

© Коллектив авторов, 2020

Н.Е. КУШЛИНСКИЙ¹, Е.С. ГЕРШТЕЙН¹, Д.О. УТКИН², Н.А. ПЕТРИКОВА³, Д.Н. КУШЛИНСКИЙ⁴,
М.А. ШАБАНОВ¹, М.М. ХУЛАМХАНОВА¹, Л.А. АШРАФЯН⁴, И.С. СТИЛИДИ¹

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России; Москва, Россия

³ГБУ «Рязанский областной клинический онкологический диспансер», Рязань, Россия

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Цель. Анализ содержания растворимых форм ключевого рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с учетом основных клинических и морфологических характеристик заболевания.

Материалы и методы. В исследование включили 94 больных раком, 22 пациента — с доброкачественными и 9 — с пограничными опухолями яичников. Возраст пациенток 18–78 лет. Группу контроля составили 34 практически здоровых женщины 18–68 лет. Анализ уровней sPD-1 и sPD-L1 проводили в плазме крови у всех больных до лечения иммуноферментным анализом (ИФА) с помощью наборов реактивов (Affimetrix, eBioscience) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens, Германия).

Результаты. Уровень sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников не отличается от контроля, а у пациенток с доброкачественными опухолями — статистически значимо ниже, чем в контроле и у больных раком. Уровень sPD-1 у больных раком яичников повышен по сравнению с контролем ($p=0,03$). Взаимосвязи уровней маркеров с гистологическим строением и степенью дифференцировки рака яичников не обнаружено. Уровень sPD-L1 возрастает с увеличением стадии заболевания ($p<0,001$), значимо выше у пациенток с асцитом, чем у больных без асцита, и при двустороннем поражении яичников по сравнению с односторонним. Уровень sPD-1 не зависит от показателей распространенности рака яичников.

Заключение. Уровень sPD-L1 при раке яичников коррелирует с распространенностью процесса и может рассматриваться в качестве маркера для мониторинга анти-PD-1/PD-L1-терапии. Вопрос о клиническом значении sPD-1 требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: белки контрольных точек иммунитета, sPD-L1, sPD-1, рак яичников, плазма крови, иммунотерапия.

Вклад авторов. Кушлинский Н.Е.: концепция; Герштейн Е.С.: дизайн исследования, статистическая обработка данных; Уткин Д.О., Хуламханова М.М., Кушлинский Д.Н.: сбор и обработка материала; Шабанов М.А., Петрикова Н.А.: морфологические исследования; Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С.: написание текста; Ашрафян Л.А.: редактирование; Стилиди И.С.: общее руководство.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Уткин Д.О., Петрикова Н.А., Кушлинский Д.Н., Шабанов М.А., Хуламханова М.М., Ашрафян Л.А., Стилиди И.С. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические корреляции. Акушерство и гинекология. 2020; 6: 80-88
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.6.80-88>

©A group of authors, 2020

N.E. KUSHLINSKII¹, E.S. GERSHTEIN¹, D.O. UTKIN², N.A. PETRIKOVA³, D.N. KUSHLINSKII⁴,
M.A. SHABANOV¹, M.M. KHULAMKHANOVA¹, L.A. ASHRAFYAN⁴, I.S. STILIDI¹

SIGNALING PATHWAY COMPONENTS OF IMMUNE CHECKPOINT PD-1/PD-L1 IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH OVARIAN CANCER AND BENIGN OVARIAN TUMORS: CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CORRELATIONS

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

²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

³Ryazan Regional Clinical Oncology Dispensary, Ryazan, Russia.

⁴Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Objective. To analyze the contents of soluble programmed cell death receptor and its ligand (sPD-1/sPD-L1) in blood plasma of patients with ovarian cancer taking into consideration the main clinical and morphological characteristics of the disease.

Materials and methods. A total of 125 patients with ovarian neoplasms were enrolled in the study, including 94 patients with ovarian cancer, 22 patients with benign tumors and 9 patients with borderline ovarian tumors. The age of the patients was 18–78 years. The control group consisted of 34 healthy women aged 18–68 years. Before treatment all patients were performed the analysis of sPD-1 and sPD-L1 levels in blood plasma using standard ELISA kits (Affimetrix, eBioscience, USA) according to the manufacturer's instructions. Measurements were performed with immunoassay analyzer BEP 2000 Advance (Siemens, Germany).

Results. The level of plasma sPD-L1 in patients with ovarian cancer does not differ significantly from one in the control group, while this level is significantly lower in patients with benign tumors than in healthy controls and patients with ovarian cancer. The level of sPD-1 in patients with ovarian cancer is increased as compared to the healthy controls ($p=0.03$). There is no correlation of marker levels with the histological structure and degree of differentiation of ovarian cancer. The level of sPD-L1 rises with the increasing stage of the disease ($p<0.001$); it is significantly higher in patients with ascites and bilateral ovarian lesions than in patients without ascites and unilateral lesions. The level of sPD-1 does not depend on the prevalence of ovarian cancer.

Conclusion. The level of plasma sPD-L1 in patients with ovarian cancer correlates with the prevalence of the process and can be considered as a marker for monitoring anti-PD1/PD-L1 therapy. The clinical significance of sPD-1 is an important issue for future research.

Keywords: immunity checkpoint proteins, sPD-L1, sPD-1, ovarian cancer, blood plasma, immunotherapy.

Authors' contributions. Kushlinskii N.E.: the concept of the study; Gershtein E.S.: design of the study, statistical data processing; Utkin D.O., Khulamkhanova M.M., Kushlinskiy D.N.: collecting the material; Shabanov M.A., Petrikova N.A.: morphological studies; Kushlinskii N.E., Gershtein E.S.: writing the text; Ashrafyan L.A.: editing the text; Stilidi I.S.: research supervision.

Conflict of interests. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financing. The investigation has not been sponsored.

For reference: Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Utkin D.O., Petrikova N.A., Kushlinskiy D.N., Shabanov M.A., Khulamkhanova M.M., Ashrafyan L.A., Stilidi I.S. Signaling Pathway Components of Immune Checkpoint PD-1/PD-L1 in Blood Plasma of Patients with Ovarian Cancer and Benign Ovarian Tumors: Clinical and Morphological Correlations. *Akusherstvo i Ginekologiya / Obstetrics and Gynecology*. 2020; 6: 80–88 (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.6.80-88>

Рак яичников — одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний женских половых органов, которое, несмотря на наличие достаточно специфичных и чувствительных серологических маркеров, у большинства пациенток по-прежнему диагностируется на поздних стадиях, когда опухоль уже распространена по брюшине. Современные стандарты лечения рака яичников, наряду с активным хирургическим вмешательством, включают различные схемы адъювантной и неoadъювантной химиотерапии, в первую очередь на основе препаратов платины, которые во многих случаях оказываются весьма эффективными. Однако процент рецидивов и смертность все еще остаются высокими. В настоящее время многие исследователи и

клиницисты связывают возможность дальнейшего прогресса в повышении эффективности лечения этого заболевания не только с рациональным использованием существующих методов комбинированного и комплексного лечения, но и с разработкой принципиально новых патогенетических подходов, основанных на современных достижениях биохимии, молекулярной биологии и иммунологии опухолей.

Следует отметить, что многолетние попытки использовать в лечении рака яичников различные виды гормонотерапии так и не привели к значительному успеху; не нашли пока своего места в лечении данного заболевания и современные молекулярно-направленные («таргетные») препара-

раты. В последние годы значительный интерес и надежды вызывает возможность иммунотерапевтического воздействия на рак яичников, направленного на подавление активности одного из сигнальных путей так называемых «контрольных точек иммунитета» – PD-1/PD-L, который в физиологических условиях контролирует выраженность и длительность аутоиммунного ответа, предотвращая повреждение собственных тканей [1–3].

Основными компонентами этого сигнального пути являются: белок программируемой клеточной гибели PD-1 (programmed cell death protein 1) и два его лиганда: PD-L1 и PD-L2. PD-1 представляет собой мембранный рецептор 1-го типа, принадлежащий к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток и экспрессирующийся на их поверхности. Из лигандов наиболее значим PD-L1, известный также, как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1-го типа (B7-H1). В норме PD-L1 экспрессируется на антигенпрезентирующих дендритных и макрофагоподобных клетках периферических органов, а также на клетках плаценты, островков поджелудочной железы и сетчатки. В то же время мРНК PD-L1 обнаружена в значительно более широком спектре тканей, а индуцированная экспрессия PD-L1 может наблюдаться и на Т- и В-лимфоцитах, естественных киллерах, макрофагах, мезенхимальных стволовых и эпителиальных клетках. Активация PD-1/PD-L1-пути стимулирует апоптоз антигенспецифичных Т-клеток в лимфоузлах и одновременно подавляет апоптоз регуляторных супрессорных Т-клеток, что позволяет опухоли уйти от иммунного ответа организма. В связи с этим моноклональные антитела к PD-1 и PD-L1, предотвращающие их взаимодействие друг с другом и ингибирующие иммуносупрессивные эффекты опухолей, находят сейчас активное применение в терапии многих онкологических заболеваний, в первую очередь меланомы [4] и почечно-клеточной карциномы [5, 6]. В последние годы предпринимаются достаточно серьезные попытки применения этого вида иммунотерапии при раке яичников, в том числе резистентном к препаратам платины [3, 7].

Экспрессию PD-1 и/или PD-L1 в опухолях и инфильтрирующих опухоль лимфоцитах активно изучают иммуногистохимическими (ИГХ) методами в качестве предиктора эффективности анти-PD-1/PD-L-иммунотерапии [8]. Эти белки рассматривают и как молекулярные маркеры общего прогноза течения онкологических заболеваний и выживаемости пациентов, и в некоторых предварительных исследованиях уже продемонстрировано неблагоприятное влияние высокой активности PD-1/PD-L-пути на клиническое течение целого ряда опухолей [9–12]. В немногочисленных исследованиях последних лет показана положительная взаимосвязь экспрессии PD-1 и/или PD-L1 при раке яичников с распространенностью и степенью злокачественности опухоли [13, 14], ее ассоциация с наличием мутаций генов *BRCA1/2* и *TP53* [15, 16] и микросателлитной нестабильностью, являющейся одним из показателей чувствительности к анти-PD-1/PD-L-терапии [17]. Продемонстрирована

также экспрессия этих белков на инфильтрирующих опухоль макрофагах и лимфоцитах, неоднозначно влияющая на выживаемость пациенток.

В то же время, по данным ряда крупных рандомизированных исследований, связь результатов ИГХ-определения экспрессии PD-1 и PD-L1 в опухолях с эффективностью анти-PD-1-терапии оказалась неоднозначной и, по-видимому, зависит от вида злокачественного новообразования [8, 18]. Скорее всего, наличие этих противоречий связано с трудностями стандартизации ИГХ-метода, результаты которого зависят от техники подготовки образцов, применяемых антител, различающихся по специфичности и сродству к различным эпитопам исследуемых белков, а также от критериев, используемых при интерпретации полученных данных. Одной из важнейших проблем ИГХ-тестирования PD-1 и PD-L1 является и то, что эти молекулы экспрессируются не только на клетках самой опухоли, но и на инфильтрирующих ее клетках иммунной системы. Причем на данном этапе исследований неизвестно, какой тип экспрессии более значим для предсказания ответа на иммунотерапию. Другой проблемой является наличие не связанных с мембранной формой данных белков, которые могут давать ложноположительные результаты; при этом их роль в патогенезе опухолей пока не очень ясна.

В решении хотя бы части проблем, связанных с ИГХ-тестированием, может помочь исследование растворимых форм PD-1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1), обнаруженных относительно недавно в периферической крови, в том числе и онкологических больных [19]. Происхождение sPD-1 и sPD-L1 пока точно не установлено, однако, как и растворимые формы других мембранных белков, они могут образовываться либо в результате гидролитического отщепления внеклеточного домена мембраносвязанной молекулы, либо на более раннем этапе – при альтернативном сплайсинге мРНК этой нативной мембранной формы. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что sPD-L1 образуется преимущественно в результате протеолитического отщепления внеклеточной части трансмембранного белка, тогда как sPD-1 – в результате альтернативного сплайсинга. В экспериментальных исследованиях показана способность sPD-1 подавлять активность PD-1/PD-L1(2)-пути, блокируя связывание находящегося на опухолевых клетках лиганда с мембранным рецептором Т-лимфоцитов. sPD-L1 также способен снизить активность PD-1/PD-L1(2)-пути, блокируя рецептор, но, по некоторым данным, может также стимулировать апоптоз Т-лимфоцитов, аналогично мембранному белку, т.е. подавлять противоопухолевый иммунитет.

Большинство публикаций о роли sPD-1 и sPD-L1 при разных онкологических заболеваниях, вышедших в последние несколько лет, суммированы в фундаментальном обзоре [19], а также в метааналитических работах [20, 21], однако это направление активно развивается, и еще несколько исследований опубликовано уже после выхода этих обзорных статей [22–26]. Недавно мы провели пилотное исследование, включавшее 62 больных с новоо-

бразованиями яичников, и показали, что уровень sPD-L1, но не sPD-1, коррелирует с распространенностью рака яичников [27]. В настоящее время обследованные группы больных раком и доброкачественными опухолями яичников существенно расширены, что позволило более репрезентативно оценить клиническое значение исследуемых маркеров.

Цель настоящего исследования – анализ содержания растворимых форм PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных злокачественными, пограничными и доброкачественными новообразованиями яичников и их взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками рака яичников.

Материалы и методы

В исследование вошли 125 больных новообразованиями яичников в возрасте от 18 до 78 лет (медиана – 54 года), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, в отделении онкогинекологии Рязанского областного клинического онкологического диспансера, в отделении инновационной онкологии и гинекологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ в период с марта 2017 по апрель 2018 гг. Из 125 обследованных пациенток у 22 (18%) выявлены доброкачественные новообразования яичников, у 9 (7%) – пограничные и у 94 (75%) – рак яичников. В качестве контроля обследованы 34 практически здоровых женщины в возрасте от 18 до 68 лет (медиана – 44 года).

У 14 из 22 больных с доброкачественными опухолями выявлены серозные цистаденомы (у 1 – с муцинозным компонентом), у 4 – эндометриоидные, у 2 – муцинозная сосочковая цистаденома и у 2 – серозная киста яичников. Среди больных с пограничными опухолями у 6 (67%) они имели серозный и у 3 (33%) – муцинозный гистологический тип.

Стадирование и гистологическая классификация злокачественных опухолей яичников проведены в соответствии с рекомендациями Международной федерации акушерства и гинекологии (FIGO) 2014 г. IA стадия выявлена у 4, IB – у 2, IC – у 18 больных; 3 пациентки имели IB, 6 – IC, 9 – IIIA, 6 – IIIB, 41 – IIIC и 4 – IV стадию заболевания; также обследована 1 больная с карциномой *in situ*. Из-за небольшого размера подгрупп при статистическом анализе пациенты были объединены в 4 группы: I стадия – 25; II – 9; IIIA – 15, IIIC и IV – 45 человек. По гистологическому строению у 72 пациенток выявлены серозные, у 10 – эндометриоидные и у 7 – муцинозные аденокарциномы яичников; у одной пациентки выявлен светлоклеточный, у 1 – аденогенный и у 1 – недифференцируемый рак яичников.

Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, ГБУ «Рязанский областной клинический онкологический диспансер», ФГБУ «Национальный медицинский исследу-

вательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 определяли в плазме крови, полученной по стандартной методике с использованием ЭДТА до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA и Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

Статистическая обработка данных

Поскольку распределение изучаемых показателей отличалось от нормального, при сравнении показателей и анализе их взаимосвязей с клинико-морфологическими факторами использовали непараметрические критерии: Манна–Уитни – при сравнении 2 независимых групп, Краскела–Уоллиса – при сравнении 3 и более независимых групп; тест корреляции рангов Спирмена (rs). В таблицах представлены показатели медианы (Me) и квартилей (Q1;Q3). Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для расчетов использовали программу Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены показатели концентрации sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови больных с различными новообразованиями яичников и группы контроля. Уровень sPD-L1 в плазме больных раком яичников заметно ниже, чем в контрольной группе (медианы 43,8 и 61,5 пг/мл соответственно), хотя различие не достигает уровня статистической значимости. При этом у пациенток с доброкачественными опухолями уровень sPD-L1 (медиана 22,7 пг/мл) статистически значимо снижен как по сравнению с контролем, так и относительно больных раком яичников ($p < 0,01$). Уровень этого маркера также значительно снижен при пограничных опухолях (медиана 28,7 пг/мл), но различия с контролем и с группой больных раком яичников не достигают порога статистической значимости, что, скорее всего, связано с небольшим числом наблюдений.

Содержание sPD-1 в плазме больных раком яичников незначительно, но статистически значимо повышено по сравнению с контролем (медианы 49,8 и 43,8 пг/мл соответственно; $p = 0,02$), а также выше, чем у пациенток с пограничными опухолями (медиана 39,2 пг/мл; $p = 0,004$). Наиболее высокий уровень sPD-1 обнаружен в плазме крови пациенток с доброкачественными новообразованиями яичников (медиана 55,6 пг/мл), причем различия с контролем и пациентками с пограничными опухолями статистически значимы ($p = 0,005$ и $p = 0,004$ соответственно). Корреляции между уровнями sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови ни в одной из обследованных групп не обнаружено.

Значимой взаимосвязи уровней sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови с возрастом и менопаузным статусом ни у пациенток, ни в контрольной группе не выявлено, хотя в литературе описано увеличение уровня sPD-L1 с возрастом [22].

У большинства обследованных пациенток (77%) аденокарциномы яичников относились к серозному типу, эндометриоидные и муцинозные раки составили соответственно 11% и 7%. Еще три гистологических типа (светлоклеточный, аденогенный и недифференцируемый рак) представлены единичными наблюдениями. Статистические значимых различий уровней sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови в зависимости от гистологического строения рака яичников не обнаружено (табл. 2).

Степень дифференцировки опухоли удалось оценить у 89 пациенток: 53% опухолей были отнесены к низкой степени дифференцировки, умеренно дифференцированные опухоли составили 25%, высокодифференцированные – 22% (см. табл. 2). Уровни sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови больных раком яичников от степени дифференцировки опухоли не зависели.

При анализе уровней исследуемых маркеров в плазме крови в зависимости от показателей распространенности рака яичников (табл. 3) установлено, что уровень sPD-L1 статистически значимо возрос с увеличением стадии заболевания – от

17,8 пг/мл при I стадии до 94,1 пг/мл при IV стадии ($p < 0,001$ по тесту Краскела-Уоллиса; $r_s = 0,52$; $p < 0,001$). Таким образом, наблюдавшееся в общей группе пациенток снижение уровня sPD-L1, по сравнению с контролем, происходит полностью за счет показателей маркеров у больных I–II и в меньшей степени – III–IV стадий. Уже при I–II стадиях, характеризующейся наличием внутрибрюшинных метастазов за пределами таза и/или в регионарных лимфоузлах, уровень маркера практически равен контрольному, составляя 59,9 пг/мл. Концентрация sPD-1 в плазме крови не зависит статистически значимо от стадии рака яичников, хотя по медиане в 1,5 раза ниже при I стадии, чем при IV ($p = 0,02$; см. табл. 3).

Статистически значимых различий уровней данного маркера в зависимости от размера первичной опухоли при одностороннем поражении яичников не выявлено, однако при двустороннем поражении уровень sPD-L1 вдвое выше, чем при одностороннем ($p = 0,03$; см. табл. 3). Уровень sPD-L1 у пациенток с асцитом более чем вдвое выше, чем у больных без асцита ($p < 0,001$; см. табл. 3). Для sPD-1 наблюдаются противоположные тенденции – он снижен у больных с двусторонним поражением яичников и при наличии асцита (различия не достигают порога статистической значимости).

Таблица 1. Содержание sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови больных с опухолями яичников и группы контроля

Обследованные группы	n	sPD-L1, пг/мл		sPD-1, пг/мл	
		Диапазон	Me Q1;Q3	Диапазон	Me Q1;Q3
Больные раком яичников (группа 1)	94	0–176	43,8 21,2; 84,7	18,6–219	49,8 ³ 37,8; 64,2
Больные с пограничными опухолями яичников (группа 2)	9	10,3–113	28,7 18,1; 61,8	30,2–52,9	39,2 ⁴ 30,9; 45,8
Больные с доброкачественными опухолями (группа 3)	22	5,9–154	22,7 ^{1,2} 14,0; 49,8	32,1–150	55,6 ⁵ 41,9; 85,3
Контроль	34	7,6–149	61,5 29,2; 91,7	19,1–66,4	43,8 37,7; 53,8

¹ $p_{3-1} = 0,04$; ² $p_{3-к} = 0,002$; ³ $p_{1-к} = 0,02$; ⁴ $p_{2-3} = 0,004$; ⁵ $p_{3-к} = 0,005$.

Таблица 2. Содержание sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли

Данные гистологического исследования	n	sPD-L1, пг/мл		sPD-1, пг/мл	
		Me Q1;Q3	Me Q1;Q3	Me Q1;Q3	Me Q1;Q3
Гистологическое строение опухоли					
Серозный рак	72	43,3 21,7; 87,6	49,7 37,7; 64,5		
Муцинозный рак	7	46,9 12,4; 77,1	44,0 32,8; 59,1		
Эндометриоидный рак	10	47,6 23,7; 64,7	51,9 40,7; 68,8		
Степень дифференцировки опухоли					
Высокая	15	43,3 24,7; 86,4	48,3 32,5; 55,3		
Умеренная	24	41,3 14,5; 65,4	45,9 37,8; 62,6		
Низкая	50	45,0 23,5; 102	53,0 40,1; 70,6		

Содержание СА-125 в сыворотке крови определено у 86 больных раком яичников (2,7–9970; медиана 308 Ед/л) и 8 пациенток с пограничными опухолями (25–3109; медиана 455 Ед/мл). Уровень sPD-L1 (но не sPD-1) слабо, но статистически значимо положительно коррелировал с уровнем СА-125 ($r_s=0,36$; $p<0,001$). У 36 пациенток определен также уровень маркера HE4 (36,8–8049; медиана 257 пмоль/л), который еще более значимо положительно коррелировал с sPD-L1 ($r_s=0,54$; $p<0,001$).

Таким образом, уровень sPD-L1 – растворимой формы ключевого лиганда белка контролируемой клеточной гибели PD-1 – в плазме крови больных раком яичников не отличается от показателей группы контроля, но увеличивается по мере нарастания распространенности процесса, а также коррелирует с уровнем классических маркеров рака яичников СА-125 и HE4. По данным литературы, увеличение концентрации sPD-L1 в сыворотке или плазме крови на поздних стадиях заболевания наблюдали также у больных раком желудка [28], печени [29], почки, немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [30], некоторыми видами лимфом [24]. Для этих заболеваний показано неблагоприятное влияние высоких уровней sPD-L1 в периферической крови на выживаемость пациентов. В большинстве этих публикаций, в том числе и в нашем исследовании больных почечно-клеточным раком [26], обнаружено также повышение уровня sPD-L1 у онкологических больных по сравнению с контролем. В то

же время представленные в литературе данные по плоскоклеточному раку головы и шеи противоречивы, а при раке поджелудочной железы и раке шейки матки статистически значимого увеличения уровня sPD-L1 и его взаимосвязи с клинико-морфологическими факторами не выявлено [19].

В отличие от лиганда, уровень растворимого рецептора sPD-1 мало зависит от распространенности рака яичников, его уровень не коррелирует с уровнями СА-125 и HE4. Более того, отмечается тенденция к снижению уровня sPD-1 на поздних стадиях, при двустороннем поражении яичников и наличии асцита. Публикаций, посвященных клиническому значению sPD-1, очень мало. Описано повышение уровня данного маркера на фоне успешного лечения больных НМРЛ эрлотинобом, его взаимосвязь с риском развития гепатоцеллюлярного рака у больных гепатитом С, а при исследовании больных раком поджелудочной железы, шейки матки, головы и шеи взаимосвязи уровней sPD-1 с распространенностью процесса и прогнозом заболевания не обнаружено [19].

К сожалению, по большинству локализаций опубликованы только единичные исследования (в особенности это касается sPD-1), в которых использованы разнообразные тест-системы и биологический материал (либо сыворотка, либо плазма крови). Все это приводит к значительному разбросу получаемых результатов и невозможности на данном этапе определить четкие пороговые значения

Таблица 3. Содержание sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови больных с учетом показателей распространенности рака яичников

Показатель распространенности	n	sPD-L1, пг/мл		sPD-1, пг/мл	
		Me	Q1;Q3	Me	Q1;Q3
Стадия¹					
I	25	17,8	9,2; 53,2	44,1	35,5; 51,2
II	9	20,4	12,4;37,3	56,5	49,7; 60,9
IIIА–В	15	31,7	23,5; 83,5	53,0	40,6; 71,5
IIIC	41	59,9	43,3;105	50,3	37,8;69,5
IV	4	94,1	85,4;115	67,0	51,7; 92,9
Размер опухоли по данным УЗИ					
<5 см	10	37,8	24,7;71,2	50,8	44,1; 71,0
5–10 см	25	42,0	21,2;49,8	55,3	42,9;68,0
<10 см	31	42,4	13,5;79,5	50,1	37,8; 64,3
Двустороннее поражение	28	82,0 ²	30,6;115	41,7	35,8; 55,2
Наличие асцита					
Да	48	69,0 ³	42,0;106	44,9	35,3; 64,3
Нет	46	31,1	15,5;46,9	51,9	44,1;65,8

¹ $p<0,001$ по тесту Краскела–Уоллиса; ² $p=0,03$ при сравнении больных с двусторонним и односторонним поражением яичников; ³ $p<0,001$.

для предиктивных, прогностических и диагностических целей. В частности, в единственном исследовании sPD-L1 при новообразованиях яичников [25] использовали систему, разработанную непосредственно в лаборатории авторов, тогда как наше исследование выполнено в плазме крови с помощью стандартизованных наборов реактивов для иммуноферментного анализа.

В последние годы опубликовано несколько работ о роли сигнальной системы PD-1/PD-L при раке яичников, причем их экспрессию оценивали как на опухолевых клетках, так и на инфильтрирующих опухоль клеток иммунной системы, используя не только ИГХ-метод [13, 14], но и определение соответствующих мРНК [16]. Можно отметить продемонстрированное в одном из этих исследований [13] увеличение экспрессии PD-L1 при распространенном процессе и в опухолях высокой степени злокачественности, совпадающее с некоторыми закономерностями, выявленными нами для sPD-L1 в плазме крови. В то же время J. Chatterjee et al. [25], изучавшие sPD-L1 в плазме, не сравнивали полученные данные с клинико-морфологическими факторами и прогнозом заболевания, но, в отличие от нас, выявили статистически значимое увеличение уровня маркера у больных раком яичников по сравнению с контролем и пациентками с доброкачественными опухолями. Как уже отмечено, это может быть связано с принципиальным различием использованных иммуноферментных методов.

Заключение

На основании проведенного сравнительного иммуноферментного исследования содержания растворимых форм компонентов сигнального пути одной из ключевых контрольных точек иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком, доброкачественными, пограничными новообразованиями яичников и здоровых женщин можно сделать вывод о том, что уровень растворимого лиганда sPD-L1 у больных раком яичников не отличается от контроля, но статистически значимо возрастает по мере увеличения распространенности опухолевого процесса. У больных с доброкачественными опухолями яичников концентрация sPD-L1 статистически значимо ниже, чем в контроле и при раке яичников. В то же время уровень растворимого рецептора sPD-1 у больных раком яичников выше, чем у здоровых женщин, однако его показатели не связаны с распространенностью заболевания. На основании полученных данных, а также опубликованных результатов исследования sPD-L1 при опухолях других локализациях можно предположить, что циркулирующий в периферической крови sPD-L1 взаимодействует с PD-1 на супрессорных Т-лимфоцитах и блокирует их функцию так же, как мембранная форма лиганда, способствуя ускользанию опухоли от иммунного ответа и прогрессированию болезни. Однако существование такого механизма пока еще не доказано. Более неодно-

значным является вопрос о клиническом значении растворимого рецептора sPD-1, уровень которого не зависит от распространенности рака яичников. Полученные нами данные позволяют предполагать, что растворимый лиганд sPD-L1, но не его рецептор sPD-1, может быть потенциально значимым фактором прогноза рака яичников. Кроме того, следует отметить, что наибольший интерес для онкологов может представлять исследование динамики растворимых форм sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови больных раком яичников на фоне специфической анти-PD-1/PD-L-терапии для оценки ее эффективности.

Литература/References

1. Zhu X., Lang J. The significance and therapeutic potential of PD-1 and its ligands in ovarian cancer: a systematic review. *Gynecol. Oncol.* 2016; 142(1): 184-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.04.002>.
2. Mandai M., Hamanishi J., Abiko K., Matsumura N., Baba T., Konishi I. Anti-PD-L1/PD-1 immune therapies in ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application. *Int. J. Clin. Oncol.* 2016; 21(3): 456-61. <https://dx.doi.org/10.1007/s10147-016-0968-y>.
3. Inayama Y., Hamanishi J., Matsumura N., Murakami R., Abiko K., Yamaguchi K. et al. Antitumor effect of nivolumab on subsequent chemotherapy for platinum-resistant ovarian cancer. *Oncologist.* 2018; 23(11): 1382-4. <https://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0167>.
4. Yun S., Vincelette N.D., Green M.R., Wahner Hendrickson A.E., Abraham I. Targeting immune checkpoints in unresectable metastatic cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 agents trials. *Cancer Med.* 2016; 5(7): 1481-91. <https://dx.doi.org/10.1002/cam4.732>.
5. Massari F., Santoni M., Ciccarese C., Santini D., Alfieri S., Martignoni G. et al. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. *Cancer Treat. Rev.* 2015; 41(2): 114-21. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.12.013>.
6. Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Морозов А.А., Герштейн Е.С., Кадагидзе З.Г., Матвеев В.Б. Современные подходы к иммунотерапии рака почки. *Онкоурология.* 2018; 14(2): 54-67. <https://dx.doi.org/10.17650/1726-9776-2018-14-2-54-67>. [Kushlinskii N.E., Fridman M.V., Morozov A.A., Gershtein E.S., Kadagidze Z.G., Matveev V.B. Modern approaches to kidney cancer immunotherapy. *Cancer Urology.* 2018; 14(2): 54-67. (In Russian)].
7. Zhu X., Xu J., Cai H., Lang J. Carboplatin and programmed death-ligand 1 blockade synergistically produce a similar antitumor effect to carboplatin alone in murine ID8 ovarian cancer model. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2018; 44(2): 303-11. <https://dx.doi.org/10.1111/jog.13521>.
8. Yuasa T., Masuda H., Yamamoto S., Numao N., Yonese J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *Int. J. Clin. Oncol.* 2017; 22(4): 629-34. <https://dx.doi.org/10.1007/s10147-017-1122-1>.
9. Zhang Y., Kang S., Shen J., He J., Jiang L., Wang W. et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94(6): e515. <https://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000000515>.
10. Sacher A.G., Gandhi L. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: a review. *JAMA Oncol.* 2016; 2(9): 1217-22. <https://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0639>.
11. Kim K.S., Sekar R.R., Patil D., Dimarco M.A., Kissick H.T., Bilen M.A. et al. Evaluation of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression as a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2018; 7(4): e1413519. <https://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2017.1413519>.
12. Huang X., Zhang W., Zhang Z., Shi D., Wu F., Zhong B., Shao Z. Prognostic value of programmed cell death 1 ligand-1 (PD-L1) or PD-1 expression in patients

- with osteosarcoma: a meta-analysis. *J. Cancer*. 2018; 9(14): 2525-31. <https://dx.doi.org/10.7150/jca.25011>.
13. *Drakes M.L., Mehrotra S., Aldulescu M., Potkul R.K., Liu Y., Grisoli A.* et al. Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand-1 (PD-L1) in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 2018; 11(1): 43. <https://dx.doi.org/10.1186/s13048-018-0414-z>.
 14. *Darb-Esfahani S., Kunze C.A., Kulbe H., Sehoul J., Wienert S., Lindner J.* et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(2): 1486-99. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6429>.
 15. *Strickland K.C., Howitt B.E., Shukla S.A., Rodig S., Ritterhouse L.L., Liu J. F.* et al. Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(12): 13587-98. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7277>.
 16. *Wieser V., Gaugg I., Fleischer M., Shivalingaiah G., Wenzel S., Sprung S.* et al. BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2018; 9(25): 17501-11. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.24770>.
 17. *Howitt B.E., Strickland K.C., Sholl L.M., Rodig S., Ritterhouse L.L., Chowdhury D.* et al. Clear cell ovarian cancers with microsatellite instability: A unique subset of ovarian cancers with increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression. *Oncoimmunology*. 2017; 6(2): e1277308. <https://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1277308>.
 18. *Topalian S.L., Taube J.M., Anders R.A., Pardoll D.M.* Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2016; 16(5): 275-87. <https://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.36>.
 19. *Zhu X., Lang J.* Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(57): 97671-82. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.18311>.
 20. *Ding Y., Sun C., Li J., Hu L., Li M., Liu J.* et al. The prognostic significance of soluble programmed death ligand 1 expression in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Immunol.* 2017; 86(5): 361-7. <https://dx.doi.org/10.1111/sji.12596>.
 21. *Wei W., Xu B., Wang Y., Wu C., Jiang J., Wu C.* Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(3): e9617. <https://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000009617>.
 22. *Theodoraki M.N., Yemeli S.S., Hoffmann T.K., Gooding W.E., Whiteside T.L.* Clinical significance of PD-L1(+) exosomes in plasma of head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24(4): 896-905. <https://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2664>.
 23. *Kim H.J., Park S., Kim K.J., Seong J.* Clinical significance of soluble programmed cell death ligand-1 (sPD-L1) in hepatocellular carcinoma patients treated with radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2018; 129(1): 130-5. <https://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2017.11.027>.
 24. *Guo X., Wang J., Jin J., Chen H., Zhen Z., Jiang W.* et al. High serum level of soluble programmed death ligand 1 is associated with a poor prognosis in Hodgkin lymphoma. *Transl. Oncol.* 2018; 11(3): 779-85. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2018.03.012>.
 25. *Chatterjee J., Dai W., Aziz N.H.A., Teo P.Y., Wahba J., Phelps D.L.* et al. Clinical use of programmed cell death-1 and its ligand expression as discriminatory and predictive markers in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23(13): 3453-60. <https://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2366>.
 26. *Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Морозов А.А., Горячева И.О., Филипенко М.Л., Алферов А.А., Бежанова С.Д., Базаев В.В., Казанцева И. А.* Растворимый лиганд рецептора контрольной точки иммунитета (sPD-L1) в сыворотке крови при почечно-клеточном раке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018; 166(9): 325-9. [Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Morozov A.A., Goryatcheva I.O., Filipenko M.L., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Bazaev V.V., Kazantseva I.A. Soluble ligand of immune checkpoint receptor (sPD-L1) in blood serum of renal-cell carcinoma patients: clinical and pathologic correlations. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 166(9): 325-9 (In Russian)].
 27. *Герштейн Е.С., Уткин Д.О., Горячева И.О., Хуламханова М.М., Петрикова Н.А., Виноградов И.И., Алферов А.А., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е.* Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников Альманах клинической медицины. 2018; 46(7): 690-8. [Gershtein E.S., Utkin D.O., Goryatcheva I.O., Khulamkhanova M.M., Petrikova N.A., Vinogradov I.I., Alferov A.A., Kushlinskii N.E. Soluble forms of immune checkpoint receptor PD-1 and its ligand PD-L1 in blood plasma of ovarian neoplasms patients. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018; 46 (4): 323–329. (In Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18786/2072-0505-2018-46-4-323-329>.
 28. *Zheng Z., Bu Z., Liu X., Zhang L., Li Z., Wu A.* et al. Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications. *Chin. J. Cancer Res.* 2014;26(1): 104-111. <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.02.08>.
 29. *Finkelmeier F., Canli O., Tal A., Pleli T., Trojan J., Schmidt M.* et al. High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis. *Eur. J. Cancer*. 2016; 59: 152-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.002>.
 30. *Zhang J., Gao J., Li Y., Nie J., Dai L., Hu W.* et al. Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac. Cancer*. 20156(4): 534-8. <https://dx.doi.org/10.1111/1759-7714.12247>.

Поступила 09.01.2020

Принята в печать 02.06.2020

Received 09.01.2020

Accepted 02.06.2020

Сведения об авторах:

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. E-mail: kne3108@gmail.com. 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Герштейн Елена Сергеевна, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической биохимии отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. E-mail: esgershtein@gmail.com. 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Уткин Дмитрий Олегович, соискатель, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России. E-mail: utkindo@yandex.ru. 127473, Россия, Москва, ул. Делегатская, д. 20/1.

Петрикова Наталья Александровна, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения с патоморфологической лабораторией ГБУ «Рязанский областной клинический онкологический диспансер». E-mail: petrikova.nat@yandex.ru. 390047, Россия, Рязань, ул. Спортивная, д. 13.

Кушлинский Дмитрий Николаевич, к.м.н., ст. научн. сотр. отделения комбинированных и хирургических методов лечения гинекологических заболеваний МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. E-mail: drkushlinskiy@gmail.com. 117198, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, 4.

Шабанов Михаил Александрович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник патологоанатомического отделения отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. E-mail: 0152@mail.ru. 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Хуламханова Марина Муратовна, врач-онколог, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. E-mail: marina_2705@list.ru. 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Ашрафян Лев Андреевич, д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ. E-mail: Levaa@yahoo.com.

117198, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Стилиди Иван Сократович, д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. E-mail: Stylidi@ronc.ru.

115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

About the authors:

Nikolay E. Kushlinskiy, MD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: kne3108@gmail.com. 115478, Moscow, Kashirskoje shosse, 24, Russia.

Elena S. Gershtein, PhD, Doctor Biol. Sci, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Biochemistry, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.

E-mail: esgershtein@gmail.com. 115478, Moscow, Kashirskoje shosse, 24, Russia.

Dmitry O. Utkin, applicant, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. E-mail: utkindo@yandex.ru. 127473, Moscow, Delegatskaja str., 20/1, Russia.

Natalya A. Petrikova, Pathologist, Department of Pathologic Anatomy with Pathomorphologic Laboratory, Ryazan State Medical University named after academician I.P.Pavlov.

E-mail: petrikova.nat@yandex.ru. 390047, Ryazan, Sportivnaja str., 13, Russia.

Dmitry N. Kushlinskiy, senior researcher, Department of combined and surgical methods of treatment of gynecological diseases A.F. Tsyb Medical Radiological Research

Center – Branch of the National Medical Research Center of Radiology. E-mail: drkushlinskiy@gmail.com. 117198, Moscow, Ac. Oparina str., 4, Russia.

Mikhail A. Shabanov, MD, Professor, leading researcher, Department of morphologic and molecular genetic tumor diagnostics, N.N. Blokhin National Medical Research

Center of Oncology. E-mail: 0152@mail.ru. 115478, Moscow, Kashirskoje shosse, 24, Russia.

Marina M. Khulamkhanova, oncologist, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: marina_2705@list.ru.

115478, Moscow, Kashirskoje shosse, 24, Russia.

Lev A. Ashrafyan, MD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Oncogynecology and Mammology, Research Center for Obstetrics,

Gynecology and Perinatology named after V.I.Kulakov. E-mail: Levaa@yahoo.com. 117198, Moscow, Ac. Oparina str., 4, Russia.

Ivan S. Stiliidi, MD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, director of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: Stylidi@ronc.ru.

115478, Moscow, Kashirskoje shosse, 24, Russia.