

Роль GD2 как диагностического и прогностического опухолевого маркера при нейробластоме (обзор литературы)

Н.С. Иванов, Д.Ю. Качанов, С.С. Ларин, М.Д. Моллаев, Д.М. Коновалов, Т.В. Шаманская
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контактные данные: Николай Сергеевич Иванов greatinsmd@gmail.com

Нейробластома (НБ) — редкая злокачественная опухоль, которая характеризуется крайне вариабельным биологическим поведением, включающим спонтанную и индуцированную регрессию, созревание и прогрессию. Для оценки прогноза и ответа на терапию при НБ используется определение ряда онкологических маркеров, таких как нейрон-специфическая енолаза, лактат-дегидрогеназа, ферритин. Тем не менее разработанные до настоящего момента модели оценки прогноза не позволяют полностью предсказать специфику течения заболевания. В связи с этим создание методов мониторинга статуса опухоли в режиме реального времени, основанное на анализе циркулирующих опухолевых биомаркеров, представляется чрезвычайно актуальным. Характерной особенностью НБ является экспрессия на поверхности опухолевых клеток различных ганглиозидов. В частности, до 30 % всех ганглиозидов достигает содержание дисialogанглиозида GD2. При этом уровень экспрессии GD2 зависит от дифференцировки нейрогенных опухолей: наибольшие концентрации определяются на клетках НБ, наименьшие — на ганглионейробластоме и ганглионейроме. Феномен «shedding», так называемого смыывания, GD2 с мембраны клеток НБ позволяет оценивать его концентрации в периферическом кровотоке. В статье рассмотрен эволюционный путь методологии детекции GD2 в сыворотке крови с акцентом на недавно пришедшую в медицинскую отрасль методику жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, применение которой может стать отправной точкой в становлении GD2 как растворимого биомаркера опухолевого процесса, безусловно, являющегося мощным приложением в клинической практике, дающим надежду на улучшение диагностики, прогноза и стратегии риск-адаптированной терапии, основанных на четко определенных, измеримых детерминантах в соответствии с концепцией доказательной медицины.

Ключевые слова: нейробластома, дети, GD2

Для цитирования: Иванов Н.С., Качанов Д.Ю., Ларин С.С., Моллаев М.Д., Коновалов Д.М., Шаманская Т.В. Роль GD2 как диагностического и прогностического опухолевого маркера при нейробластоме (обзор литературы). Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2021;8(4):47–59.

The role of GD2 as a diagnostic and prognostic tumor marker in neuroblastoma (literature review)

N.S. Ivanov, D. Yu. Kachanov, S.S. Larin, M.D. Mollaev, D.M. Kononov, T.V. Shamanskaya

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia;
1 Samory Mashela St., Moscow, 117198, Russia

Neuroblastoma (NB) is a rare malignant tumor characterized by highly variable biological behavior, including spontaneous and induced regression, maturation, and progression. To assess the prognosis and response to therapy in NB, the determination of a number of oncological markers is used, such as neuron-specific enolase, lactate dehydrogenase, ferritin. Nevertheless, the models for assessing the prognosis developed so far do not fully predict the specificity of the course of the disease. In this regard, the creation of methods for monitoring tumor status in real time, based on the analysis of circulating tumor biomarkers, seems to be extremely urgent. A characteristic feature of NB is the expression of various gangliosides on the surface of tumor cells. In particular, the content of disialoganglioside GD2 reaches up to 30 % of all gangliosides. At the same time, the level of GD2 expression depends on the differentiation of neurogenic tumors: the highest concentrations are determined on NB cells, the lowest — on ganglioneuroblastoma and ganglioneuroma. The phenomenon of “shedding”, the so-called flushing, of GD2 from the NB cell membrane made it possible to estimate its concentration in the peripheral bloodstream. The article discusses the evolutionary path of the methodology for detecting GD2 in blood serum, with an emphasis on the recently introduced liquid chromatography/tandem mass spectrometry technique, which can be used as a starting point for the emergence of GD2 as a soluble biomarker of the tumor process, which is undoubtedly a powerful application in the clinical practice that offers hope for improved diagnosis, prognosis and risk-adapted therapy strategies based on well-defined, measurable determinants in accordance with the concept of evidence-based medicine.

Key words: neuroblastoma, children, GD2

For citation: Ivanov N.S., Kachanov D. Yu., Larin S.S., Mollaev M.D., Kononov D.M., Shamanskaya T.V. The role of GD2 as a diagnostic and prognostic tumor marker in neuroblastoma (literature review). Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 2021;8(4):47–59.

Информация об авторах

Н.С. Иванов: врач-педиатр, врач-ординатор НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: greatinsmd@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9927-8445>

Д.Ю. Качанов: д.м.н., заместитель директора Института онкологии, радиологии и ядерной медицины и заведующий отделением клинической онкологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: clinoncology@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3704-8783>, SPIN-код: 9878-5540

С.С. Ларин: к.б.н., заместитель директора Института молекулярной и экспериментальной медицины НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: sergei_larin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2128-0078>, Web of Science ResearcherID: J-6601-2013, SPIN-код: 4344-7169

М.Д. Моллаев: научный сотрудник НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: murad.mollaev@fccho-moscow.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0539-6393>, Web of Science ResearcherID: AAY-6788-2021

Д.М. Коновалов: к.м.н., заведующий отделом клинической патологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: dmk_nadf@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7732-8184>

Т.В. Шаманская: к.м.н., врач-детский онколог, руководитель отдела изучения эмбриональных опухолей Института онкологии, радиологии и ядерной медицины НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: clinoncology@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3767-4477>

Information about the authors

N.S. Ivanov: Pediatrician, Resident of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: greatinsmd@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9927-8445>

D.Yu. Kachanov: Dr. of Sci. (Med.), Deputy Director of the Institute of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine & Head of the Department of Clinical Oncology at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: clinoncology@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3704-8783>, SPIN-code: 9878-5540

S.S. Larin: Cand. of Sci. (Biol.), Deputy Director of the Institute of Molecular and Experimental Medicine at Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: sergei_larin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2128-0078>, Web of Science ResearcherID: J-6601-2013, SPIN-code: 4344-7169

M.D. Mollaev: Research Associate at Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: murad.mollaev@fccho-moscow.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0539-6393>, Web of Science ResearcherID: AAY-6788-2021

D.M. Konovalov: Cand. of Sci. (Med.), Head of the Department of Clinical Pathology at Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: dmk_nadf@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7732-8184>

T.V. Shamanskaya: Cand. of Sci. (Med.), Physician, Children Oncologist, Head of the Department of Embryonic Tumors Research of the Institute of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: clinoncology@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3767-4477>

Вклад авторов

Н.С. Иванов: разработка дизайна статьи, сбор данных, анализ научного материала, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, подготовка списка литературы, написание текста рукописи, составление резюме

Д.Ю. Качанов, Д.М. Коновалов, С.С. Ларин, М.Д. Моллаев, Т.В. Шаманская: разработка дизайна статьи, сбор данных, анализ научного материала, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, подготовка списка литературы, научное редактирование статьи

Authors' contributions

N.S. Ivanov: article design development, data collection, analysis of scientific material, analysis of the data obtained, review of publications on the topic of the article, preparation of a list of references, writing the text of the article, composing a resume

D.Yu. Kachanov, S.S. Larin, M.D. Mollaev, D.M. Konovalov, T.V. Shamanskaya: article design development, data collection, analysis of scientific material, analysis of the data obtained, review of publications on the topic of the article, preparation of a list of references, scientific edition of the article

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / **Funding.** The study was performed without external funding.

Нейробластома (НБ) представляет собой злокачественную опухоль, развивающуюся из клеток-предшественников симпатической нервной системы. НБ является самой частой экстракраниальной солидной опухолью у детей, которая характеризуется крайне вариабельным биологическим поведением, включающим спонтанную и индуцированную регрессию, созревание и прогрессию [1, 2].

Показатель заболеваемости НБ составляет 1,2 на 100 тыс. населения в возрасте 0–18 лет, при этом пик заболеваемости приходится на детей первого года жизни. Около половины всех случаев — это локализованные стадии НБ (1–3-я стадии), 11 % — 4S стадия и 38 % — 4-я. Средний возраст на момент постановки диагноза составил 10 месяцев для 1–3-й стадий и 32 месяца — для метастатической формы [3].

Таким образом, частота выявления НБ среди пациентов с различными видами злокачественных опухолей у детей, ранний возраст презентации и осо-

бенности биологического поведения актуализируют необходимость ее всестороннего изучения и диктуют потребность в разработке и внедрении новых диагностических подходов.

Выраженные различия в течении заболевания в первую очередь определяются молекулярно-генетическим профилем опухоли. Хорошо известными клиническими детерминантами, формирующими поведение НБ, являются возраст на момент постановки диагноза, стадия заболевания, биологические и молекулярные характеристики [4].

К важнейшим биологическим детерминантам, определяющим гетерогенность течения НБ, на сегодняшний день относят: гистологический подтип опухоли, ploидность, амплификацию гена *MYCN*, аберрации короткого плеча 1-й хромосомы (1p) и делецию длинного плеча 11-й хромосомы (11q) [5–7].

Для оценки прогноза и ответа на терапию при НБ используется определение ряда онкологических

маркеров, таких как нейрон-специфическая енолаза, лактатдегидрогеназа, ферритин. Тем не менее разработанные до настоящего момента модели оценки прогноза не позволяют полностью предсказать специфику течения заболевания. В связи с этим создание методов мониторинга статуса опухоли в режиме реального времени, основанное на анализе циркулирующих опухолевых биомаркеров, представляется чрезвычайно актуальным.

Характерной особенностью НБ является экспрессия на поверхности опухолевых клеток различных ганглиозидов, в частности дисиалоганглиозида GD2 [8].

Стандартная номенклатура ганглиозидов кодируется тремя символами: G «ганглиозид», M, D, T, Q, P, H или S, характеризующий число (моно-, ди-, три- и т. д.) сиалогликозидов соответственно, в зависимости от количества кислотных остатков сиаловой кислоты, заканчиваясь цифрами 1, 2 или 3, указывающими порядок миграции ганглиозидов при тонкослойной хроматографии [9, 10].

Уровень экспрессии GD2 зависит от дифференцировки нейрогенных опухолей: наибольшие концентрации определяются на клетках НБ, наименьшие — на ганглионейробластоме и ганглионейроме [8, 11]. Феномен «шединга», так называемого смывания, GD2 с мембраны клеток НБ позволяет оценивать его концентрации в периферическом кровотоке [8, 12]. При этом была продемонстрирована корреляция концентраций GD2 в плазме крови пациентов и ответа на проводимую терапию [8].

GD2 представляет собой ганглиозид или гликофинголипид, содержащий сиаловую кислоту, входит в состав основных структур цитоплазматической мембраны нейрональных клеток [13]. GD2, кроме того, может экспрессироваться на поверхности нейробластов [8, 14], клеток ретинобластомы (РБ) [15], меланомы [16], рабдомиосаркомы (РМС), саркомы Юинга (СЮ), остеосаркомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли [17].

Молекулярная структура GD2 представлена комплексом сфингозина и жирной кислоты (церамидом) [18, 19], представляющим внутримембранный липидный домен и внеклеточный гликановый домен. Наружная часть принимает участие в образовании цитоплазматического гликокаликса. Цепи жирных кислот могут различаться по длине, в результате чего образуются несколько липоформ GD2, среди которых можно обособить как минимум 2 структуроопределяющих липоформы с длиной углеродной цепи 18 и 20 жирных кислот (C18, C20) [20] (рисунок).

В норме предполагается, что физиологическая функция ганглиозидов заключается в обеспечении клеточного взаимодействия, адгезии, пролиферации и регулировании дифференцировки клеток [21].

Содержание GD2 на мембране клеток НБ особенно велико и может достигать 30 % всех ганглиозидов [8].

Уже в самых ранних работах была продемонстрирована экспрессия GD2 в образцах различных

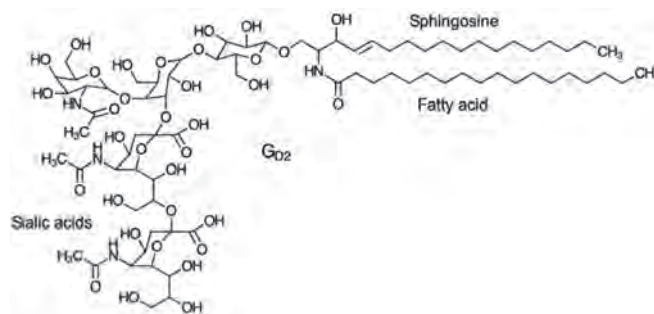


Схема строения GD2

Diagram of the structure of GD2

злокачественных новообразований (ЗНО) педиатрических пациентов. Для детекции GD2 использовали анти-GD2-специфическое мышинное моноклональное антитело 3A7. Было продемонстрировано, что экспрессия GD2 характерна для 100 % случаев НБ ($n = 28$) и наиболее распространена в опухолях с низким содержанием стромы. При дифференцировке НБ, богатых стромой, нейробластические кластеры, нейрофибриллы и большинство ганглиоподобных клеток были положительными, а строма шванновских клеток не экспрессировала GD2. В ганглионевромах только несколько ганглиоподобных клеток экспрессировали GD2, тогда как все другие структуры были отрицательными [14].

Определение уровня GD2 может быть использовано не только для диагностики, но и для оценки ответа на терапию с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [22].

На сегодняшний день гликановый домен GD2 является мишенью для различного вида моноклональных антител (динутуксимаб, динутуксимаб бета, накситамаб), для лечения НБ высокого риска и рецидивов [23, 24]. Несмотря на широкую изученность GD2-антигена и активное его использование в качестве терапевтической мишени, продолжает нарастать число сообщений о патологической роли мембранных и циркулирующих ганглиозидов в формировании злокачественного фенотипа опухоли посредством модуляции адгезивности и инвазивности [25], а также передачи сигналов рецепторными тирозинкиназами [26, 27]. Одно из первых сообщений о патогенетической роли GD2 было опубликовано в Journal of Clinical Investigation [28]. В данной работе гипотеза о потенциальной туморогенности ганглиозидов изучалась на модельных клеточных культурах спонтанной лимфомы SL12: 12.1, 12.3 и 12.4, вариабельных в отношении экспрессии GD2. Туморогенность клонов коррелировала с концентрацией мембранных ганглиозидов. Клон SL12.3, секретирующий в культуре 18 пмоль GD2 на 10^6 клеток за 24 ч, вызывал формирование опухоли у 50 % сингенных мышей в дозировке 10^3 клеток на мышь при внутривенной инъекции. В то время как для достижения аналогичного количества 50 % животных-опухоленосителей в группе мышей, получавших внутривенные инъекции клона

SL12.4, секретирующего в культуре всего 0,2 пмоль GD2 на 10^6 клеток за 24 ч, требовалось вводить 10^6 , или в 1000 раз больше опухолевых клеток. В случае если очищенные гликозиды высокотуморогенного клона SL12.3 вводили животным в смеси с клетками слаботуморогенного клона SL12.4, то частота развития опухолей увеличивалась до 83 %. Таким образом, стало очевидно, что «шеддинг»-ганглиозиды обладают высокой эффективностью в индукции роста опухоли *in vivo*, кроме того, некоторые ганглиозиды также могут ингибировать биологическую активность цитокинов, таких как интерлейкин-2, и модулировать лимфопролиферативные ответы посредством обратимого нецитотоксического ингибирования моноцитов [29, 30].

Таким образом, изучение роли GD2 как потенциального диагностического, прогностического маркера и мишени для таргетной терапии становилось все более актуальным.

Один из первых отчетов об идентификации GD2 в сыворотке крови был опубликован в журнале Cancer Research в 1984 г. [12]. В исследовании приняли участие пациенты с активной НБ ($n = 23$) и ремиссией НБ ($n = 6$). В качестве контрольной группы исследовались больные с другими педиатрическими опухолями ($n = 23$) и без опухолевого процесса ($n = 16$). Образцы сыворотки всех пациентов подвергались процессингу очистки, экстракции и фракционирования с последующим количественным анализом концентраций GD2 методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием специфичных к GD2 антител MAb126. В 21/23 случае активной НБ концентрации GD2 в сыворотке крови составляли более 26 нг/мл и превышали медиану концентраций пациентов контрольной группы ($8,8 \pm 5,8$ нг/мл) и группы больных, находящихся в ремиссии ($8,8 \pm 6,8$ нг/мл). Несмотря на это в 2/23 наблюдениях активной НБ были зафиксированы значительно более низкие показатели. Примечательно, что в 2/23 случаях у пациентов с другими ЗНО были зафиксированы повышенные концентрации GD2: у пациента с опухолью Вильмса (ОВ) (69 нг/мл) и остеогенной саркомой (33 нг/мл), при этом в сыворотке, полученной от других больных с аналогичными заболеваниями, концентрации GD2 находилась в пределах референсных значений. Тем не менее использование теста Уилкоксона–Манна–Уитни подтвердило статистически значимую разницу концентраций GD2 в сыворотке крови у больных НБ и тремя другими группами: здоровыми людьми, пациентами с ремиссией НБ и больными другими ЗНО ($p < 0,001$).

Таким образом, проведенное исследование впервые продемонстрировало повышение концентрации GD2 в сыворотке крови у пациентов с НБ. Эти результаты стали предпосылкой к последующей валидации других методов детекции GD2, отвечающих критериям чувствительности и специфичности.

Одно из ранних сообщений о визуализации специфического опухолеассоциированного ганглиозид

в плазме крови у пациентов с НБ было опубликовано в издании Lancet в 1985 г. [31]. Исследование было проведено на малой выборке пациентов с распространенной формой НБ ($n = 5$) и больных, находящихся в полной ремиссии ($n = 6$). В качестве контрольной группы были обследованы здоровые дети и взрослые ($n = 17$). При сравнительной оценке хроматограмм, представленных у одного из пациентов с распространенной формой НБ, четко визуализировалась экстрагированная из плазмы крови фракция аномальных ганглиозидов, которая не была обнаружена на контрольной хроматограмме, полученной из плазмы крови здорового донора. В то же время аналогичная полоса максимально визуализировалась на хроматограмме образца, экстрагированного непосредственно из опухолевой ткани, что дало основание предполагать наличие специфической фракции ганглиозидов, характерных для пациентов с НБ, которая может быть идентифицирована методом тонкослойной хроматографии [31].

Последующее изучение углеводной структуры аномального ганглиозидов осуществлялось посредством ферментативной деградации нейраминидазой в отсутствие детергента, которая расщепляла одну из двух сиаловых кислот GD2 с получением моносиалоганглиозидов GM2, что дало основание предполагать идентичность структур аномального ганглиозидов плазмы и GD2. Исследование всей выборки пациентов показало, что аномальный ганглиозид был обнаружен в 100 % случаев у пациентов с НБ с медианой концентрации 250–1500 пмоль липидсвязанной сиаловой кислоты/мл и не был обнаружен (< 50 пмоль/мл) у больных, находящихся в полной ремиссии, и в контрольной группе здоровых людей. Изученные способность к миграции при хроматографическом анализе и чувствительность к нейраминидазам позволили предположить, что углеводная структура изучаемого ганглиозидов аналогична структуре GD2.

Известно, что идеальный опухолевый маркер — это молекула опухолевого происхождения, выделяемая опухолевой клеткой в количествах, легко обнаруживаемых в циркуляции хозяина и пропорциональных опухолевой нагрузке, и не присутствующая в значительных концентрациях в циркуляции в норме. По результатам проведенного исследования стало очевидно, что обнаруженный опухолеассоциированный ганглиозид отвечает всем описанным критериям. Лабораторная количественная оценка данного ганглиозидов может быть полезна при клиническом сопровождении пациентов с НБ [31].

По прошествии года в журнале Cancer Research было опубликовано исследование, демонстрирующее качественные различия между общим ганглиозидным паттерном опухолевых тканей в зависимости от дифференцировки опухоли и клинической стадии НБ [8].

В исследовании приняли участие 42 пациента с первичными опухолями, в том числе и до начала терапии:

НБ ($n = 36$), ганглионеврома ($n = 1$) и ганглионейробластома ($n = 1$), а также с остаточной опухолью после достижения клинической ремиссии: ганглионеврома ($n = 2$) и ганглионейробластома ($n = 2$). Сиаловые кислоты фракций ганглиозидов визуализировались с использованием тонкослойной хроматографии в виде полос с последующим обсчетом абсолютных концентраций методом денситометрического сканирования и компьютерного анализа. Примечательно, что при изучении зависимости содержания GD2 в ткани опухоли от стадии заболевания статистически значимых связей выявлено не было, что определяло экспрессию GD2 как стадийно независимую биологическую характеристику НБ. В данном исследовании 100 % гистопатологически подтвержденных случаев НБ экспрессировали GD2 в количестве 4–38 % общего количества ганглиозидов (3–195 nmol LBSA/g опухолевой ткани), при этом 6 образцов гистологически более зрелых опухолей экспрессировали более низкие или неопределимые количества GD2 < 0,5–1,5 % (< 1–4 nmol LBSA/g опухолевой ткани).

Возможность того, что GD2 является эффективным антигеном-мишенью дополнительно подтверждается тем фактом, что концентрации, которые были обнаружены в опухолях НБ, дают расчетную среднюю плотность антигена $\sim 10^7$ молекул на клетку. Эти результаты свидетельствуют о том, что GD2 является чувствительным маркером НБ и может быть отличным целевым антигеном для иммунотерапии этой опухоли [8].

Нарастающее число сообщений о способности опухолевых клеток НБ к «сбросу» GD2 в системный кровоток и достижения хроматографии в детекции фракций ганглиозидов стали предпосылкой к проведению крупного исследования по изучению GD2 как опухолевого маркера, которое было опубликовано в научном издании *International Journal of Cancer* в 1987 г. В нем приняли участие пациенты с гистологически подтвержденной НБ ($n = 32$), ганглионейробластомой ($n = 3$) и ганглионевромой ($n = 1$). В дополнительной серии исследований была проанализирована когорта пациентов до и после терапии ($n = 13$), а также в момент клинического рецидива ($n = 6$) [32]. Образцы плазмы/сыворотки в объеме 1–2 мл подвергались криоконсервации при температуре -70°C или незамедлительному анализу с предшествующим процессингом, включающим этапы экстракции, лиофилизации, ресуспендирования, центрифугирования и изготовления тонкослойных хроматограмм ганглиозидов на пластинах HPTLC. Сиаловые кислоты фракций ганглиозидов визуализировались в виде полос с последующим подсчетом абсолютных концентраций методом денситометрического сканирования. По результатам исследования стало очевидно, что медиана концентраций GD2 в плазме/сыворотке крови пациентов с НБ почти в 50 раз превышала ранее определенный пороговый предел GD2, равный 50 пмоль/мл [31], и составила 545 ± 108 пмоль/мл.

Рассматривая вопрос корреляции концентраций GD2 и клинической стадии заболевания, необходимо отметить, что медиана концентраций при 3–4-й стадиях составила 603 ± 136 пмоль/мл и 198 ± 54 пмоль/мл при 1–2-й стадиях, однако обнаруженная разница между концентрациями не была статистически значимой ($p > 0,05$), поскольку были больные с высокими концентрациями циркулирующего GD2 с каждой из стадий заболевания.

Говоря о малой когорте пациентов с более дифференцированными опухолями, необходимо отметить, что в соответствии с результатами ранних публикаций, уровни циркулирующих GD2 во всех случаях оставались низкими, что может свидетельствовать об обратной зависимости интенсивности синтеза и высвобождения GD2 и степени дифференцированности НБ.

При исследовании образцов сыворотки/плазмы до и после лечения у 13 пациентов (10 получали начальную терапию, 3 – противорецидивную) в 11 из 13 случаев терапия была успешной. Циркулирующий GD2 упал до необнаруживаемых уровней (< 50 пмоль/мл) во всех 11 случаях (от среднего уровня до лечения 339 пмоль/мл). Напротив, 2 пациента, уровень GD2 которых оставался повышенным (196 и 73 пмоль/мл), не вошли в клиническую ремиссию и впоследствии умерли от прогрессирования заболевания.

Исследование больных в период ремиссии и рецидива продемонстрировало более чем 5-кратное повышение концентрации GD2 во время ремиссии на момент рецидива (430 пмоль/мл) от изначальных значений в период ремиссии (< 50 пмоль/мл), что, безусловно, еще раз указывает на высокую значимость GD2 как индикатора статуса опухоли [32].

На примере 1 клинического случая ребенка с 4-й стадией НБ можно проследить динамику изменения GD2: концентрация GD2 до начала терапии составляла 765 пмоль/мл и в течение 6–8 нед лечения снизилась до неопределяемых уровней. Примечательно, что на 21-й неделе терапии концентрация GD2 составила 70 пмоль/мл, в то время, когда катехоламины мочи находились в пределах референсных значений, однако уже через 4 нед был диагностирован клинический рецидив с повышением концентрации GD2 до 857 пмоль/мл, что наглядно демонстрирует большую чувствительность GD2 как раннего индикатора рецидива опухоли и ответа на терапию [32].

Анализируя корреляцию содержания GD2 в сыворотке крови и в образцах опухолевой ткани у пациентов с НБ 1–4-й и 4S стадий ($n = 22$), установлено отсутствие значимых корреляционных связей, что еще раз подчеркивает процесс «слушивания» ганглиозидов, сопровождающий формирование злокачественного фенотипа НБ.

Резюмируя итоги исследования, необходимо отметить, что значительное высвобождение ганглиозидов, безусловно, связано с наличием активной и менее

дифференцированной опухоли, что позволяет предположить существование специфического изменения метаболизма ганглиозидов, сопряженное с опухолевой прогрессией НБ.

Период полураспада циркулирующих заряженных ганглиозидов намного больше, чем у большинства других ганглиозидов [33], следовательно, небольшие количества «сброшенных» ганглиозидов могут накапливаться в кровотоке быстрее, чем небольшие количества других молекул, высвобождаемых опухолевыми клетками, что объясняет высокую чувствительность данного метода [32].

В 2009 г. в одной из публикаций журнала *Acta Biochimica Polonica* была впервые продемонстрирована новая технология детекции ганглиозидов с применением метода ВЭЖХ. В исследование были включены образцы 34 пациентов с НБ следующих стадий: 1-я ($n = 1$), 2-я ($n = 5$), 3-я ($n = 7$), 4-я ($n = 19$), 4S ($n = 2$). В 6 случаях получены 2 независимых образца от одного и того же пациента, в 1 наблюдении — 3 образца от одного и того же больного, и 7 образцов от пациентов без НБ. Образцы собирали до лечения, после лечения и в последующее время (через 14–33 мес после терапии). Плазма крови подвергалась ступенчатому процессингу элюирования с последующим ферментированием фракции, содержащей ганглиозиды, церамидглицаназной экстракцией гликанов. Далее элюат гликанов подвергался мечению 2-аминобензамидом и анализировался в ВЭЖХ-системе Shimadzu model 10AVP.

Медиана концентраций GD2 в пробах сыворотки крови, детектированная посредством ВЭЖХ, в целом коррелировала с ранними исследованиями с применением тонкослойной хроматографии и составляла 660,7 пмоль/мл у больных НБ и была в 6,2 раза выше, чем в образцах пациентов контрольной группы, — 106,1 пмоль/мл ($n = 7$), при этом средний уровень GD2 у больных, получивших терапию, рассчитанный для 4 пациентов, у которых имелись соответствующие образцы, составлял 30 % от уровня до лечения, однако статистически различия показателей не были достоверно значимы. Для подтверждения возможности количественной оценки с использованием хроматографического метода результаты анализа концентрации ганглиозидов GD2 сравнивали с уровнем экспрессии GD2, оцененным референтным методом проточной цитометрии. Результаты сравнительного анализа свидетельствовали о том, что ВЭЖХ является чувствительным и количественным методом анализа ганглиозидов GD2 [34].

Разработанный способ детекции GD2 методом ВЭЖХ может быть использован для обнаружения ганглиозидов в образцах плазмы при объеме образца < 50 мкл, что значительно ниже объема, требуемого для проведения тонкослойной хроматографии.

Значительную роль в понимании роли циркулирующих GD2 в прогрессии НБ заложило исследование, опубликованное в журнале *Blood* в 1990 г., основной

предпосылкой к реализации которого стали ранние сообщения о потенциальной способности shed-молекул к модуляции биологического поведения опухоли, в том числе к индукции прогрессии заболевания. В нем приняла участие ретроспективная группа пациентов детского возраста с гистологически подтвержденной НБ ($n = 74$), распределенных по стадиям: 3-я ($n = 32$) и 4-я ($n = 42$). Образцы плазмы/сыворотки больных исследовались с применением технологии тонкослойной хроматографии с модифицированным резорциновым тестом и последующей количественной детекцией GD2 при участии денситометрического анализа. Диапазон концентраций циркулирующего GD2 не коррелировал со стадией заболевания и возрастом на момент установления диагноза. Медиана наблюдения в совокупности выборки составила 18 мес. За период проведения исследования не имели признаков прогрессирования 28 пациентов; умерли через 3 и 8 мес после установления диагноза соответственно от осложнений, связанных с терапией, без признаков прогрессии — 2 ребенка, были потеряны для последующего наблюдения через 2, 12 и 99 мес после постановки диагноза — 3 больных, при этом прогрессирование заболевания произошло у 55 % пациентов в исходной группе ($n = 41$), в том числе в течение 6 мес с момента постановки диагноза ($n = 25$), в течение 7–12 мес ($n = 7$), в течение 2-го года ($n = 5$), в течение последующих лет ($n = 4$). Исследование зависимости между исходными концентрациями GD2 и вероятностью прогрессии заболевания проводилось у пациентов, наблюдавшихся не менее 24 мес от момента установления диагноза ($n = 52$). Повышенные концентрации GD2 коррелировали с вероятностью прогрессии заболевания: больные с наиболее низкими концентрациями GD2 на момент установления диагноза характеризовались вероятностью прогрессии, равной 46 %, в то время как пациенты с наиболее высокими концентрациями GD2 имели вероятность прогрессии, равную 92 %. Иными словами, выживаемость без прогрессирования обратно пропорциональна циркулирующему уровню GD2 на момент постановки диагноза: медиана выживаемости без прогрессии больных с самыми высокими концентрациями GD2 составила 9 мес, а пациентов с самыми низкими концентрациями — 28 мес.

Резюмируя описанные наблюдения, необходимо подчеркнуть роль shed-GD2 не только как прогностического циркулирующего биомаркера, но также как возможной патогенетической детерминанты, опосредующей рост опухоли. Сочетание амплификации онкогена *MYCN*, детерминирующего высокую пролиферативную активность опухоли, с высокой концентрацией shed-GD2 может служить предиктором особенно агрессивной опухоли [35].

Несмотря на то, что методы анализа концентраций GD2 с применением тонкослойной жидкостной хроматографии [36–38] и ВЭЖХ [34] зарекомендовали себя как высокочувствительные методы детекции

циркулирующих биомаркеров, в том числе и при НБ, их практическая приемлемость для изучения быстрого измерения концентраций GD2 в рамках крупных клинических испытаний или в клинических лабораторных условиях оказалась неприменима.

Разработка и внедрение более надежных и воспроизводимых методик определения GD2, в частности жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, позволили разработать новые подходы в оценке уровня опухолевых маркеров, оказавшиеся более дешевыми и воспроизводимыми, чему во многом поспособствовала валидация метода тандемной масс-спектрометрии для одновременного измерения клинически значимых липоформ GD2 в плазме или сыворотке крови человека. Исследования, использующие подобную методику на группах пациентов с НБ и другими ЗНО детского возраста, продемонстрировали, что GD2 является чувствительным и специфичным маркером при НБ. Последовательная оценка уровней GD2 у больных, получающих противоопухолевую терапию, может позволить оценить опухолевую нагрузку, ответ на терапию и выявить рецидивы заболевания на более ранних стадиях [20].

Согласно исследованию, опубликованному группой ученых в журнале *Pediatric Blood & Cancer* в 2019 г., произведено измерение концентрации GD2 с длиной углеродной цепи 18–20 жирных кислот (C18 и C20) с применением методики жидкостной хроматографии высокого давления/тандемной масс-спектрометрии. В исследовании приняли участие 128 пациентов детского возраста, в том числе с ганглионевромой ($n = 10$), смешанным типом ганглионейробластомы ($n = 12$), узловатым типом ганглионейробластомы ($n = 16$), НБ ($n = 90$), стратифицированных согласно классификации COG в группы низкого ($n = 29$), промежуточного ($n = 13$) и высокого ($n = 86$) рисков, при этом 40 из 73 исследованных образцов имели амплификацию гена *MYCN*, 56 включенных в исследование больных имели рецидивирующее заболевание, а 14 пациентов с НБ группы высокого риска получали иммунотерапию динутуксимабом бета после завершения индукционной и консолидирующей терапии. В качестве контрольных использовали образцы сывороток крови детей без ЗНО ($n = 40$) и с другими распространенными онкологическими заболеваниями: ОВ ($n = 8$), неходжкинской лимфомой (НХЛ) ($n = 8$), лимфомой Ходжкина (ЛХ) ($n = 8$), гепатобластомой (ГБ) ($n = 8$), РМС ($n = 8$), СЮ ($n = 8$), острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) ($n = 8$), медуллобластомой (МБ) ($n = 8$), глиомой высокой степени злокачественности ($n = 8$) и остеосаркомой ($n = 12$). По результатам масс-спектрометрического анализа стало очевидно, что детекция липоформы C18 была ниже нижнего предела количественного определения (< 3 нМ) в 16 контрольных образцах из 40 и варьировалась до нормы в оставшихся контрольных образцах, в то время как липоформа C20 достоверно детектировалась в 3 контрольных образцах из 40 при медиане кон-

центраций < 5 нМ. Повышение концентрации GD2 в первую очередь ассоциировалось с гистологическим вариантом опухоли и стадией заболевания по Международной системе стадирования НБ (International Neuroblastoma Staging System, INSS). Например, в образцах сыворотки крови пациентов с ганглионевромой и смешанным типом ганглионейробластомы концентрации GD2 варьировали в пределах диапазона контрольных образцов, однако в образцах сыворотки пациентов с нодулярным типом ганглионейробластомы был зафиксирован их повышенный уровень. При исследовании концентрации GD2 у пациентов с метастатической формой заболевания отмечено, что при детекции липоформы C18 определялось 30-кратное превышение медианы концентрации, определяемой в контрольных образцах, при этом липоформа C20 определялась в 65 образцах сыворотки из 69, однако была значительно ниже (медиана – 15,9 нМ; диапазон – от $< LLQ$ до 68,1 нМ), чем концентрации липоформы C18. В случаях пациентов с положительной амплификацией *MYCN* и рецидивирующей формой заболевания также была отмечена значимая элевация концентрации GD2 в сравнении с контрольной группой. Концентрации GD2 в 10/11 образцах, взятых перед получением больными первой дозы динутуксимаба, были в пределах контрольного диапазона, а в 1/11 случае зафиксировано повышение до 21,1 нМ. Необходимо отметить, что все образцы сыворотки, полученные от детей с различными ЗНО, отличные от центральной нервной системы, попали в диапазон контрольных образцов для обеих липоформ (C18 и C20). Однако концентрации GD2 превышали верхний диапазон контроля в 3 образцах из 8 (максимальная концентрация – 35 нМ) у детей с глиомами высокой степени злокачественности и в 7 образцах из 8 (максимальная концентрация – 111 нМ) от детей с МБ. Концентрации GD2 в 73 образцах сыворотки крови детей с НБ высокого риска были различными (диапазон – от 16,1 до 1060 нМ для липоформы C18).

Таким образом, концентрация GD2, определяемая жидкостной хроматографией высокого давления/тандемной масс-спектрометрией может рассматриваться как один из атрибутов идеального опухолевого маркера, позволяющего мониторировать опухолевую нагрузку, спонтанное и индуцированное изменение объема опухоли. Концентрация GD2 в сыворотке крови дает возможность различать опухоли высокого риска/высокой стадии НБ и более дифференцированные опухоли низкого риска.

Дальнейшие разработка и изучение этой платформы должны позволить оценить GD2 как возможную потенциальную конечную точку клинического исследования для измерения опухолевой нагрузки при диагностике и реакции на лечение, а также для прогнозирования рецидива или выживаемости. Данный подход может повысить точность и чувствительность оценки ответа опухоли, прогнозировать последующий рецидив или шансы на выживание. Использование

GD2 в качестве опухолевого биомаркера позволяет производить непрерывную оценку изменения общей опухолевой нагрузки по сравнению с категориями ответа (полный ответ, частичный ответ и т. д.), представляя собой экономически приемлемую методику, способствующую снижению лучевой нагрузки и рисков, сочетанных с седацией и анестезией, применяемых в рамках визуализации при оценке опухоли в динамике.

Известно, что GD2 является лигандом для терапевтического моноклонального антитела ch14.18 [39, 40], и циркулирующее связывание GD2 с динутуксимабом бета в плазме может блокировать терапевтический эффект антитела, однако его концентрации не рассматриваются как значимые для блокирования противоопухолевых эффектов анти-GD2-моноклональных антител [17], но могут потенциально повышать токсичность через системную активацию иммунитета.

Константа ассоциации динутуксимаба бета для GD2 высока и составляет $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, или $0,35 \text{ nM}^{-1}$ [41].

Применение метода жидкостной хроматографии высокого давления/тандемной масс-спектрометрии продемонстрировало, что 200 nM GD2 насыщает >95 % сайтов связывания динутуксимаба (2 сайта связывания на молекулу антитела) при пиковой концентрации динутуксимаба 10 мкг/мл ($\approx 70 \text{ nM}$), при этом эта концентрация GD2 эквивалентна средней концентрации в образцах, взятых у пациентов с 4-й стадией НБ высокого риска на момент постановки диагноза.

При измерении концентрации GD2 в плазме у 14 больных, получавших постконсолидированную тера-

пию динутуксимабом, полученные значения были в пределах референсных у всех, кроме 1 пациента. Применение динутуксимаба в условиях, когда концентрация циркулирующего GD2 будет выше (например, в рамках режима индукции), может повлиять на эффективность терапии, если большинство активных сайтов связывания будут заняты циркулирующим GD2 [41].

В сводной таблице представлены основные этапы эволюционного пути методологии детекции GD2 в крови с краткой характеристикой основных результатов.

Подводя итог вышесказанному, необходимо отметить, что разработка методологии детекции GD2 в сыворотке крови прошла долгий эволюционный путь — почти 40 лет. К глубочайшему сожалению, тонкослойная жидкостная хроматография и ИФА, являвшиеся долгие годы базисом для детекции GD2 в крови, не смогли реализовать потенциал GD2 как опухолевого биомаркера в связи с невозможностью проведения анализов в широких масштабах.

Несмотря на это, пришедшая в медицинскую отрасль методика жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, лишенная недостатков предшествующих технологий, при надлежащем проведении клинических исследований должна стать отправной точкой к становлению GD2 как растворимого биомаркера опухолевого процесса, безусловно, являющегося мощным приложением в клинической практике, дающего надежду на улучшение диагностики, прогноза и стратегии риск-адаптированной терапии, основанных на четко определенных, измеримых детерминантах в соответствии с концепцией доказательной медицины.

Основные этапы эволюционного пути методологии детекции GD2 в сыворотке крови с краткой характеристикой основных результатов (начало)
The main stages of the evolutionary path of the methodology for detecting GD2 in serum with a brief description of the main results (beginning)

Журнал, год Journal, year	Объем выборки Sample size	Результаты исследования Result of studies
Cancer, 1984	Экспериментальная группа (n = 29): НБ (активное заболевание) – 23, НБ (ремиссия) – 6 Контрольная группа (n = 16) Пациенты с другими ЗНО – 23: эмбриональная РМС, острый лим- фобластный лейкоз – 4; ОВ – 3; остеогенная саркома, СЮ, ЛХ – 2; НХЛ, ОМЛ, мезенхиома, РБ, лимфома Беркитта, лангераносклеточный гистиоцитоз – 1 Experimental group (n = 29): NB (active disease) – 23, NB (remission) – 6 Control group (n = 16) Patients with other malignant neoplasms – 23: ERM, ALL – 4; WT – 3; osteogenic sarcoma, ES, HL – 2; NHL, AML, mesenchymoma, RB, Burkitt lymphoma, langerhans cell histiocytosis – 1	- валидация метода конкурентного ИФА для детекции циркулирующего GD2 в крови - в 21/23 случаях активной НБ зафиксированаelevating концентрация GD2 - в 2/23 случаях активной НБ определена пониженная концентрация GD2 - в 2/23 случаях определена повышенная концентрация GD2 (ОВ – 1, остеогенная саркома – 1) - validation of the competitive ELISA method for the detection of circulating GD2 in the blood - in the 21/23 cases of active NB an elevation of GD2 concentration was recorded - in 2/23 cases of active NB a reduced concentration of GD2 was recorded - in 2/23 cases an increased concentration of GD2 was determined (WT – 1, osteogenic sarcoma – 1)
Lancet, 1985	Экспериментальная группа (n = 11): НБ (активное заболевание) – 5, НБ (ремиссия) – 6 Контрольная группа (n = 7) Experimental group (n = 11): NB (active disease) – 5, NB (remission) – 6 Control group (n = 7)	- экстрагирована аномальная фракция ганглиозидов методом тонкослойной хроматографии - выдвинута гипотеза о специфичности аномальной фракции для НБ - анализ углеводных структур показал идентичность аномального ганглиозида и GD2 Исследование концентраций GD2 у пациентов в сыворотке крови: X = 250–1500 пмоль/мл у больных НБ (активное заболевание) X = < 50 пмоль/мл у пациентов контрольной группы и с НБ (в ремиссии) - the abnormal fraction of gangliosides was extracted by thin-layer chromatography - the hypothesis has been put forward about the specificity of the anomalous fraction for NB - analysis of carbohydrate structures showed the identity of abnormal ganglioside and GD2 Study of GD2 concentrations in patients in blood serum: X = 250–1500 pmol/ml in patients with NB (active disease) X = < 50 pmol/ml in patients of the control group and with NB (in remission)
Cancer, 1986	Экспериментальная группа (n = 42): первичная опухоль до начала терапии: НБ – 36, ганглионеврома – 1, ганглионейробластома – 1; остаточная опухоль после достижения ремиссии: ганглионеврома – 2, ганглионейробластома – 2 Experimental group (n = 42): primary tumor before therapy: NB – 36, ganglioneuroma – 1, ganglioneuroblastoma – 1; residual tumor after remission: ganglioneuroma – 2, ganglioneuroblastoma – 2	- определено, что экспрессия GD2 является стадийно независимой характеристикой НБ - подтверждено, что экспрессия GD2 на ткани коррелирует со степенью зрелости опухоли: GD2 = 4–38 % ганглиозидов (3–195 nmol LBSA/g опухолевой ткани) при НБ GD2 = < 0,5–1,5 % ганглиозидов (< 1–4 nmol LBSA/g опухолевой ткани) при ганглионевроме, ганглионейробластомах - it was determined that GD2 expression is a stage-independent characteristic of NB - it was confirmed that GD2 expression on tissue correlates with the degree of tumor maturity: GD2 = 4–38 % gangliosides (3–195 nmol LBSA/g of tumor tissue) in NB GD2 = < 0,5–1,5 % gangliosides (< 1–4 nmol LBSA/g of tumor tissue) in ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma

Основные этапы эволюционного пути методологии детекции GD2 в сыворотке крови с краткой характеристикой основных результатов (продолжение)
The main stages of the evolutionary path of the methodology for detecting GD2 in serum with a brief description of the main results (continuation)

Журнал, год Journal, year	Объем выборки Sample size	Результаты исследования Result of studies
Cancer, 1987	Экспериментальная группа ($n = 36$): ганглионейробластома – 3, ганглионеврома – 1, НБ – 32 Рецидив ($n = 6$) Инициальная терапия ($n = 10$) Противорецидивная терапия ($n = 3$) Биопсионные образцы ($n = 22$) Experimental group ($n = 36$): ganglioneuroblastoma – 3, ganglioneuroma – 1, NB – 32 Relapse ($n = 6$) Front line therapy ($n = 10$) Anti-relapse therapy ($n = 3$) Biopsy samples ($n = 22$)	<ul style="list-style-type: none"> - подтверждена высокая чувствительность тонкослойной хроматографии в детекции GD2: $X = 545 \pm 108$ пмоль/мл у пациентов с НБ $X = < 50$ пмоль/мл у здоровых пациентов - подтверждено отсутствие корреляции между стадией заболевания и концентрацией GD2 <p>Исследование GD2 методом тонкослойной хроматографии у пациентов до/после терапии: $X = 339$ пмоль/мл у пациентов до лечения $X = < 50$ пмоль/мл у 11/13 пациентов, достигнувших ремиссии после терапии $X = 134,5$ пмоль/мл у 2/13 у пациентов, не достигнувших ремиссии после терапии</p> <p>Исследование GD2 методом тонкослойной хроматографии у пациентов во время рецидива: $X = < 50$ пмоль/мл у пациентов в ремиссии $X = < 430$ пмоль/мл у пациентов с рецидивом</p> <ul style="list-style-type: none"> - определена высокая чувствительность GD2 по сравнению с катехоламинами как раннего индикатора рецидива опухоли - установлено отсутствие корреляции «shedding» и тканевых ганглиозидов - high sensitivity of thin-layer chromatography in GD2 detection was confirmed: $X = 545 \pm 108$ pmol/ml in patients with NB $X = < 50$ pmol/ml in healthy patients - confirmed the absence of correlation between the stage of the disease and the concentration of GD2 <p>GD2 study by thin-layer chromatography in patients before/after therapy: $X = 339$ pmol/ml in patients before treatment $X = < 50$ pmol/ml in 11/13 patients who achieved remission after therapy $X = 134,5$ pmol/ml in 2/13 patients who did not achieve remission after therapy</p> <p>GD2 study by thin-layer chromatography in patients during relapse: $X = < 50$ pmol/ml in patients in remission $X = < 430$ pmol/ml in patients with relapse</p> <ul style="list-style-type: none"> - the high sensitivity of GD2 compared to catecholamines as an early indicator of tumor recurrence was determined - the absence of a correlation of "shedding" and tissue gangliosides was established
Blood, 1990	Экспериментальная группа ($n = 74$): НБ 3-й стадии – 32, НБ 4-й стадии – 42 Experimental group ($n = 74$): NB stage 3 – 32, NB stage 4 – 42	<ul style="list-style-type: none"> - вероятность прогрессии у пациентов с наиболее низкими концентрациями GD2 на момент установления диагноза = 42 % - вероятность прогрессии у пациентов с наиболее высокими концентрациями GD2 на момент установления диагноза = 92 % - кривая Каплана–Мейера продемонстрировала обратную пропорциональность выживаемости без прогрессии циркулирующему уровню GD2 на момент постановки диагноза: медиана бессобытийной выживаемости (BCV) = 28 мес у пациентов с $GD2 < 50$–125 пмоль/мл медиана BCV = 9 мес у пациентов с $GD2 = 704$–2160 пмоль/мл - the probability of progression in patients with the lowest concentrations of GD2 at the time of diagnosis = 42 % - the probability of progression in patients with the highest concentrations of GD2 at the time of diagnosis = 92 % - the Kaplan–Mayer curve demonstrated the inverse proportionality of progression-free survival to the circulating GD2 level at the time of diagnosis: median EFS = 28 months in patients with $GD2 < 50$–125 pmol/ml median EFS = 9 months in patients with $GD2 = 704$–2160 pmol/ml
Acta Biochimica Polonica, 2009	Экспериментальная группа ($n = 34$) Контрольная группа ($n = 7$) Experimental group ($n = 34$) Control group ($n = 7$)	<ul style="list-style-type: none"> - валидация метода ВЭЖХ для детекции концентрации GD2 в сыворотке крови - сокращение объема образца до 50 мкл в сравнении с тонкослойной хроматографией - корреляция количественной природы ВЭЖХ в сравнении с тонкослойной хроматографией: $X = 660,7$ пмоль/мл у пациентов с НБ $X = 106,1$ пмоль/мл у пациентов без НБ - validation of HPLC method for detection of GD2 concentration in blood serum - reduction of the sample volume to 50 μl in comparison with thin-layer chromatography - correlation of the quantitative nature of HPLC in comparison with thin-layer chromatography: $X = 660,7$ pmol/ml in patients with NB $X = 106,1$ pmol/ml in patients without NB

Основные этапы эволюционного пути методологии детекции GD2 в сыворотке крови с краткой характеристикой основных результатов (окончание)
The main stages of the evolutionary path of the methodology for detecting GD2 in serum with a brief description of the main results (end)

Журнал, год Journal, year	Объем выборки Sample size	Результаты исследования Result of studies
Pediatric Blood & Cancer, 2019	<p>Экспериментальная группа ($n = 128$): ганглионеврома – 10, ганглионейробластома (смешанный тип) – 12, ганглионейробластома (нодулярный тип) – 16, НБ – 90</p> <p>Группа низкого риска – 29</p> <p>Группа промежуточного риска – 13</p> <p>Группа высокого риска – 86</p> <p>Рецидив ($n = 56$)</p> <p>Контрольная группа ($n = 40$)</p> <p>Пациенты с другими ЗНО ($n = 92$)</p> <p>Остеогенная саркома ($n = 12$)</p> <p>МБ, эмбриональная РМС, СЮ, ОВ, ГБ, ЛХ, НХЛ, ОМЛ ($n = 8$)</p> <p>Experimental group ($n = 128$): ganglioneuroma – 10, ganglioneuroblastoma (mixed) – 12, ganglioneuroblastoma (nodular) – 16, NB – 90</p> <p>LRG – 29</p> <p>IRG – 13</p> <p>HRG – 86</p> <p>Relapse ($n = 56$)</p> <p>Control group ($n = 40$)</p> <p>Patients with other malignant neoplasms ($n = 92$)</p> <p>Osteogenic sarcoma ($n = 12$)</p> <p>MB, ERMS, ES, WT, GB, HL, NHL, AML ($n = 8$)</p>	<p>- валидация метода жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии для детекции концентрации GD2 в сыворотке крови;</p> <p>- отсутствие корреляции стадии заболевания и GD2, определенного методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии</p> <p>- корреляция количественной природы жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии в сравнении с тонкослойной хроматографией, ВЭЖХ</p> <p>Исследование GD2 методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии в опытной группе пациентов:</p> <p>$X = 4,1 (< LLQ - 9,4 \text{ nM})$ у пациентов с ганглионевромой</p> <p>$X = 6,4 (< LLQ - 15,3 \text{ nM})$ у пациентов с ганглионейробластомой (смешанный тип)</p> <p>$X = 39,1 (< LLQ - 258 \text{ nM})$ у пациентов с ганглионейробластомой (нодулярный тип)</p> <p>$X = 147 (7,8 - 1060 \text{ nM})$ у пациентов с НБ</p> <p>$X = 21,3 (7,8 - 880 \text{ nM})$ у пациентов группы низкого риска</p> <p>$X = 20,6 (7,9 - 68,3 \text{ nM})$ у пациентов группы промежуточного риска</p> <p>$X = 167 (16,1 - 1060 \text{ nM})$ у пациентов группы высокого риска</p> <p>$X = 28,2 (3,0 - 389 \text{ nM})$ у пациентов с рецидивом НБ</p> <p>Исследование GD2 методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии в контрольной группе и в группе больных с другими ЗНО:</p> <p>$X = 5,6 (< LLQ - 15,5 \text{ nM})$ у пациентов контрольной группы</p> <p>$X = 34 (6 - 111 \text{ nM})$ у пациентов с МБ</p> <p>$X = 11 (< LLQ - 35 \text{ nM})$ у пациентов с глиомами высокой степени злокачественности</p> <p>$X = 2,5 (< LLQ - 15 \text{ nM})$ у пациентов с эмбриональной РМС, остеогенной саркомой, СЮ, ОВ, ГБ, ЛХ, НХЛ, ОМЛ</p> <p>- концентрация GD2 > 200 nM насыщает > 95 % сайтов связывания ch14, 18, что может влиять на эффективность терапии, если большинство активных сайтов связывания будут заняты циркулирующим GD2</p> <p>- validation of liquid chromatography/mass spectrometry method for detection of GD2 concentration in blood serum;</p> <p>- absence of correlation between the stage of the disease and GD2 determined by liquid chromatography/mass spectrometry</p> <p>- correlation of the quantitative nature of liquid chromatography/mass spectrometry in comparison with thin-layer chromatography, HPLC</p> <p>GD2 study by liquid chromatography/mass spectrometry in an experimental group of patients:</p> <p>$X = 4,1 (< LLQ - 9,4 \text{ nM})$ in patients with ganglioneuroma</p> <p>$X = 6,4 (< LLQ - 15,3 \text{ nM})$ in patients with ganglioneuroblastoma (mixed)</p> <p>$X = 39,1 (< LLQ - 258 \text{ nM})$ in patients with ganglioneuroblastoma (nodular)</p> <p>$X = 147 (7,8 - 1060 \text{ nM})$ in patients with NB</p> <p>$X = 21,3 (7,8 - 880 \text{ nM})$ in patients LRG</p> <p>$X = 20,6 (7,9 - 68,3 \text{ nM})$ in patients IRG</p> <p>$X = 167 (16,1 - 1060 \text{ nM})$ in patients HRG</p> <p>$X = 28,2 (3,0 - 389 \text{ nM})$ in patients with recurrent NB</p> <p>GD2 study by liquid chromatography/mass spectrometry in the control group and in the group of patients with other malignant neoplasms:</p> <p>$X = 5,6 (< LLQ - 15,5 \text{ nM})$ in patients of the control group</p> <p>$X = 34 (6 - 111 \text{ nM})$ in patients with MB</p> <p>$X = 11 (< LLQ - 35 \text{ nM})$ in patients with HGG</p> <p>$X = 2,5 (< LLQ - 15 \text{ nM})$ in patients with ERMS, osteogenic sarcoma, ES, WT, GB, HL, NHL, AML</p> <p>- GD2 concentration > 200 nM saturates > 95 % of ch14, 18 binding sites, which may affect the effectiveness of therapy if the majority of active binding sites are occupied by circulating GD2</p>

Note. NB – neuroblastoma; ERMS – embryonic rhabdomyosarcoma; ALL – acute lymphoblastic leukemia; WT – Wilms tumor; ES – Ewing's sarcoma; HL – Hodgkin's lymphoma; NHL – non-Hodgkin's lymphomas; AML – acute myeloid leukemia; RB – retinoblastoma; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, EFS – event-free survival; HPLC – high performance liquid chromatography; LRG – low risk group; IRG – intermediate risk group; HRG – high risk group; MB – medulloblastoma; GB – hepatoblastoma; HGG – high grade gliomas.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Spix C., Pastore G., Sankila R., Stiller C.A., Steliarova-Foucher E. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978–1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*. 2006;42(13):2081–91. doi: 10.1016/j.ejca.2006.05.008. PMID: 16919772.
- Matthay K.K., Maris J.M., Schleiermacher G., Nakagawara A., Mackall C.L., Diller L., Weiss W.A. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16078. doi: 10.1038/nrdp.2016.78. PMID: 27830764.
- Berthold F., Spix C., Kaatsch P., Lampert F. Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979–2015. *Paediatr Drugs*. 2017;19(6):577–93. doi: 10.1007/s40272-017-0251-3. PMID: 28786082.
- Park J.R., Bagatell R., London W.B., Maris J.M., Cohn S.L., Matthay K.K., Hogarty M.; COG Neuroblastoma Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(6):985–93. doi: 10.1002/pbc.24433.
- Ladenstein R., Ambros I.M., Pötschger U., Amann G., Urban C., Fink F.M., Schmitt K., Jones R., Slociak M., Schilling F., Ritter J., Berthold F., Gadner H., Ambros P.F. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(1):83–92. doi: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<83::AID-MPO1020>3.0.CO;2-9. PMID: 11464912.
- Simon T., Spitz R., Faldum A., Hero B., Berthold F. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(12):791–6. PMID: 15591897.
- Petrov I., Suntsova M., Ilitskaya E., Roumiantsev S., Sorokin M., Garazha A., Spirin P., Lebedev T., Gaifullin N., Larin S., Kovalchuk O., Konovalov D., Prassolov V., Roumiantsev A., Buzdin A. Gene expression and molecular pathway activation signatures of MYCN-amplified neuroblastomas. *Oncotarget*. 2017;8(48):83768–80. doi: 10.18632/oncotarget.19662. PMID: 29137381.
- Wu Z.L., Schwartz E., Seeger R., Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1986;46(1):440–3. PMID: 3940209.
- Fleurence J., Fougeray S., Bahri M., Cochonneau D., Clémenceau B., Paris F., Heczey A., Birkel S. Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res*. 2017;2017:5604891. doi: 10.1155/2017/5604891.
- Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem*. 1963;10:613–23. doi: 10.1111/j.1471-4159.1963.tb08933.x. PMID: 14066623.
- Lopez P.H., Schnaar R.L. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(5):549–57. doi: 10.1016/j.sbi.2009.06.001.
- Schulz G., Cheres D.A., Varki N.M., Yu A., Staffileno L.K., Reisfeld R.A. Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res*. 1984;44(12 Pt 1):5914–20. PMID: 6498849.
- Kolter T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem*. 2012;2012:506160. doi: 10.5402/2012/506160. PMID: 25969757.
- Sariola H., Terävä H., Rapola J., Saarinen U.M. Cell-surface ganglioside GD2 in the immunohistochemical detection and differential diagnosis of neuroblastoma. *Am J Clin Pathol*. 1991;96(2):248–52. doi: 10.1093/ajcp/96.2.248. PMID: 1713742.
- Portoukalian J., David M.J., Gain P., Richard M. Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma. *Int J Cancer*. 1993;53(6):948–51. doi: 10.1002/ijc.2910530614.
- Suzuki M., Cheung N.K. Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(3):349–62. doi: 10.1517/14728222.2014.986459.
- Sait S., Modak S. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017;17(10):889–904. doi: 10.1080/14737140.2017.1364995.
- Yu R.K., Tsai Y.T., Ariga T., Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci*. 2011;60(10):537–44. doi: 10.5650/jos.60.537. PMID: 21937853.
- Berois N., Osinaga E. Glycobiology of neuroblastoma: impact on tumor behavior, prognosis, and therapeutic strategies. *Front Oncol*. 2014;4:114. doi: 10.3389/fonc.2014.00114. PMID: 24904828.
- Balis F.M., Busch C.M., Desai A.V., Hibbitts E., Naranjo A., Bagatell R., Irwin M., Fox E. The ganglioside GD2 as a circulating tumor biomarker for neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2020;67(1):e28031. doi: 10.1002/pbc.28031.
- Kholodenko I.V., Kalinovskiy D.V., Doronin I.I., Deyev S.M., Kholodenko R.V. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res*. 2018;2018:7394268. doi: 10.1155/2018/7394268. PMID: 30116755.
- Busch C.M., Desai A.V., Moorthy G.S., Fox E., Balis F.M. A validated HPLC-MS/MS method for estimating the concentration of the ganglioside, GD2, in human plasma or serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018;1102–1103:60–5. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.10.010.
- Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F., London W.B., Kreissman S.G., Chen H.X., Smith M., Anderson B., Villablanca J.G., Matthay K.K., Shimada H., Grupp S.A., Seeger R., Reynolds C.P., Buxton A., Reisfeld R.A., Gillies S.D., Cohn S.L., Maris J.M., Sondel P.M.; Children's Oncology Group. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324–34. doi: 10.1056/NEJMoa0911123.
- Шаманская Т.В., Андреева Н.А., Уталиева Д.Т., Качанов Д.Ю. GD2-направленная иммунотерапия нейробластомы группы высокого риска с использованием химерных антител ch14.18. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020;19(3):173–88. doi: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-173-188. [Shamanskaya T.V., Andreeva N.A., Utalieva D.T., Kachanov D.Yu. Anti-GD2 immunotherapy with the chimeric antibody ch14.18 for high-risk neuroblastoma. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020;19(3):173–88. (In Russ.)].
- Yoshida S., Fukumoto S., Kawaguchi H., Sato S., Ueda R., Furukawa K. Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res*. 2001;61(10):4244–52. PMID: 11358851.
- Shibuya H., Hamamura K., Hotta H., Matsumoto Y., Nishida Y., Hattori H., Furukawa K., Ueda M., Furukawa K. Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci*. 2012;103(9):1656–64. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02344.x.
- Furukawa K., Hamamura K., Ohkawa Y., Ohmi Y., Furukawa K. Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj J*. 2012;29(8–9):579–84. doi: 10.1007/s10719-012-9423-0.
- Ladisch S., Kitada S., Hays E.F. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J Clin Invest*. 1987;79(6):1879–82. doi: 10.1172/JCI113031. PMID: 3584474.
- Ladisch S., Ulsh L., Gillard B., Wong C. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *J Clin Invest*. 1984;74(6):2074–81. doi: 10.1172/JCI111631. PMID: 6511916.
- Diatlovitskaia E.V., Kliuchareva E.V., Matveeva V.A., Sinitsyna E.V., Akhmed-Zade A.Sh. Effect of gangliosides on the cytotoxic activity of natural killers from Syrian hamsters. *Biokhimiia*. 1985;50(9):1514–6. PMID: 4052509.
- Ladisch S., Wu Z.L. Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet*. 1985;1(8421):136–8. doi: 10.1016/s0140-6736(85)91906-3. PMID: 2857215.
- Ladisch S., Wu Z.L., Feig S., Ulsh L., Schwartz E., Floutsis G., Wiley F., Lenarsky C., Seeger R. Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma. *Int J Cancer*. 1987;39(1):73–6. doi: 10.1002/ijc.2910390113. PMID: 3539825.

33. Barkal A., Di Cesare J.L. Influence of sialic acid groups on the retention of glycosphingolipids in blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1975;398(2):287–93. doi: 10.1016/0005-2760(75)90144-7. PMID: 1182139.
34. Czaplicki D., Horwacik I., Kowalczyk A., Wieczorek A., Bolek-Marzec K., Balwierz W., Kozik A., Rokita H. New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(3):423–31. PMID: 19724779.
35. Valentino L., Moss T., Olson E., Wang H.J., Elashoff R., Ladisch S. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood*. 1990;75(7):1564–7. PMID: 2317562.
36. Ladisch S., Gillard B. A solvent partition method for microscale ganglioside purification. *Anal Biochem*. 1985;146(1):220–31. doi: 10.1016/0003-2697(85)90419-1. PMID: 3993932.
37. Ladisch S., Gillard B. Isolation and purification of gangliosides from plasma. *Methods Enzymol*. 1987;138:300–6. doi: 10.1016/0076-6879(87)38025-5. PMID: 3600328.
38. Ledeen W., Yu R.K. Gangliosides: structures, isolation, and analysis. In: *Methods in enzymology*. V. Ginsburg (ed.). Vol. 83, Part D. Academic Press, New York, 1982. Pp. 139–191.
39. Terzie T., Cordeau M., Herblot S., Teira P., Cournoyer S., Beaunoyer M., Peuchmaur M., Duval M., Sartelet H. Expression of Disialoganglioside (GD2) in Neuroblastic Tumors: A Prognostic Value for Patients Treated With Anti-GD2 Immunotherapy. *Pediatr Dev Pathol*. 2018;21(4):355–62. doi: 10.1177/1093526617723972.
40. Keyel M.E., Reynolds C.P. Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: development and place in therapy. *Biologics*. 2018;13:1–12. doi: 10.2147/BTT.S114530.
41. Mujoo K., Cheres D.A., Yang H.M., Reisfeld R.A. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res*. 1987;47(4):1098–104. PMID: 3100030.

Статья поступила в редакцию: 20.09.2021. Принята в печать: 22.10.2021.

Article was received by the editorial staff: 20.09.2021. Accepted for publication: 22.10.2021.