

**Опухолевая прогрессия
(клональная эволюция)**

**лимфомы из клеток
зоны мантии**

Ю.Ю. Лорие, ГНЦ 2012

**Декадник посвященный дню
рождения И.А. Кассирского,
40 юбилейный**

Опухолевая прогрессия

Л. Фулдс (Leslie Foulds)



- ❑ Правило 1. При множественных опухолях у одного животного прогрессия происходит независимо в разных опухолях.
- ❑ Правило 2. В разных клетках опухоли прогрессия происходит независимо.
- ❑ Правило 3. Прогрессия не зависит от роста. Она существует в покоящейся опухолевой клетке и в клетках опухолей, при которых есть арест роста.
- ❑ Правило 4. Прогрессия является непрерывным или прерывистым процессом, развивающимся постепенно, или скачкообразно.
- ❑ Правило 5. Прогрессия происходит по одному из альтернативных путей дифференцировки.
- ❑ Правило 6. Прогрессия не всегда достигает своей конечной точки.

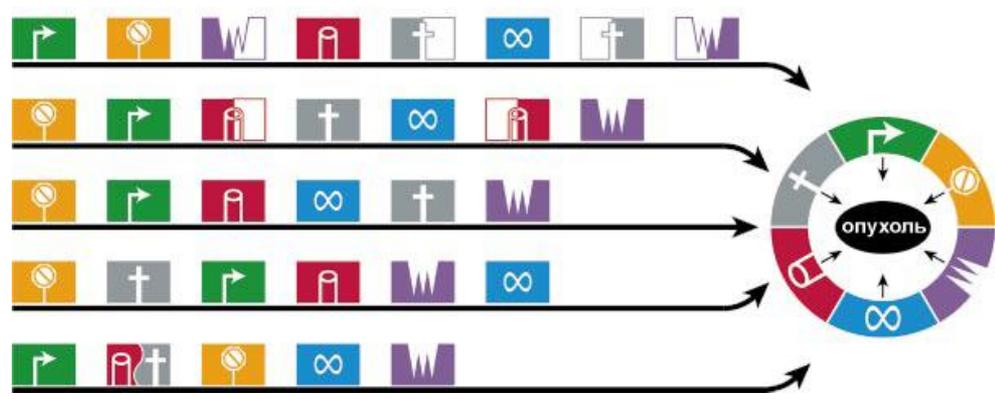
The Hallmarks of Cancer

Review

Характеристики опухолевого роста 2000



свойство	механизм
саморегуляция роста	перестройка c-мус
нечувствительность к запрету роста	инактивация Rb
инактивация апоптоза	перестройка bcl-2
безлимитный пролиферативный потенциал	активация теломеразы
устойчивый ангиогенез	индукция VEGF
инвазия и метастазирование	молекулы адгезии внеклеточные протеазы



Характеристики опухолевого роста 2010

Hallmarks of Cancer: The Next Generation

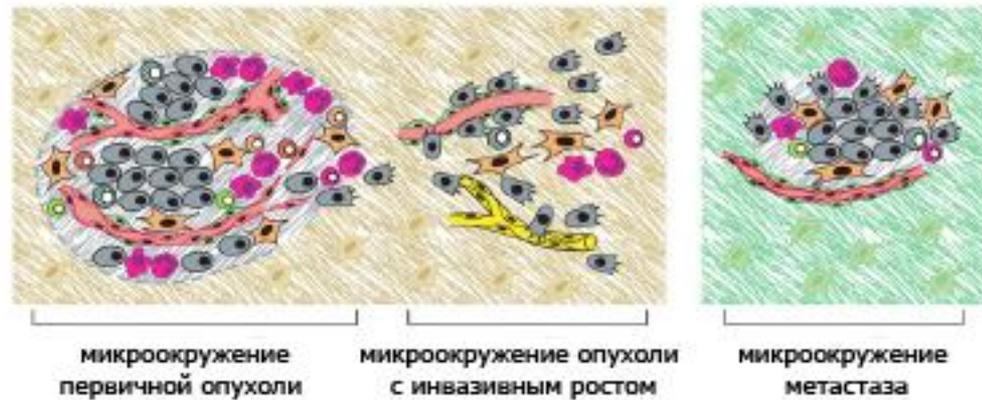
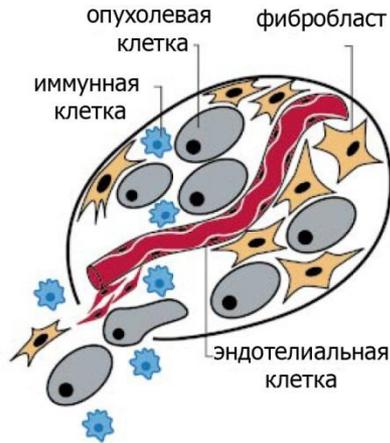
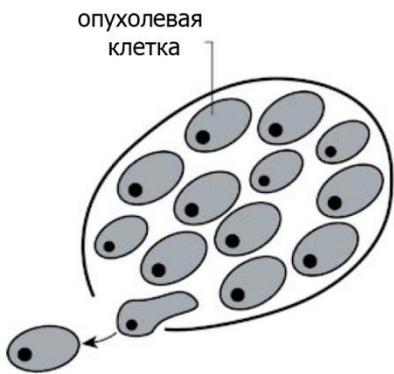
Douglas Hanahan^{1,2,*} and Robert A. Weinberg^{3,*}



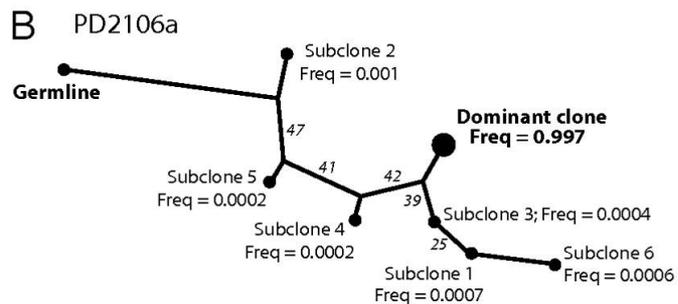
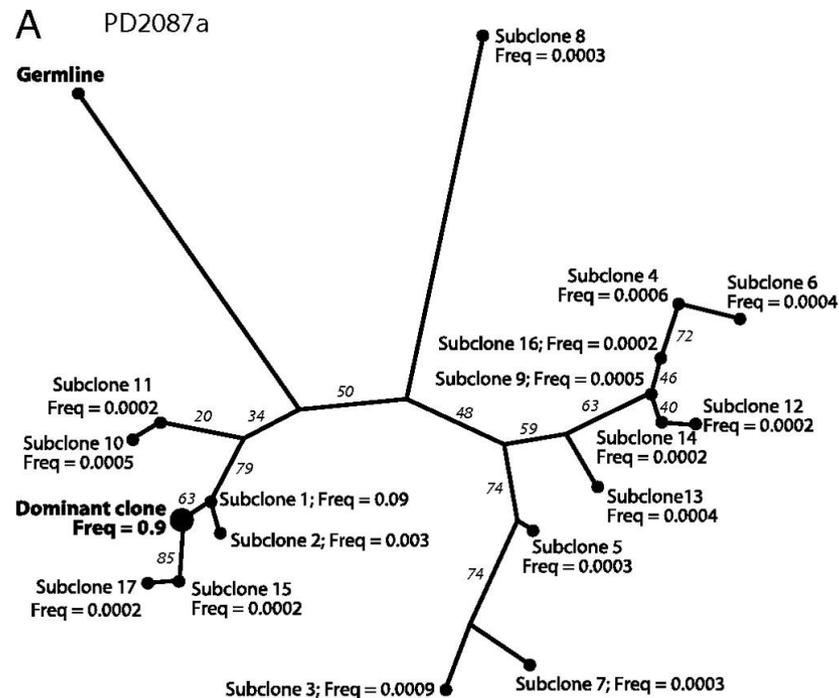
Микроокружение

2000

2010



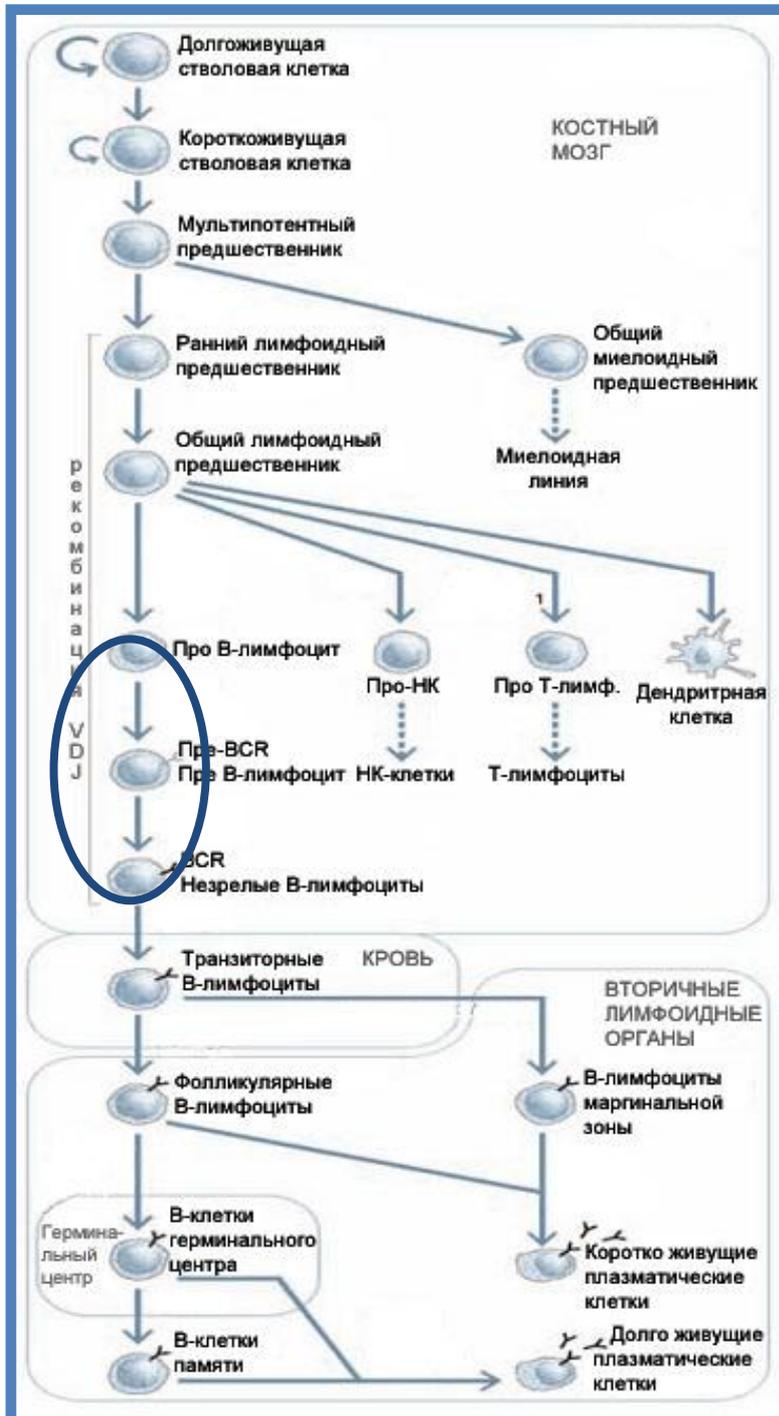
Филогенетическая взаимосвязь субклонов у 2 пациентов с В-ХЛЛ



Campbell P J et al. PNAS 2008;105:13081-13086

ЛКМЗ как модель опухолевой прогрессии

- $t(11;14)(q13;q32)$ 99%
- Консервативный фенотип 80%
- Несколько типов опухолевого роста
- Короткая БРВ и ОВ при проведении неВДТ
- Частая бластная трансформация

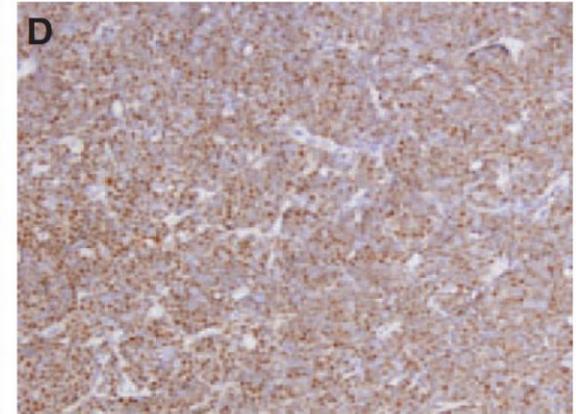
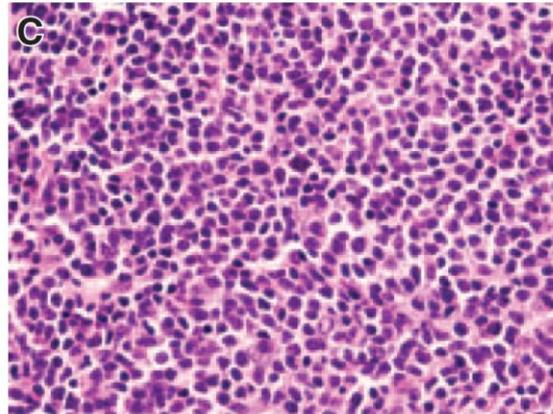
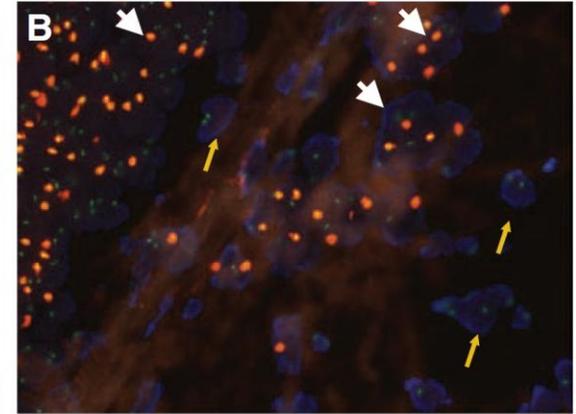
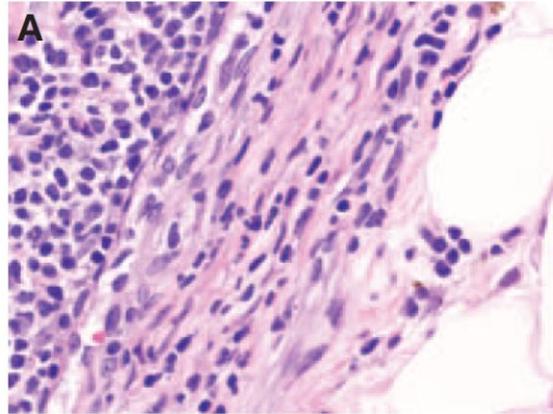


Выявление уровня возникновения $t(11;14)(q13;q32)$

П	ЛКМЗ	В-клетки	Моноциты	Т-клетки	Эритрокар	CD34+	Гранул
Результаты сортинга							
	21.703 – 10.003.443 98,2%	1.910 – 200.000	51.231 – 184.873 96,9%	100.093 – 311.629 98,6%	33.525 – 170.000 91.5%	4.667 – 40.003 92,3%	164.126 – 1.413.919 97,8%
Результаты FISH на отсортированных клетках							
Ш.	99,5%	-	0%	0%	0%	Нет ядер	0%
Д.	99,0%	Нет клеток	0%	0%	0%	0% (5 яд.)	0%
К.	100%(5 яд.)	0% (15 яд.)	0%	0%	0%	0% (30 ядер)	0%
А.	84%	0% (5 яд.)	0%	0%	0% (50 ядер)	0% (100 яд.)	0%
М.	92%	Нет клеток	0%	0%	0%	0% (100 яд.)	0%
У.	95%	Нет клеток	0% (100 яд.)	0%	0% (40 ядер)	1% (100 яд.)	0%
Ф.	100%	Нет клеток	0% (20 яд.)	0%	0% (20 ядер)	0% (20 ядер)	0%
Б.	100%	Нет клеток	0%(100 яд.)	0%	0% (20 ядер)	0% (20 ядер)	0%
Ч.	100% 10 яд	Нет клеток	0%	0%	0%	0% (5 ядер)	0%
Х.	По 100% в 2 популяц.	Нет клеток	0%	0%	0%	0% (50 ядер)	0%
М.	Нет клеток	0% (2% от всей популяц.)	0%	0%	0%	0% (200 ядер)	0%
Ю.	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Длительность доклинической стадии?

- Одновременное развитие ЛКМЗ у реципиента и донора
- Клональная идентичность
- Донорский тип доказан FISH CEP X/ Y
- ПЦР t(11;14)(q13;q32)+ по биопсиям
- ПЦР t(11;14)(q13;q32)- по трансплантату 1996 г.
- Время после трансплантации – 12 ЛЕТ!



ЛКМЗ *in situ*

- 7 больных с предшествующими биопсиями/операциями
m ~ 7 лет до дебюта ЛКМЗ
- Длительный латентный период
- Мантийный тип роста

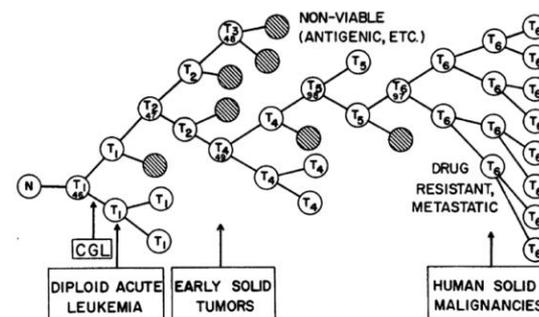
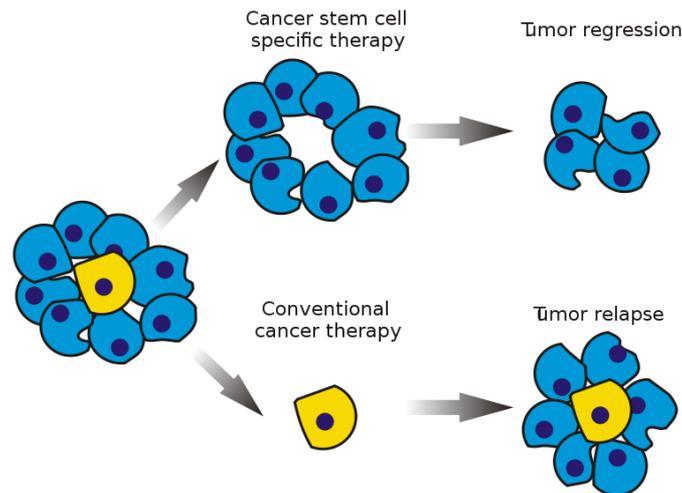
Pre-lymphoma location	Pattern of <i>in situ</i> MCL	Latency (yrs)	Lymphoma location	CCND1 FISH in pre-lymphoma specimen
Obturator node from radical prostatectomy	CyclinD1+ focal colonized follicles, scattered cells in mantles	7.4	Sigmoid colon biopsy	ND
Duodenal serosal lymph node (perforated benign gastric ulcer)	Diffuse scattered CyclinD1+ cells	2.1	Sigmoid colon biopsy	ND
Right neck subcutaneous lymph node (neurofibroma excision)	CyclinD1+ cells in follicular mantles	3.2	Bone marrow biopsy	ND
Periesophageal lymph nodes from esophagectomy	Several CyclinD1+ colonized primary follicles	8.0	Right cervical lymph node	ND
Axillary lymph node from mastectomy	CyclinD1+ cells in follicular mantles	15.5	Mesenteric lymph node	<5% positive signals
Mesenteric lymph node dissection for colon cancer	CyclinD1+ cells in follicular mantles	10.6	Base of tongue lesion	Positive
Cervical lymph node involved with T cell lymphoma	CyclinD1+ cells in follicular mantles	3.1	Right axillary lymph node	Positive

ЛКМЗ-инициирующие клетки!

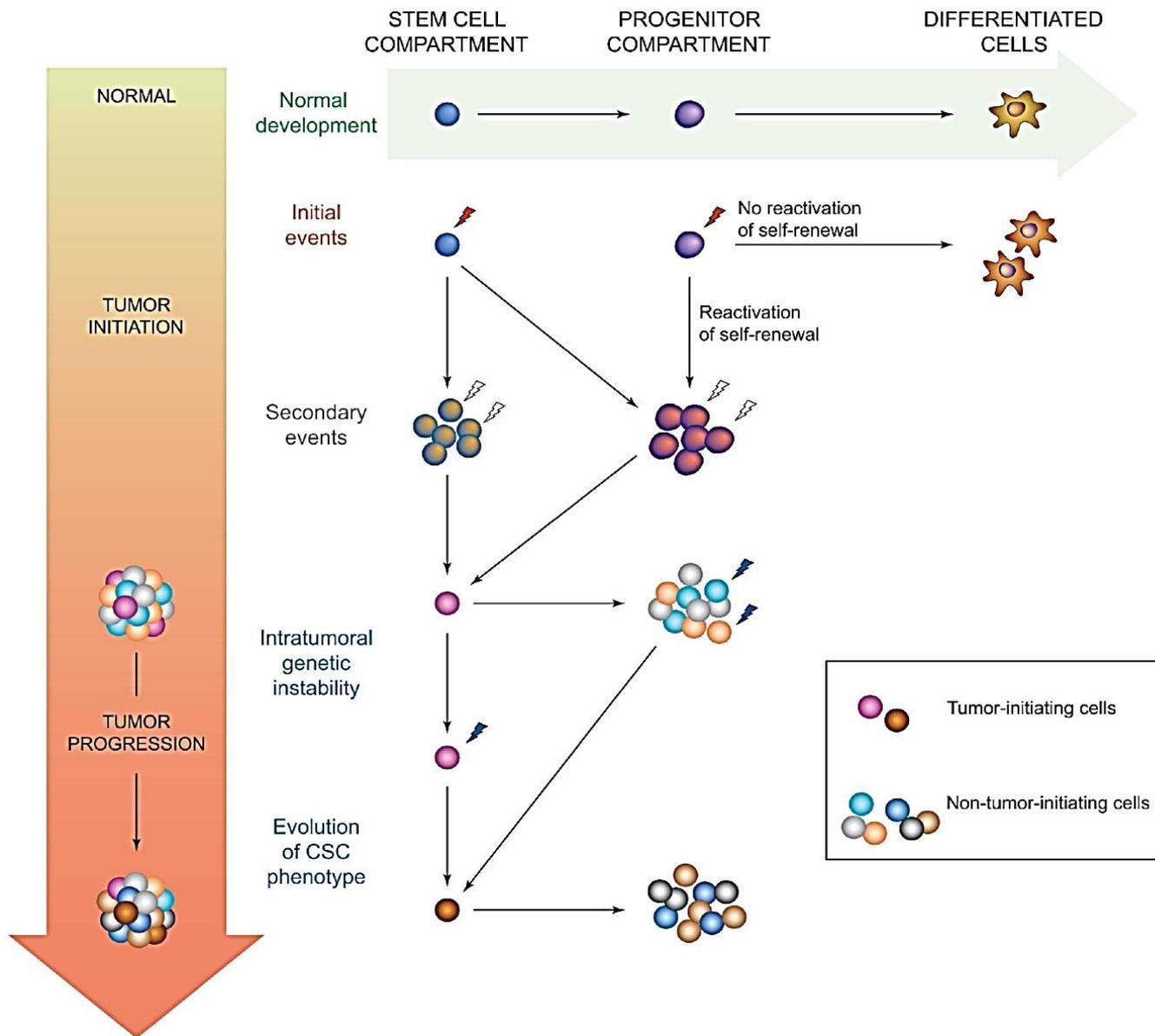
- Сортинг CD45+CD19- и CD45+CD19+ клеток ЛКМЗ
- Иммунодеплеция CD34+ и CD3+ клеток
- Чистота выделения 99-100%
- 100 клеток CD45+CD19- вызывают опухоль *in vivo*
- ЛКМЗ-инициирующие клетки повторно прививаются
- Эти клетки резистентны к проводимой терапии
- Резистентность к бортезомибу не смотря на активацию NFκB
- Трансформация в плазматические/плазматизированные клетки, экспрессией CD138, CD38, BLIMP-1, ARF4, NFκB(p50/p65)

Эффект *in vivo* очистки R - ?

Свойство	Модель опухолевых стволовых клеток	Стохастическая модель (клональная эволюция)
Число клоногенных клеток	Низкое	Высокое
Фенотип опухолевых клеток	Гетерогенный	Гетерогенный или гомогенный
Организация опухоли	Иерархическая	Не обязательно иерархическая
Различия клоногенных и неклоногенных клеток	Стабильные, эпигенетические	Нестабильные, эпигенетические или генетические
Рациональная терапия	Уничтожение только клоногенных клеток	Уничтожение всех или большинства клеток
Клинические подтверждения	Герминальные опухоли	Гемобласты



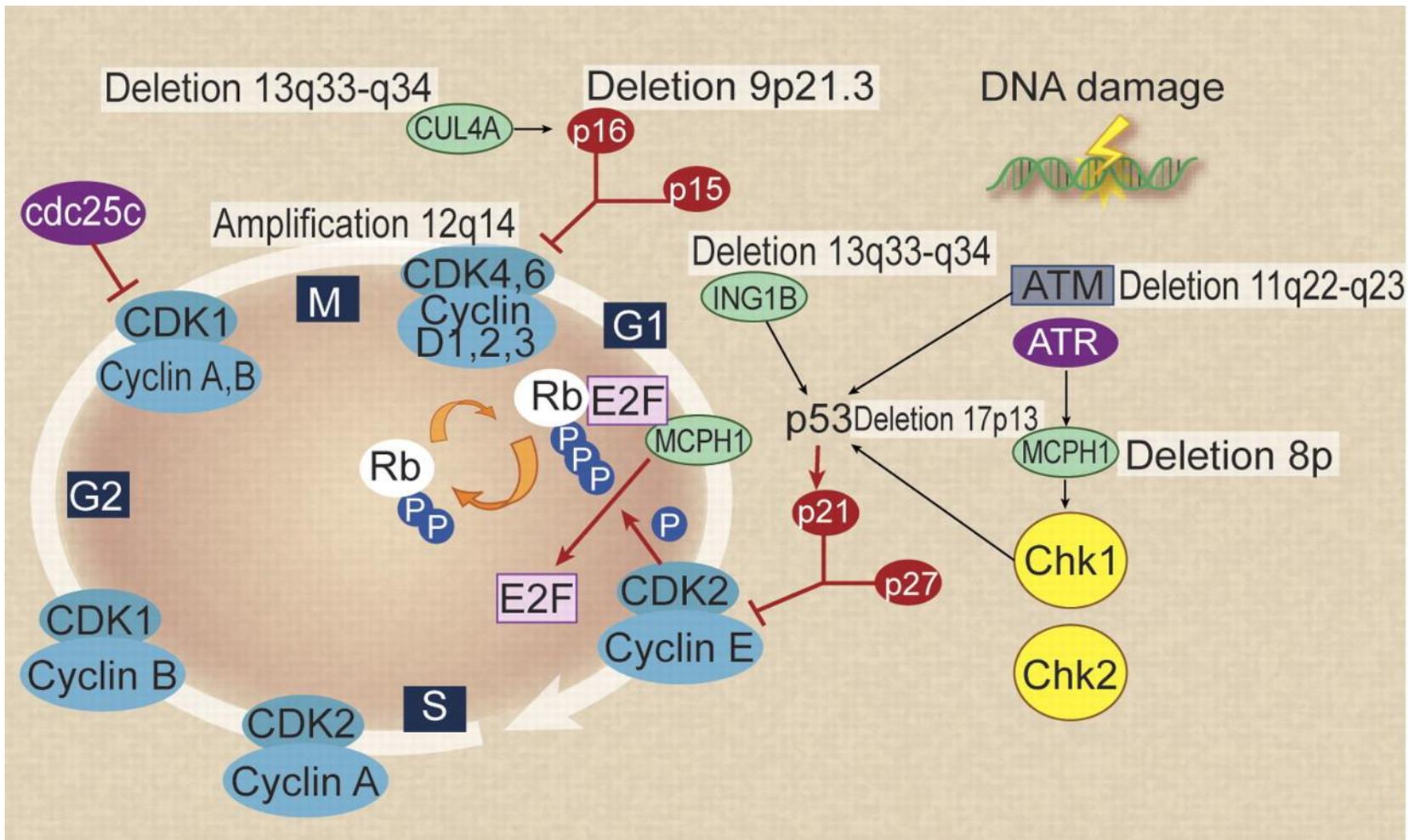
Теория стволовых клеток опухоли



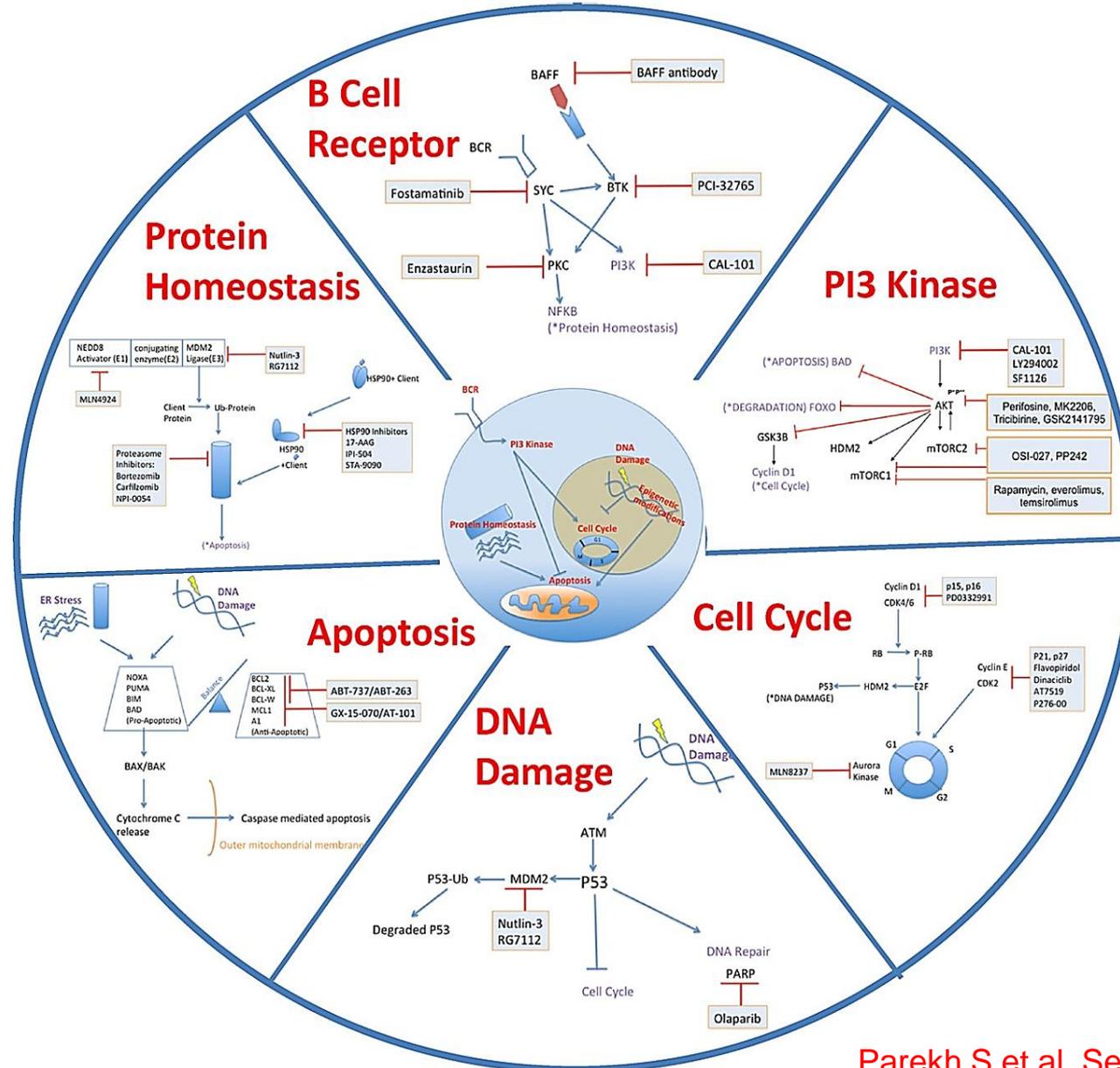
Генетические и молекулярные особенности ЛКМЗ

	Обухова Т.Н. 2005 52 б-х		Parry-Jones N. 2007 60 б-х	
	(%)		(%)	
del11q23	51%	Комплексный кариотип, трансформация	25%	Экстранодальные поражения, плохой прогноз
del9p21	38%	Трансформация	Н.И.	-
-13/del13q14	35%	Прогрессия, трансформация	43%	Плохой прогноз
-17/del17p13	22%	Резистентность к лечению	46%	Спленомегалия, лейкоцитоз >30x10 ⁹ /л
del6q	21%	Массивная ЛАП	12%	Экстранодальные поражения, плохой прогноз
del/t1p/q	22%	-	Н.И.	-
+3/3q	17%	-	Н.И.	-
-20	11%	-	Н.И.	-
+12/12q	9%	-	8%	Обухова Т.Н. IACRLRD 2005 Parry-Jones N. Br J Haematol 2007

Cell-cycle and DNA damage response alterations in MCL, highlighting specific genomic copy number variations



Изменение клеточных сигнальных путей

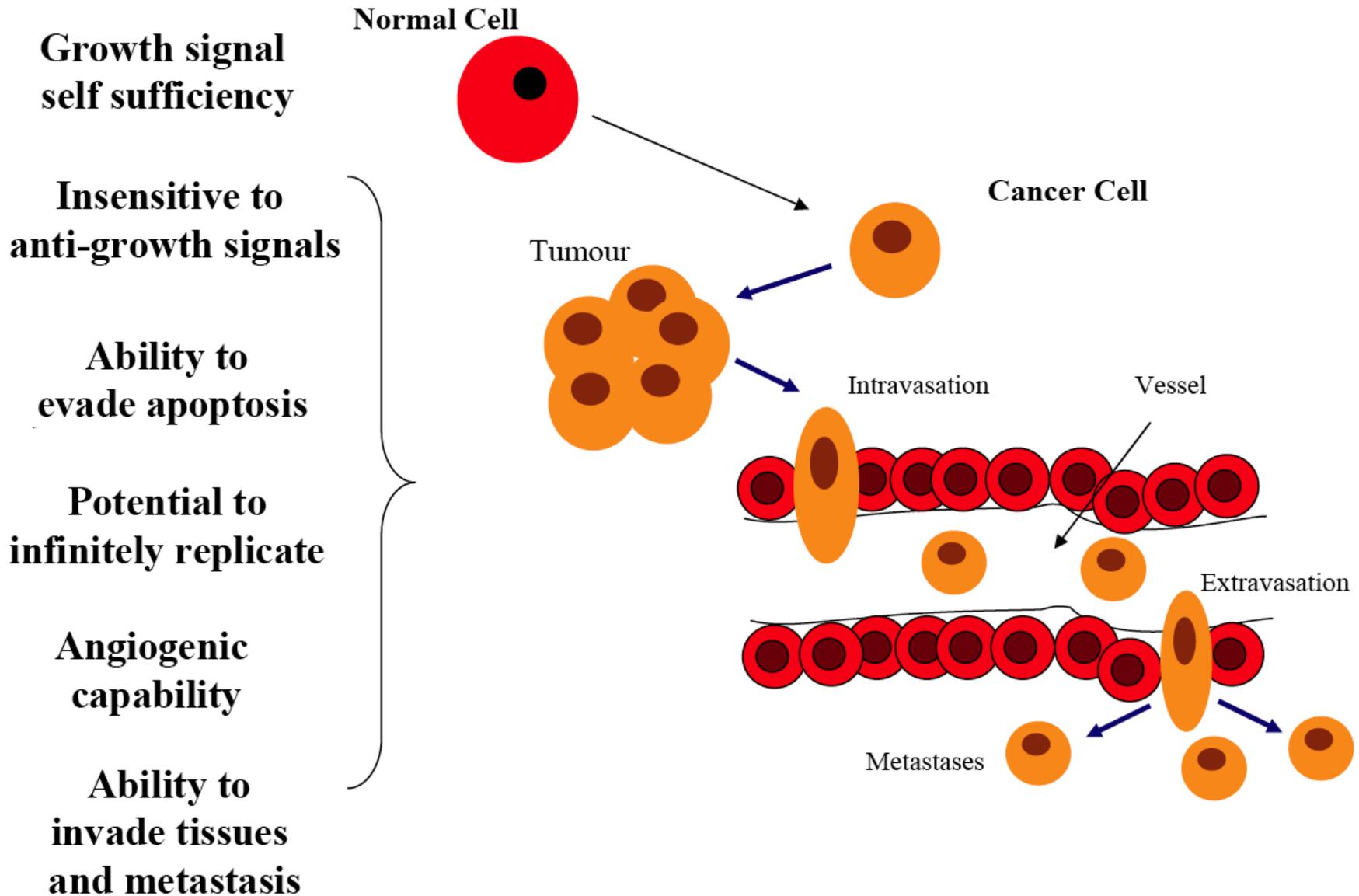


Суть теории прогрессии (клональной эволюции) опухоли

Table 1
Critical pathways and novel drugs in MCL.

Pathway targeted	Drug	Mechanism (target)	Clinical pharmacology
B-cell receptor	PCI-32765	BTK inhibitor	ORR 75% in relapsed MCL [123]. Side effects include nausea, vomiting and diarrhea.
	Fostamatinib	SYK inhibitor	11% response rate in relapsed MCL [124]. Side effects include neutropenia, diarrhea and thrombocytopenia.
	Enzastaurin	PKC inhibitor	37% disease stabilization in relapsed MCL patients [125]. Side effects included anemia, nausea, diarrhea, vomiting and syncope.
PI3K/AKT/mTOR	CAL-101	PI3K-delta inhibitor	Discussed in PI3K section
	SB1518	Small molecule JAK-2 inhibitor	2/3 MCL patients achieved PR [126]. Side effects include constipation, neutropenia and fever.
	MK2206	AKT inhibitor	ORR 62% in relapsed MCL [127]. Dose limiting toxicity is elevation in LFTs. Phase II ongoing in DLBCL. Side effects include skin rash, mucositis and glucose intolerance. Preclinical synergy with rapamycin
Cell cycle	CCI-779	mTOR inhibitor (predominantly TORC1)	ORR 38% as single agent [32] and 59% in combination with rituximab [37]. Side effects include hyperglycemia, fatigue, thrombocytopenia and neutropenia.
	PD0332991	CDK4/6 inhibitor	Cytostatic as single agent [46] but has preclinical synergy with bortezomib and cytarabine. Side effects include thrombocytopenia and neutropenia.
DNA damage response	Flavopiridol (alvocidib)	Pan-CDK inhibitor	Limited single agent activity [47]. Side effects include secretory diarrhea, fatigue and cytopenias.
	RG7112	Clinical grade HDM2 inhibitor	One AML patient in remission >9 months, responses in CLL/NHL [128]. Side effects include moderate to severe nausea and vomiting.
Protein homeostasis	Olaparib	PARP-1 inhibitor	May have higher specificity for ATM mutant or deficient MCLs. Side effects include nausea, vomiting and cytopenias.
	17-AAG	HSP-90 inhibitor	Poor solubility, limited clinical activity but shows preclinical synergy with bortezomib in MM. Side effects include diarrhea, hyperglycemia and hepatotoxicity.
Cell survival/apoptosis	Carfilzomib	Irreversible proteasome inhibitor	ORR 24% in bortezomib refractory MM [129] and preclinical synergy with HPS90 inhibitors and HDAC inhibitors. Side effects include fatigue and nausea.
	GX15-070MS (Obatoclox)	Small molecule pan-BCL-2 inhibitor	4% responses in CLL patients in phase I [68]. More likely to be useful as chemo/radio sensitizer. Side effects include somnolence/ataxia and myelosuppression.
Epigenetic modifications	ABT-263 (Navitoclax)	BCL-2/BCL-XL inhibitor	10/46 relapsed NHL patients had a PR [67]. Side effects include myelosuppression and diarrhea.
	Vorinostat (SAHA, Zolinza)	Class I and II HDAC inhibitor	1CRu/11 relapsed MCL patients [115]. Has preclinical synergy with bortezomib and DNA hypomethylating agents. Side effects include myelosuppression (especially thrombocytopenia), nausea and rash.

Cancer Evolution

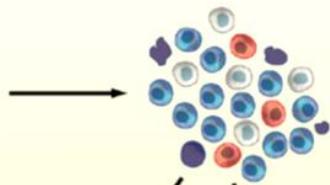


Биологические свойства опухоли

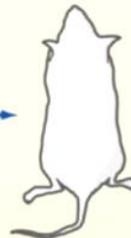
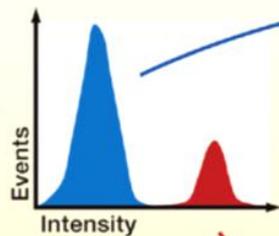
The **Hallmarks of Cancer**, all of which evolve somatically

- (1) self-sufficiency in growth signals
- (2) insensitivity to anti-growth signals
- (3) evading apoptosis
- (4) sustained angiogenesis
- (5) limitless replicative potential
- (6) invasion and metastasis

Optimize dissociation to preserve cell viability and marker integrity



CANCER CELLS



Nontumorigenic cancer cells

Are they alive?

Are they all cancer cells?

Are they stably and epigenetically different from tumorigenic cells?

Exclude debris and dead cells



Exclude non-cancer cells



Tumorigenic cancer cells

Do they form tumors with serial transplantation?

Do they give rise to nontumorigenic cancer cells?

Факты свидетельствующие о наличии столовых клеток ЛКМЗ

- Работа – мышинная линия ЛКМЗ –
“side” populations

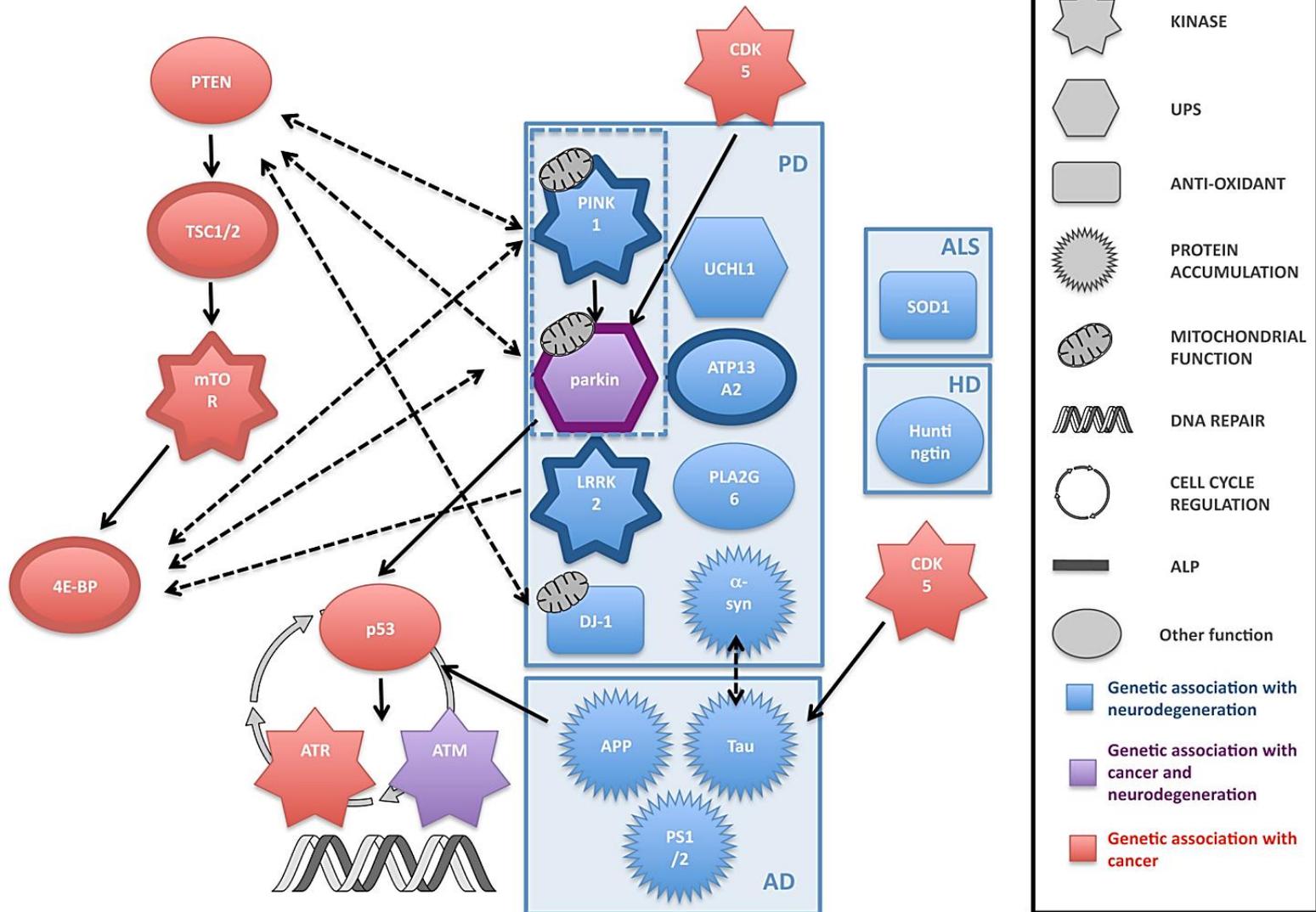
Факты свидетельствующие об опухолевой прогрессии

- Работа по привитой бластной ЛКМЗ и 12-летней прогрессии
- Работа по предшествующим биопсиям/операциям при ЛКМЗ
- Работа по бластоидному варианту – прогрессия мелкоклеточного

Знание патогенеза

- Основные свойства опухолевого роста

Опухоли и нейродегенерация



Модели карциногенеза

	1	2	3	4	5
	Мутационная	Геномная нестабильность	Не-генотоксическая	Дарвина	Тканевая организация
Основная причина	Химические карциногены вирусы	Знакомство Геномная нестабильность	Клональная экспансия/ эпигенетика	Клональная экспансия/ селекция	Микро-окружение
Примеры	Табак, HPV	Колоректальный рак, ретинобластома	Диета, гормоны	Ретиноиды, фолаты, химиотерапия	
Механизмы	ДНК adducts Мутации онкогены	Хромосомная и микросателлитная нестабильность, MI, MMR, Rb, BRCA1, TSG	Метилирование Ацетилирование гистонов	Селективное преимущество	
Мат. модели	Armitage-Doll	Knudson	Moolgavkar	Nowak	

При множественных опухолях у одного животного прогрессия в разных опухолях происходит независимо.	Гемобластозы, как правило, проходят две стадии: моноклоновую (доброкачественную) и поликлоновую - появление субклонов (злокачественную). Однако смена стадий происходит с неодинаковой частотой при разных формах гемобластозов и с неодинаковым интервалом.	Опухоли происходят из тканевых стволовых клеток
В разных клетках опухоли прогрессия происходит независимо.	Важнейшей особенностью гемобластозов является угнетение нормальных ростков кроветворения, в первую очередь нормального гомолога опухолевых клеток.	Локализация в особых областях (нишах) позволяет опухолевым стволовым клеткам реализовать свой потенциал (теория поля).
Прогрессия не зависит от роста. Она существует в покоящейся опухолевой клетке и в клетках опухолей, при которых есть арест роста.	Закономерна смена дифференцированных клеток, составляющих опухоль при хронических лейкозах и лимфоцитозах, бластными, определяющими развитие бластного лейкоза, или гематосаркомы.	Опухоль содержит такие же популяции клеток, как и нормальная ткань: родоначальные стволовые клетки, промежуточные делящиеся клетки и терминально-дифференцированные клетки (иерархическая модель).
Прогрессия является непрерывным или прерывистым процессом, развивающимся постепенно, или рывками.	Иммуноглобулинсекретирующая лимфатическая или плазматическая опухоль может потерять способность к секреции, что сопровождается качественными изменениями поведения опухоли и обычно ее бластной трансформацией.	Опухоли трансплантатобельны стволовыми клетками, но не промежуточными делящимися клетками (тумор-инициирующие клетки).
Прогрессия происходит по одному из альтернативных путей дифференцировки.	Опухолевые клетки, прежде всего бласты, могут терять ферментную специфичность цитоплазматических включений и становиться морфологически и цитохимически неидентифицируемыми.	Субстанции секретируемые опухолевой клеткой и свидетельствующие о определенном уровне фетальной дифференцировки могут использоваться в диагностике, прогнозе и лечении (onco-developmental markers).
Прогрессия не всегда достигает своей конечной точки.	Форма ядра и цитоплазмы бластных клеток претерпевает скачкообразные или постепенные изменения от круглой к неправильной и большей по площади.	Злокачественные клетки могут становиться доброкачественными (дифференцирующая терапия).
	Все внекостномозговые гемобластозы способны лейкоцизировать, т.е. метастазировать в костный мозг.	Дифференцирующая терапия направлена против промежуточных делящихся клеток. При прекращении терапии отмечается рост опухоли из резистентных стволовых клеток (резистентность к лечению – определяющее свойство СКО).
	Метастазы гемобластозов вне органов кроветворения отражают появление нового, адаптированного к данной ткани субклона, метастазы ведут себя в разных органах независимо, нередко они имеют разную чувствительность к цитостатическим комбинациям.	
	В условиях современной цитостатической терапии появление резистентности опухоли к ранее эффективному лечению означает качественно новый этап в ее развитии. В рецидиве опухоль иногда вновь оказывается чувствительной к прежней цитостатической терапии, если пролиферируют клетки опухолевого клона, доминирующего до рецидива.	