCR/BCR Richness (уровень экспрессии рецепторов), TCR/BCR Evenness и TCR/BCR Shannon (показатели разнообразия последовательностей рецепторов), приведенным в исследовании Thorsson с соавт. [1]. Нами было проведено сравнение уровня экспрессии TCR и BCR рецепторов между группами Уортино-подобного ПРЦЖ и других ПРЦЖ и показано, что в первой группе значение

показателя TCR/BCR Richness существенно выше. Таким образом, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в строме опухолей Уортино-подобного строения значительно больше, нежели в других ПРЦЖ. В то же время, показатели разнообразия TCR и BCR не различаются между группами (рисунок 26). Это указывает на то, что популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в группе Уортино-подобного варианта ПРЦЖ поликлональны, что согласуется с приведенными ранее экспериментальными данными, полученными с использованием протокола мультиплексной ПЦР BIOMED-2.

Оценка клональности опухоль-инфильтрирующих клеток В-лимфоцитарного ряда ранее была проведена лишь для одного случая Уортино-подобного варианта ПРЦЖ в статье Vera-Sempere с соавт. В данной публикации было осуществлено иммуногистохимическое окрашивание на легкие цепи иммуноглобулинов, а также было продемонстрировано, что их репертуар поликлонален [162].

Совокупность представленных данных о вовлечении опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в противоопухолевый иммунный ответ позволяет предполагать, что инфильтрация стромы опухоли Уортино-подобного варианта ПРЦЖ носит специфический характер, однако иммунный ответ направлен на значительное количество опухолевых антигенов, а не на одну или несколько мишеней.

ВЫВОДЫ

1. Уортино-подобный вариант ПРЦЖ и вариант ПРЦЖ из высоких клеток, которые значительно различаются с точки зрения клинического течения и прогноза для пациента, морфологически близки друг другу; компонент из высоких клеток встречается в более 30% случаев Уортино-подобного варианта ПРЦЖ.

2. Молекулярно-генетические параметры Уортино-подобного варианта ПРЦЖ, такие как частота мутаций в генах BRAF и TERT, а также профили экспрессии мРНК и микроРНК, близки к таковым у ПРЦЖ из высоких клеток.

3. Детальная характеристика иммунного инфильтрата Уортино-подобного варианта ПРЦЖ показала диффузное распределение иммуноцитов по строме опухоли с образованием третичных лимфоидных структур. Внутриопухолевые иммунные клетки представлены преимущественно плазмочитами. Данные *in silico* анализа продемонстрировали сверхэкспрессию факторов выживания и привлечения плазмочитов в группе Уортино-подобного ПРЦЖ по сравнению с другими ПРЦЖ.

4. Субпопуляции опухоль-инфильтрирующих Т- и В-лимфоцитов поликлональны, что характерно для иммунного ответа на широкий спектр антигенов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить огромную благодарность моему научному руководителю, Дмитрию Владимировичу Купрашу, за чуткое руководство, помощь в осмыслении и анализе полученных данных и подогревание интереса к теме онкоиммунологии. Кроме того, хочу выразить признательность заведующему кафедрой иммунологии Сергею Артуровичу Недоспасову, который интересовался данной работой и давал ценные советы по ходу ее реализации.

Хочу также поблагодарить всех сотрудников лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, а также лаборатории молекулярной иммунологии ИМБ РАН за помощь в подготовке экспериментов и интересные научные дискуссии, в частности, Алису Муратову за критическое чтение текста диссертации. Хочу отдельно поблагодарить Павла Владимировича Белоусова за неоценимую помощь в планировании экспериментов, в том числе *in silico* анализа, и обсуждении результатов.

Отдельную благодарность выражаю сотрудникам Эндокринологического научного центра (г. Москва), в частности, Александру Юрьевичу Абросимову и Лилии Сергеевне Селивановой, а также коллективу Медико-радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба (г. Обнинск) за помощь в сборе и анализе гистологического материала. Хочу также поблагодарить Светлану Юрьевну Смирнову за помощь в реализации экспериментов по анализу клональности опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов.

Глубочайшую благодарность выражаю Александру Александровичу Ярилину за интереснейшие лекции по иммунологии, которые позволили нам, его студентам, полюбить эту науку.

Огромное спасибо моим многочисленным родственникам за поддержку и помощь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] V. Thorsson *et al.*, “The Immune Landscape of Cancer.,” *Immunity*, vol. 48, no. 4, pp. 812-830.e14, Apr. 2018.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer.,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [3] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation.,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–74, Mar. 2011.
- [4] M. A. Lemmon and J. Schlessinger, “Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases,” *Cell*, vol. 141, no. 7, pp. 1117–1134, Jun. 2010.
- [5] R. Perona, “Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors.,” *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 8, no. 2, pp. 77–82, Feb. 2006.
- [6] E. Witsch, M. Sela, and Y. Yarden, “Roles for Growth Factors in Cancer Progression,” *Physiology*, vol. 25, no. 2, pp. 85–101, Apr. 2010.
- [7] I. Amit *et al.*, “A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling,” *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 4, pp. 503–512, Apr. 2007.
- [8] J. Plati, O. Bucur, and R. Khosravi-Far, “Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 104, no. 4, pp. 1124–49, Jul. 2008.
- [9] S. W. Lowe, E. Cepero, and G. Evan, “Intrinsic tumour suppression,” *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 307–315, Nov. 2004.
- [10] B. Jiang and L. Liu, “Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis,” in *Advances in cancer research*, vol. 102, 2009, pp. 19–65.
- [11] U. Cavallaro and G. Christofori, “Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 2, pp. 118–132, Feb. 2004.
- [12] D. S. Micalizzi, S. M. Farabaugh, and H. L. Ford, “Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 15, no. 2, pp. 117–134, Jun.

2010.

- [13] H. Peinado *et al.*, “Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 5, pp. 302–317, Mar. 2017.
- [14] M. A. Blasco, “Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 8, pp. 611–622, Aug. 2005.
- [15] J.-I. Park *et al.*, “Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin,” *Nature*, vol. 460, no. 7251, pp. 66–72, Jul. 2009.
- [16] Y. Maida *et al.*, “An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA,” *Nature*, vol. 461, no. 7261, pp. 230–235, Sep. 2009.
- [17] V. Baeriswyl and G. Christofori, “The angiogenic switch in carcinogenesis,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 329–337, Oct. 2009.
- [18] D. M. McDonald, “Angiogenesis and Vascular Remodeling in Inflammation and Cancer: Biology and Architecture of the Vasculature,” in *Angiogenesis*, Boston, MA: Springer US, 2008, pp. 17–33.
- [19] J. M. Adams and S. Cory, “The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy,” *Oncogene*, vol. 26, no. 9, pp. 1324–1337, Feb. 2007.
- [20] A. Letai, “Apoptosis and Cancer,” *Annu. Rev. Cancer Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 275–294, Mar. 2017.
- [21] E. White, “The role for autophagy in cancer,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 1, pp. 42–46, Jan. 2015.
- [22] S. Y. Lee *et al.*, “Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, pp. 1–28, Jan. 2018.
- [23] O. Warburg, *The metabolism of tumours*. London: Constable, 1930.
- [24] G. L. Semenza, “Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate,” *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 12, pp. 3835–7, Nov. 2008.
- [25] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson, “The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation,” *Cell*

- Metab.*, vol. 7, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2008.
- [26] O. Feron, “Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells,” *Radiother. Oncol.*, vol. 92, no. 3, pp. 329–333, Sep. 2009.
- [27] K. W. Kinzler and B. Vogelstein, “Gatekeepers and caretakers,” *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 761–763, Apr. 1997.
- [28] T. Bondar and R. Medzhitov, “The origins of tumor-promoting inflammation,” *Cancer Cell*, vol. 24, no. 2, pp. 143–4, Aug. 2013.
- [29] W. H. Fridman *et al.*, “Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 344, pp. 1–24, 2011.
- [30] R. D. Schreiber, L. J. Old, and M. J. Smyth, “Cancer immunoediting: integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion,” *Science*, vol. 331, no. 6024, pp. 1565–70, Mar. 2011.
- [31] G. Schiavoni, L. Gabriele, and F. Mattei, “The tumor microenvironment: a pitch for multiple players,” *Front. Oncol.*, vol. 3, p. 90, Jan. 2013.
- [32] N.-B. Hao, M.-H. Lü, Y.-H. Fan, Y.-L. Cao, Z.-R. Zhang, and S.-M. Yang, “Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, p. 948098, Jan. 2012.
- [33] S. Edin, M. L. Wikberg, P.-A. Oldenborg, and R. Palmqvist, “Macrophages: Good guys in colorectal cancer,” *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 2, p. e23038, Feb. 2013.
- [34] F. O. Martinez, L. Helming, and S. Gordon, “Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 451–83, Jan. 2009.
- [35] G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena, “Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 86, no. 5, pp. 1065–73, Nov. 2009.
- [36] I. Daurkin *et al.*, “Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in

- the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway.,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 20, pp. 6400–9, Oct. 2011.
- [37] P. Chen *et al.*, “Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 23, pp. 7230–9, Dec. 2011.
- [38] J. Liu *et al.*, “Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 4, p. e19495, Jan. 2011.
- [39] Q. Zhang *et al.*, “Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e50946, Jan. 2012.
- [40] H. J. M. A. A. Zijlmans, G. J. Fleuren, H. J. Baelde, P. H. C. Eilers, G. G. Kenter, and A. Gorter, “The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2.,” *J. Pathol.*, vol. 208, no. 4, pp. 507–17, Mar. 2006.
- [41] V. H. Koelzer *et al.*, “Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome,” *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 4, p. e1106677, Apr. 2016.
- [42] S. Edin *et al.*, “The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47045, 2012.
- [43] M. Zhang *et al.*, “A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients.,” *J. Ovarian Res.*, vol. 7, p. 19, 2014.
- [44] O. Preynat-Seauve, E. Contassot, P. Schuler, L. E. French, and B. Huard, “Melanoma-infiltrating dendritic cells induce protective antitumor responses mediated by T cells.,” *Melanoma Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 169–76, Jun. 2007.
- [45] G. Gerlini, P. Di Gennaro, and L. Borgognoni, “Enhancing anti-melanoma

- immunity by electrochemotherapy and in vivo dendritic-cell activation.,” *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 9, pp. 1655–1657, Dec. 2012.
- [46] A. J. Michielsen *et al.*, “Inhibition of dendritic cell maturation by the tumor microenvironment correlates with the survival of colorectal cancer patients following bevacizumab treatment.,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 8, pp. 1829–37, Aug. 2012.
- [47] H. Yu *et al.*, “Regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells contribute to the immune escape of papillary thyroid cancer coexisting with multinodular non-toxic goiter.,” *Endocrine*, vol. 44, no. 1, pp. 172–81, Aug. 2013.
- [48] W. T. Scouten and G. L. Francis, “Thyroid cancer and the immune system: a model for effective immune surveillance,” *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, vol. 1, no. 3, pp. 353–366, Jan. 2014.
- [49] I. Perrot *et al.*, “Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage.,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 5, pp. 2763–9, Mar. 2007.
- [50] D. Marvel and D. I. Gabrilovich, “Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 9, pp. 3356–64, Sep. 2015.
- [51] E. B. Eruslanov *et al.*, “Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 12, pp. 5466–80, Dec. 2014.
- [52] S. Solito, I. Marigo, L. Pinton, V. Damuzzo, S. Mandruzzato, and V. Bronte, “Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1319, pp. 47–65, Jun. 2014.
- [53] L. Senovilla *et al.*, “Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer.,” *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 8, pp. 1323–1343, Nov. 2012.
- [54] M. D. Vesely, M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, “Natural innate and adaptive immunity to cancer.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 235–71, Jan. 2011.

- [55] K. Sakuishi, L. Apetoh, J. M. Sullivan, B. R. Blazar, V. K. Kuchroo, and A. C. Anderson, “Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity.,” *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 10, pp. 2187–94, Sep. 2010.
- [56] H. J. Park *et al.*, “Tumor-infiltrating regulatory T cells delineated by upregulation of PD-1 and inhibitory receptors.,” *Cell. Immunol.*, vol. 278, no. 1–2, pp. 76–83, Jan. .
- [57] Y. Wang *et al.*, “Regulatory T cell: a protection for tumour cells.,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 425–36, Mar. 2012.
- [58] W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sautès-Fridman, and J. Galon, “The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 298–306, Apr. 2012.
- [59] C. Badoual *et al.*, “PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer.,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 1, pp. 128–38, Jan. 2013.
- [60] C. Badoual, S. Hans, W. H. Fridman, D. Brasnu, S. Erdman, and E. Tartour, “Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 19, pp. e5-6; author reply e7, Jul. 2009.
- [61] A. Hamai *et al.*, “Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune?,” *Tissue Antigens*, vol. 75, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2010.
- [62] S. Hadrup, M. Donia, and P. Thor Straten, “Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment.,” *Cancer Microenviron.*, vol. 6, no. 2, pp. 123–33, Aug. 2013.
- [63] C. Gu-Trantien *et al.*, “CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 7, pp. 2873–2892, Jul. 2013.
- [64] C. Germain, S. Gnjatic, and M.-C. Dieu-Nosjean, “Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity,” *Front. Immunol.*,

- vol. 6, p. 67, Feb. 2015.
- [65] K. E. de Visser, L. V Korets, and L. M. Coussens, “De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent.,” *Cancer Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 411–23, May 2005.
- [66] D. G. DeNardo, P. Andreu, and L. M. Coussens, “Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity.,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 2, pp. 309–16, Jun. 2010.
- [67] P. B. Olkhanud *et al.*, “Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells.,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 10, pp. 3505–15, May 2011.
- [68] M. Horikawa, V. Minard-Colin, T. Matsushita, and T. F. Tedder, “Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 11, pp. 4268–80, Nov. 2011.
- [69] A. Cipponi *et al.*, “Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases.,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 16, pp. 3997–4007, Aug. 2012.
- [70] C. M. Coughlin, B. A. Vance, S. A. Grupp, and R. H. Vonderheide, “RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy.,” *Blood*, vol. 103, no. 6, pp. 2046–54, Mar. 2004.
- [71] F. Ronchese and B. Hausmann, “B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes.,” *J. Exp. Med.*, vol. 177, no. 3, pp. 679–90, Mar. 1993.
- [72] M.-C. Dieu-Nosjean *et al.*, “Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 27, pp. 4410–4417, Sep. 2008.
- [73] C. Germain *et al.*, “Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer.,” *Am. J. Respir. Crit. Care*

- Med.*, vol. 189, no. 7, pp. 832–844, Apr. 2014.
- [74] M. Miyasaka and T. Tanaka, “Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 5, pp. 360–70, May 2004.
- [75] M.-C. Dieu-Nosjean, N. A. Giraldo, H. Kaplon, C. Germain, W. H. Fridman, and C. Sautès-Fridman, “Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers.,” *Immunol. Rev.*, vol. 271, no. 1, pp. 260–275, May 2016.
- [76] S. Coca *et al.*, “The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma.,” *Cancer*, vol. 79, no. 12, pp. 2320–8, Jun. 1997.
- [77] F. R. Villegas *et al.*, “Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer.,” *Lung Cancer*, vol. 35, no. 1, pp. 23–8, Jan. 2002.
- [78] H. Zhang and J. Chen, “Current status and future directions of cancer immunotherapy.,” *J. Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 1773–1781, 2018.
- [79] C. Salmaso, D. Olive, G. Pesce, and M. Bagnasco, “Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases.,” *Autoimmunity*, vol. 35, no. 3, pp. 159–67, May 2002.
- [80] R. B. Herberman, “Cancer immunotherapy with natural killer cells.,” *Semin. Oncol.*, vol. 29, no. 3 Suppl 7, pp. 27–30, Jun. 2002.
- [81] S. Bauer *et al.*, “Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.,” *Science*, vol. 285, no. 5428, pp. 727–9, Jul. 1999.
- [82] P. Carrega *et al.*, “NCR(+)ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures.,” *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 8280, Jan. 2015.
- [83] J. Eckl *et al.*, “Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging,” *J. Mol. Med.*, vol. 90, no. 1, pp. 55–66, Jan. 2012.

- [84] N. Halama *et al.*, “Natural Killer Cells are Scarce in Colorectal Carcinoma Tissue Despite High Levels of Chemokines and Cytokines,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 678–689, Feb. 2011.
- [85] A. J. Smith, J. Oertle, and D. Prato, “Autologous Natural Killer Cell/Natural Killer T Cell Immunotherapy of Malignant Diseases,” *Open J. Med. Microbiol.*, vol. 4, pp. 192–202, 2014.
- [86] E. Alici, “IPH-2101, a fully human anti-NK-cell inhibitory receptor mAb for the potential treatment of hematological cancers,” *Curr. Opin. Mol. Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 724–33, Dec. 2010.
- [87] F. Romagné *et al.*, “Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells,” *Blood*, vol. 114, no. 13, pp. 2667–77, Sep. 2009.
- [88] E. Vivier and S. Ugolini, “Natural killer cells: from basic research to treatments,” *Front. Immunol.*, vol. 2, p. 18, 2011.
- [89] T. Tachibana *et al.*, “Increased Intratumor V γ 24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 20, pp. 7322–7327, Oct. 2005.
- [90] I. M. Werter, F. L. Schneiders, E. Scotet, H. M. W. Verheul, T. D. de Gruijl, and H. J. van der Vliet, “V γ 9V δ 2-T cells as antigen presenting cells for iNKT cell based cancer immunotherapy,” *Oncoimmunology*, vol. 3, no. 9, p. e955343, Oct. 2014.
- [91] O. Milstein *et al.*, “CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition,” *Blood*, vol. 117, no. 3, pp. 1042–1052, Jan. 2011.
- [92] G. Rahir and M. Moser, “Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 61, no. 6, pp. 751–759, Jun. 2012.
- [93] D. Lindau, P. Gielen, M. Kroesen, P. Wesseling, and G. J. Adema, “The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells,” *Immunology*, vol. 138, no. 2, pp. 105–115, Feb.

2013.

- [94] R. Houot, L. M. Schultz, A. Marabelle, and H. Kohrt, “T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 3, no. 10, pp. 1115–1122, Oct. 2015.
- [95] F. Li, T. Zhang, L. Cao, and Y. Zhang, “Chimeric Antigen Receptor T Cell Based Immunotherapy for Cancer,” *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 13, no. 5, pp. 327–335, May 2018.
- [96] J. T. Pento, “Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 5935–5939, Nov. 2017.
- [97] E. Dahlén, N. Veitonmäki, and P. Norlén, “Bispecific antibodies in cancer immunotherapy,” *Ther. Adv. Vaccines Immunother.*, vol. 6, no. 1, p. 3, 2018.
- [98] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, and N. Corvaia, “Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 345–352, May 2010.
- [99] X. Chen and H. H. Cai, “Monoclonal Antibodies for Cancer Therapy Approved by FDA,” *MOJ Immunol.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–0, Oct. 2016.
- [100] K. Y. Tsang, C. Jochems, and J. Schlom, “Insights on Peptide Vaccines in Cancer Immunotherapy,” Humana Press, Cham, 2015, pp. 1–27.
- [101] J. Ohtake and T. Sasada, “Are peptide vaccines viable in combination with other cancer immunotherapies?,” *Futur. Oncol.*, vol. 13, no. 18, pp. 1577–1580, Aug. 2017.
- [102] L. Ni and J. Lu, “Interferon gamma in cancer immunotherapy,” *Cancer Med.*, vol. 7, no. 9, pp. 4509–4516, Sep. 2018.
- [103] J. M. Wrangle *et al.*, “IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy,” *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 38, no. 2, pp. 45–68, Feb. 2018.
- [104] R. V. Lloyd, R. Y. Osamura, G. Klöppel, J. Rosai, World Health Organization., and International Agency for Research on Cancer., *WHO classification of tumours of*

endocrine organs. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017, 2017.

- [105] L. G. T. Morris, A. R. Shaha, R. M. Tuttle, A. G. Sikora, and I. Ganly, "Tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma: a matched-pair analysis of survival.," *Thyroid*, vol. 20, no. 2, pp. 153–8, Feb. 2010.
- [106] J. C. Hernandez-Prera *et al.*, "Pathologic Reporting of Tall-Cell Variant of Papillary Thyroid Cancer: Have We Reached a Consensus?," *Thyroid*, vol. 27, no. 12, pp. 1498–1504, Dec. 2017.
- [107] X. Wang, W. Cheng, C. Liu, and J. Li, "Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: current evidence on clinicopathologic features and molecular biology.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 26, pp. 40792–40799, Jun. 2016.
- [108] R. Ghossein and V. A. Livolsi, "Papillary Thyroid Carcinoma Tall Cell Variant," *Thyroid*, vol. 18, no. 11, pp. 1179–1181, Nov. 2008.
- [109] W. A. Hawk and J. B. Hazard, "The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid.," *Cleve. Clin. Q.*, vol. 43, no. 4, pp. 207–15, 1976.
- [110] I. Ganly *et al.*, "Prognostic Implications of Papillary Thyroid Carcinoma with Tall-Cell Features," *Thyroid*, vol. 24, no. 4, pp. 662–670, Apr. 2014.
- [111] M. S Dettmer *et al.*, "Tall cell papillary thyroid carcinoma: new diagnostic criteria and mutations in BRAF and TERT," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 22, no. 3, pp. 419–429, May 2015.
- [112] W. J. Oh *et al.*, "Classic papillary thyroid carcinoma with tall cell features and tall cell variant have similar clinicopathologic features.," *Korean J. Pathol.*, vol. 48, no. 3, pp. 201–8, Jun. 2014.
- [113] M. L. Enriquez, Z. W. Baloch, K. T. Montone, P. J. Zhang, and V. A. LiVolsi, "CDX2 Expression in Columnar Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 137, no. 5, pp. 722–726, May 2012.
- [114] V. Sujoy, A. Pinto, and V. Nosé, "Columnar Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Study of 10 Cases with Emphasis on CDX2 Expression," *Thyroid*,

- vol. 23, no. 6, pp. 714–719, Jun. 2013.
- [115] M. Bongiovanni *et al.*, “CDX2 Expression in Columnar Variant of Papillary Thyroid Carcinoma,” *Thyroid*, vol. 23, no. 11, pp. 1498–1499, Nov. 2013.
- [116] J.-H. Chen, W. C. Faquin, R. V Lloyd, and V. Nosé, “Clinicopathological and molecular characterization of nine cases of columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma,” *Mod. Pathol.*, vol. 24, no. 5, pp. 739–749, May 2011.
- [117] L. Teng *et al.*, “Hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: molecular profiling and comparison to classical papillary thyroid carcinoma, poorly differentiated thyroid carcinoma and anaplastic thyroid carcinoma,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 13, p. 22023, Mar. 2017.
- [118] C. C. Lubitz *et al.*, “Hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: an institutional case series and molecular profile.,” *Thyroid*, vol. 24, no. 6, pp. 958–65, Jun. 2014.
- [119] R. L. Apel, S. L. Asa, and V. A. LiVolsi, “Papillary Hürthle cell carcinoma with lymphocytic stroma. ‘Warthin-like tumor’ of the thyroid.,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 19, no. 7, pp. 810–814, Jul. 1995.
- [120] E. Y. Kim *et al.*, “Warthin-like papillary thyroid carcinoma accompanying classical papillary carcinoma: report of three cases and systematic review of the literature,” *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 10, no. 6, pp. 7223–7231, 2017.
- [121] O. Ozaki, K. Ito, T. Mimura, K. Sugino, and Y. Hosoda, “Papillary carcinoma of the thyroid. Tall-cell variant with extensive lymphocyte infiltration.,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 20, no. 6, pp. 695–698, Jun. 1996.
- [122] S. Matsubayashi *et al.*, “The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 80, no. 12, pp. 3421–4, Dec. 1995.
- [123] M. Bagnasco, D. Venuti, F. Paolieri, G. Torre, S. Ferrini, and G. W. Canonica, “Phenotypic and functional analysis at the clonal level of infiltrating T lymphocytes in papillary carcinoma of the thyroid: prevalence of cytolytic T cells with natural killer-like or lymphokine-activated killer activity.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*,

vol. 69, no. 4, pp. 832–6, Oct. 1989.

- [124] R. Shah *et al.*, “Intense expression of the b7-2 antigen presentation coactivator is an unfavorable prognostic indicator for differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 9, pp. 4391–7, Sep. 2002.
- [125] M. M. Wilders-Truschnig *et al.*, “Intrathyroidal dendritic cells, epitheloid cells, and giant cells in iodine deficient goiter,” *Am. J. Pathol.*, vol. 135, no. 1, pp. 219–25, Jul. 1989.
- [126] S. Kusmartsev, Y. Nefedova, D. Yoder, and D. I. Gabrilovich, “Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 2, pp. 989–99, Jan. 2004.
- [127] M. E. Dailey, “Relation of thyroid neoplasms to hashimoto disease of the thyroid gland,” *Arch. Surg.*, vol. 70, no. 2, p. 291, Feb. 1955.
- [128] I. Okayasu, M. Fujiwara, Y. Hara, Y. Tanaka, and N. R. Rose, “Association of chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid papillary carcinoma. A study of surgical cases among Japanese, and white and African Americans,” *Cancer*, vol. 76, no. 11, pp. 2312–2318, Dec. 1995.
- [129] S. Arif, A. Blanes, and S. J. Diaz-Cano, “Hashimoto’s thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma,” *Histopathology*, vol. 41, no. 4, pp. 357–62, Oct. 2002.
- [130] C. Mechler *et al.*, “Papillary thyroid carcinoma: 6 cases from 2 families with associated lymphocytic thyroiditis harbouring RET/PTC rearrangements,” *Br. J. Cancer*, vol. 85, no. 12, pp. 1831–7, Dec. 2001.
- [131] D. Ahn *et al.*, “Clinical relationship between Hashimoto’s thyroiditis and papillary thyroid cancer,” *Acta Oncol. (Madr)*, vol. 50, no. 8, pp. 1228–1234, Nov. 2011.
- [132] H. G. Vuong *et al.*, “The changing characteristics and molecular profiles of papillary thyroid carcinoma over time: a systematic review,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 6, pp. 10637–10649, Feb. 2017.

- [133] G. M. Howell, S. P. Hodak, and L. Yip, "RAS mutations in thyroid cancer.," *Oncologist*, vol. 18, no. 8, pp. 926–32, 2013.
- [134] Z. Zhu, M. Gandhi, M. N. Nikiforova, A. H. Fischer, and Y. E. Nikiforov, "Molecular Profile and Clinical-Pathologic Features of the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: An Unusually High Prevalence of ras Mutations," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 120, no. 1, pp. 71–77, Jul. 2003.
- [135] F. Raue and K. Frank-Raue, "Thyroid Cancer: Risk-Stratified Management and Individualized Therapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 20, pp. 5012–5021, Oct. 2016.
- [136] D. T. Leicht *et al.*, "Raf kinases: function, regulation and role in human cancer.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 8, pp. 1196–212, Aug. 2007.
- [137] H. Davies *et al.*, "Mutations of the BRAF gene in human cancer," *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 949–954, Jun. 2002.
- [138] M. Xing, "BRAF mutation in thyroid cancer.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 12, no. 2, pp. 245–62, Jun. 2005.
- [139] V. Trovisco *et al.*, "Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness," *Virchows Arch.*, vol. 446, no. 6, pp. 589–595, Jun. 2005.
- [140] C. Romei and R. Elisei, "RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 3, p. 54, 2012.
- [141] F. Carlomagno, "Thyroid Cancer: Role of RET and Beyond.," *Eur. Thyroid J.*, vol. 1, no. 1, pp. 15–23, Apr. 2012.
- [142] Y. E. Nikiforov, "Radiation-induced thyroid cancer: What we have learned from Chernobyl," *Endocr. Pathol.*, vol. 17, no. 4, pp. 307–318, Dec. 2006.
- [143] V. Marotta, A. Guerra, M. R. Sapio, and M. Vitale, "RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint.," *Eur. J. Endocrinol.*,

vol. 165, no. 4, pp. 499–507, Oct. 2011.

- [144] C. M. Caudill, Z. Zhu, R. Ciampi, J. R. Stringer, and Y. E. Nikiforov, “Dose-Dependent Generation of RET/PTC in Human Thyroid Cells after in Vitro Exposure to γ -Radiation: A Model of Carcinogenic Chromosomal Rearrangement Induced by Ionizing Radiation,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 4, pp. 2364–2369, Apr. 2005.
- [145] G. Viglietto *et al.*, “RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis,” *Oncogene*, vol. 11, no. 6, pp. 1207–10, Sep. 1995.
- [146] M. Gandhi, L. W. Dillon, S. Pramanik, Y. E. Nikiforov, and Y.-H. Wang, “DNA breaks at fragile sites generate oncogenic RET/PTC rearrangements in human thyroid cells,” *Oncogene*, vol. 29, no. 15, pp. 2272–2280, Apr. 2010.
- [147] M. Gandhi, M. Medvedovic, J. R. Stringer, and Y. E. Nikiforov, “Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements,” *Oncogene*, vol. 25, no. 16, pp. 2360–2366, Apr. 2006.
- [148] R. Liu and M. Xing, “TERT promoter mutations in thyroid cancer,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 23, no. 3, pp. R143–55, Mar. 2016.
- [149] N. Agrawal *et al.*, “Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma,” *Cell*, vol. 159, no. 3, pp. 676–690, Oct. 2014.
- [150] S. Asioli *et al.*, “Papillary Thyroid Carcinoma With Prominent Hobnail Features: A New Aggressive Variant of Moderately Differentiated Papillary Carcinoma. A Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Study of Eight Cases,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 34, no. 1, pp. 44–52, Jan. 2010.
- [151] X. Liu *et al.*, “Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 20, no. 4, pp. 603–10, Aug. 2013.
- [152] Y. S. Lee, Y. Kim, S. Jeon, J. S. Bae, S. L. Jung, and C. K. Jung, “Cytologic, clinicopathologic, and molecular features of papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: 10 case reports and systematic literature review,” *Int.*

- J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 8, no. 7, pp. 7988–97, 2015.
- [153] A. Ieni *et al.*, “The micropapillary/hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: A review of series described in the literature compared to a series from one southern Italy pathology institution,” *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 17, no. 4, pp. 521–527, Dec. 2016.
- [154] M. H. Hansen, H. Nielsen, and H. J. Ditzel, “The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 22, pp. 12659–64, Oct. 2001.
- [155] H. Summer, R. Grämer, and P. Dröge, “Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Urea PAGE),” *J. Vis. Exp.*, no. 32, Oct. 2009.
- [156] B. J. Bassam and P. M. Gresshoff, “Silver staining DNA in polyacrylamide gels,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 11, pp. 2649–2654, Nov. 2007.
- [157] J. J. M. van Dongen *et al.*, “Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.,” *Leukemia*, vol. 17, no. 12, pp. 2257–2317, Dec. 2003.
- [158] M. Yeo *et al.*, “The Warthin-Like Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Comparison with Classic Type in the Patients with Coexisting Hashimoto’s Thyroiditis,” *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015.
- [159] M. Ludvikova, A. Ryska, M. Korabecna, M. Rydlova, and M. Michal, “Oncocytic papillary carcinoma with lymphoid stroma (Warthin-like tumour) of the thyroid: a distinct entity with favourable prognosis,” *Histopathology*, vol. 39, no. 1, pp. 17–24, Jul. 2001.
- [160] A. D’Antonio, A. De Chiara, M. Santoro, G. Chiappetta, and N. S. Losito, “Warthin-like tumour of the thyroid gland: RET/PTC expression indicates it is a variant of papillary carcinoma.,” *Histopathology*, vol. 36, no. 6, pp. 493–498, Jun.

2000.

- [161] M. Urano *et al.*, “Warthin-like tumor variant of papillary thyroid carcinoma: case report and literature review.,” *Pathol. Int.*, vol. 51, no. 9, pp. 707–712, Sep. 2001.
- [162] F. J. Vera-Sempere, M. Prieto, and A. Camañas, “Warthin-like Tumor of the Thyroid: A Papillary Carcinoma with Mitochondrion-rich Cells and Abundant Lymphoid Stroma. A Case Report,” *Pathol. - Res. Pract.*, vol. 194, no. 5, pp. 341–347, Jan. 1998.
- [163] K. Y. Lam, C. Y. Lo, and W. I. Wei, “Warthin tumor-like variant of papillary thyroid carcinoma: a case with dedifferentiation (anaplastic changes) and aggressive biological behavior.,” *Endocr. Pathol.*, vol. 16, no. 1, pp. 83–89, 2005.
- [164] P. Amico *et al.*, “Warthin tumor-like papillary thyroid carcinoma with a minor dedifferentiated component: report of a case with clinicopathologic considerations.,” *Case Rep. Med.*, vol. 2010, p. 495281, 2010.
- [165] J. Shi, S. Hou, Q. Fang, X. Liu, X. Liu, and H. Qi, “PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function.,” *Immunity*, vol. 49, no. 2, pp. 264-274.e4, Aug. 2018.
- [166] N. S. Joshi *et al.*, “Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses.,” *Immunity*, vol. 43, no. 3, pp. 579–590, Sep. 2015.
- [167] C. Solinas *et al.*, “Immune Checkpoint Molecules on Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Association with Tertiary Lymphoid Structures in Human Breast Cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1412, Oct. 2017.
- [168] M. Shugay *et al.*, “Towards error-free profiling of immune repertoires.,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 6, pp. 653–5, Jun. 2014.
- [169] B. Kotlan *et al.*, “Novel Ganglioside Antigen Identified by B Cells in Human Medullary Breast Carcinomas: The Proof of Principle Concerning the Tumor-Infiltrating B Lymphocytes,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 4, pp. 2278–2285, Aug. 2005.

Приложение 1. Детальная характеристика когорты пациентов МРНЦ, г. Обнинск.

Пациент	Возраст на момент постановки диагноза	Пол	Размер опухоли, мм	T-стадия (AJCC)	N-стадия (AJCC)	Наличие экстра tireоидного распространения	Сопутствующий аутоиммунный тиреоидит
1	54	М	14	T1b	N0	-	+
2	17	Ж	15	T1b	N1b	-	+
3	71	М	18	T1b	N1b	-	+
4	52	Ж	10	T1a	N0	-	+
5	62	Ж	20	T1b	N0	-	+
6	52	Ж	10	T1a	N0	-	+
7	54	Ж	16	T1b	N0	-	+
8	55	Ж	10	T1a	N0	-	+
9	54	Ж	14	T1b	N0	-	NA
10	49	Ж	40	T2	N1a	+	+
11	48	М	15	T1b	N0	+	+
12	53	Ж	17	T1b	N1a	-	+
13	56	Ж	5	T1a	N0	-	+
14	60	Ж	26	T2	N0	+	+
15	63	Ж	14	T1b	N0	+	+
16	37	Ж	3	T1a	N1a	-	+
17	54	Ж	5	T1a	Nx	-	+
18	35	Ж	4	T1a	N0	-	+
19	35	Ж	15	T1b	N0	-	+
20	36	Ж	5	T1a	N0	-	+
21	53	Ж	1	T1a	N0	-	+
22	61	Ж	6	T1a	N0	-	+
23	55	Ж	8	T1a	N0	-	+
24	61	Ж	8	T1a	Nx	-	+
25	57	Ж	17	T1b	N1b	-	+
26	54	Ж	6	T1a	N1a	-	+
27	57	Ж	15	T1b	N1a	+	+

Приложение 2. Детальная характеристика когорты пациентов TCGA (Уортино-подобный вариант ПРЩЖ).

Пациент	Возраст на момент постановки диагноза	Пол	Размер опухоли, мм	T-стадия (AJCC)	N-стадия (AJCC)	Наличие экстра tireоидного распространения	Сопутствующий аутоиммунный тиреоидит	mРНК кластер	микроРНК кластер
TCGA-BJ-A3PR	69	Ж	25	T1a	N0	-	+	5	6
TCGA-DJ-A3UW	50	Ж	6	T1b	N0	-	+	2	6
TCGA-E8-A2JQ	18	Ж	21	T3	N1a	+	NA	5	6
TCGA-E8-A419	30	Ж	30	T2	N1	-	NA	5	6
TCGA-EL-A3CN	47	Ж	15	T3	N0	+	+	5	6
TCGA-EL-A4JX	31	Ж	40	T3	N0	-	+	5	6
TCGA-EM-A4FQ	42	Ж	21	T2	N1	-	+	5	6
TCGA-ET-A3BO	44	Ж	25	T3	N1a	+	+	5	6
TCGA-ET-A3DO	33	Ж	25	T2	NX	-	+	5	6
TCGA-ET-A3DU	21	Ж	14	T1	N1a	-	+	NA	6
TCGA-ET-A4KN	51	Ж	20	T3	N0	+	NA	5	6
TCGA-FE-A23A	27	Ж	27	T2	N0	-	+	5	6
TCGA-IM-A3EB	32	Ж	30	T3	N1a	+	+	5	6

Приложение 3. Детальная характеристика когорты пациентов TCGA (вариант ПРЦЖ из высоких клеток).

	Возраст на момент постановки диагноза	Пол	T-стадия (AJCC)	N-стадия (AJCC)	Наличие экстракритического распространения	мРНК кластер	микроРНК кластер
TCGA-BJ-A0Z9	57	Ж	T3	N0	+	5	6
TCGA-BJ-A18Z	NA	NA	NA	NA	NA	5	6
TCGA-BJ-A28X	32	Ж	T3	N1a	+	5	6
TCGA-BJ-A45I	51	Ж	T3	N0	+	5	6
TCGA-DE-A4MC	43	Ж	T3	N1b	+	5	6
TCGA-DJ-A13L	NA	NA	NA	NA	NA	5	6
TCGA-DJ-A1QH	58	Ж	T3	N1a	+	5	6
TCGA-DJ-A1QO	69	М	T3	N0	+	3	6
TCGA-DJ-A2PT	70	Ж	T3	N0	+	5	6
TCGA-DJ-A2PY	46	Ж	T3	N1a	+	5	6
TCGA-DJ-A2Q8	47	Ж	T1a	N0	-	NA	6
TCGA-DJ-A2Q9	65	Ж	T1b	N1a	-	5	6
TCGA-DJ-A3V0	56	М	T4a	N1b	+	5	2
TCGA-DJ-A3V7	44	Ж	T3	N0	+	3	5
TCGA-DJ-A3V8	28	Ж	T3	N1b	+	3	6
TCGA-DJ-A3VF	60	Ж	T3	N1b	+	5	6
TCGA-DJ-A4V4	48	Ж	T1a	N0	-	2	6
TCGA-E8-A2EA	52	Ж	T1b	N0	-	5	6
TCGA-EL-A3D6	NA	NA	NA	NA	NA	5	6
TCGA-EL-A3GY	40	Ж	T1	N1	-	3	5
TCGA-EL-A3H7	36	Ж	T3	N1	+	5	6
TCGA-ET-A25G	56	Ж	T3	N0	+	5	6
TCGA-ET-A25R	51	Ж	T3	NX	+	5	6
TCGA-ET-A3DW	64	М	T2	N1	-	5	4
TCGA-ET-A40Q	38	М	T3	N1b	+	5	6
TCGA-FE-A234	26	Ж	T2	N1	-	5	6
TCGA-FE-A3PB	33	Ж	T3	N1a	+	5	6

TCGA-IM-A3U2	89	Ж	T3	N1b	+	5	6
TCGA-IM-A3U3	55	Ж	T1b	N0	-	5	4
TCGA-IM-A4EB	37	M	T3	N1b	+	5	6
TCGA-L6-A4EU	58	Ж	T3	N1a	+	5	6