

ОБЗОРЫ

REVIEWS

Классическая лимфома Ходжкина: структура опухоли и прогностическое значение иммунного микроокружения

А.А. Гусак, К.В. Лепик, Л.В. Федорова, В.В. Маркелов, В.В. Байков

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

Classical Hodgkin Lymphoma: Tumor Structure and Prognostic Value of the Immune Microenvironment

AA Gusak, KV Lepik, LV Fedorova, VV Markelov, VV Baykov

RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Классическая лимфома Ходжкина (ЛХ) представляет собой уникальное злокачественное новообразование лимфатической системы, характеризующееся наличием опухолевых клеток (Ходжкина и Рид—Штернберга) в воспалительном и иммуносупрессивном микроокружении. Микроокружение ЛХ — комплексная динамичная среда, включающая иммунные клетки, стромальные элементы и компоненты внеклеточного матрикса, которые взаимодействуют друг с другом и с опухолевыми клетками. От характера этих взаимодействий во многом зависит как прогрессирование заболевания, так и ответ на терапию. В настоящее время возрастает интерес к изучению структуры и функции микроокружения ЛХ, его прогностического значения, потенциала его компонентов в качестве новых мишеней для лекарственной терапии. В последнее десятилетие значительно улучшились результаты лечения рефрактерных форм ЛХ, в частности, за счет применения ингибиторов PD-1 ниволумаба и пембролизумаба. Высокая чувствительность ЛХ к анти-PD-1-терапии обусловлена формированием PD-1/PD-L1-ассоциированной ниши в ткани опухоли. Основой ниши является интенсивная экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками, макрофагами и экспрессия его рецептора PD-1 T-клетками и M2-макрофагами. Накапливается все больше сведений о возможных механизмах противоопухолевого ответа у пациентов с ЛХ при анти-PD-1-терапии, противоречащих концепции классического CD8-опосредованного ответа при солидных опухолях. Вероятно, цитотоксические эффекты анти-PD-1-терапии в ткани ЛХ достигаются путем взаимодействия между опухолевыми клетками, макрофагами и CD4-позитивными T-лимфоцитами. В обзоре представлены сведения о структурных и регуляторных взаимоотношениях опухолевых клеток и элементов микроокружения, описываются новые терапевтические подходы, основанные на использовании в качестве мишеней различных компонентов опухолевого микроокружения, суммированы имеющиеся к настоящему времени данные о возможности прогнозирования на основе изучения характеристик микроокружения ЛХ.

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) is a unique malignant lymphoid neoplasm characterized by tumor (Hodgkin and Reed-Sternberg) cells in the inflammatory and immunosuppressive microenvironment. The cHL microenvironment is a complex dynamic environment with immune cells, stromal elements, and extracellular matrix components, all of them interacting with each other and with tumor cells. This interaction basically underlies both disease progression and response to therapy. Currently, there is a growing interest in studying the structure and functions of cHL microenvironment, its prognostic value, and the potential of its components to be used as new therapeutic targets. During the last decade, the outcomes of refractory cHL treatment have considerably improved, in particular due to the administration of such PD-1 inhibitors as nivolumab and pembrolizumab. High cHL sensitivity to anti-PD-1 therapy can be accounted for by the PD-1/PD-L1-associated niche being formed in the tumor tissue as a result of intensive PD-L1 expression by tumor cells and macrophages as well as the expression of its PD-1 receptor by T-cells and M2-macrophages. More and more information becomes available about the possible mechanisms of antitumor response in anti-PD-1 treated cHL patients which seems to contradict the traditional understanding of CD8-mediated response in solid tumors. Cytotoxic effects of anti-PD-1 therapy in cHL tissues are likely to result from the interaction between tumor cells, macrophages, and CD4-positive T-lymphocytes. This review discusses structural and regulatory relationships between tumor cells and microenvironment components, deals with new therapy approaches using various microenvironment components as targets, and summarizes currently available knowledge on prognosis based on the study of cHL microenvironment.

Ключевые слова: классическая лимфома Ходжкина, микроокружение, иммунные контрольные точки, поляризация макрофагов, иммуносупрессивная ниша.

Keywords: classical Hodgkin lymphoma, microenvironment, immune checkpoints, macrophage polarization, immunosuppressive niche.

Получено: 12 апреля 2023 г.

Принято в печать: 25 июня 2023 г.

Received: April 12, 2023

Accepted: June 25, 2023

Для переписки: Артем Александрович Гусак, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; e-mail: artemgusak@yandex.ru

For correspondence: Artem Aleksandrovich Gusak, 6/8 L'va Tolstogo ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022; e-mail: artemgusak@yandex.ru

Для цитирования: Гусак А.А., Лепик К.В., Федорова Л.В., Маркелов В.В., Байков В.В. Классическая лимфома Ходжкина: структура опухоли и прогностическое значение иммунного микроокружения. Клиническая онкогематология. 2023;16(3):242–62.

For citation: Gusak AA, Lepik KV, Fedorova LV, Markelov VV, Baykov VV. Classical Hodgkin Lymphoma: Tumor Structure and Prognostic Value of the Immune Microenvironment. Clinical oncohematology. 2023;16(3):242–62. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-3-242-262

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-3-242-262

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

Злокачественные лимфопрлиферативные заболевания — клинически и биологически гетерогенная группа опухолей, включающая в себя многочисленные нозологические формы с различными структурой, архитектурой, иммунофенотипом и биологическим поведением. В любой лимфоидной опухоли имеется примесь реактивных клеток. По соотношению количества опухолевых клеток и клеток микроокружения лимфоидные опухоли можно разделить на несколько категорий — от лимфом с немногочисленными иммунными реактивными клетками (например, лимфома Беркитта) до лимфом с немногочисленными опухолевыми клетками (например, лимфома Ходжкина) [1]. Доля и распределение опухолевых клеток в ткани опухоли обычно определяются соотношением темпов пролиферации и миграции клеток. Однако для опухолей, в которых количество опухолевых клеток невелико, значительную роль, по-видимому, играют взаимоотношения, которые складываются между опухолевыми клетками и элементами микроокружения [2].

Классическая лимфома Ходжкина (ЛХ) — уникальная лимфоидная опухоль с многокомпонентным клеточным составом, в котором реактивные клеточные популяции составляют основную часть опухолевой массы, а опухолевые клетки немногочисленны (обычно 1–2 %) и утратили большинство признаков линейной принадлежности [3].

Мутационный профиль опухолевых клеток

Клетки опухоли (Ходжкина и Рид—Штернберга — Х-РШ) происходят из В-клеток зародышевого центра фолликула, которые должны подвергнуться апоптозу, поскольку экспрессируют нефункциональные В-клеточные рецепторы (BCR). В-клеточное происхождение лимфомы подтверждается мутантным статусом гена *IGV*. В процессе развития опухоли возникают патогенные мутации, которые приводят к формированию неполноценного BCR [4, 5]. Отсутствие рецептор-индуцированных сигналов наряду с накоплением других

мутаций способствует утрате В-клеточной программы, что связано в первую очередь с дефицитом факторов транскрипции Oct-2, BOB1, PU-1 [6]. В связи с этим активация механизмов выживания и пролиферации опухолевой клетки происходит за счет альтернативных сигнальных путей. Реализация таких механизмов в значительной степени обеспечивается активацией сигнальных путей NF-κB [7], JAK-STAT [8], транскрипционного фактора AP-1 [9] и, в меньшей степени, фактора Notch1 [10], путей MAPK/ERK [11] и PI3K/AKT/mTOR [12, 13]. Высокая экспрессия рецепторов семейства TNF (CD30, CD40, CD95, TACI, BCMA, RANK) на поверхности опухолевой клетки обеспечивает усиление функциональной активности этих путей [14–17].

Активация пути NF-κB происходит вследствие активирующих и инактивирующих мутаций в генах *TNFAIP3*, *NFKBIA*, *NFKBIE*, *TRAF3*, *CYLD*, *NIK*, *REL*, пути JAK-STAT за счет мутаций в генах *JAK2*, *STAT3*, *STAT5*, *STAT6*, *SOCS1* и *PTPN1* [18, 19]. Механизмы, препятствующие апоптозу, реализуются в опухолевой клетке не только благодаря конститутивной активации перечисленных сигнальных путей. Гиперэкспрессия ключевого функционального ингибитора апоптоза c-FLIP [20, 21] и, в меньшей степени, мутация в гене *FAS* [22] тормозят активацию апоптоза в опухолевой клетке, реализованного через комплекс FAS(CD95)–FASL(CD95L), оба компонента которого экспрессируются на опухолевой клетке [23–25]. Используя поверхностный CD95L, опухолевая клетка может ускользать от иммунного ответа, запуская апоптоз в реактивных иммунных клетках [26].

Одной из самых важных патогенетически значимых хромосомных аномалий является дефект 9p24, обеспечивающий через добавочные копии, полисомию или амплификацию этого локуса конститутивную (гипер)экспрессию лигандов PD-1 — PD-L1 и PD-L2 [27]. Система PD-1–PD-L1/2 — это один из компонентов механизма иммунных контрольных точек, регулирующего противоопухолевый ответ [28]. Взаимодействие перечисленных лигандов с рецепторами на иммунных клетках тормозит распознавание мишеней и эффекторные функции последних. Кроме того, существуют альтернативные механизмы уси-

ления экспрессии лигандов PD-L1/2 на мембране опухолевых клеток. Так, например, амплификация гена *JAK2* и активация AP-1 могут усиливать экспрессию PD-L1 [29, 30], а хромосомные перестройки, вовлекающие ген *CITTA*, вызывают гиперэкспрессию PD-L1 и PD-L2 и снижение МНС II класса (МНС-II) [31]. В опухолевой клетке может быть подавлена и экспрессия МНС I класса (МНС-I) за счет мутаций в гене *β2M* [32]. В результате снижается эффективность представления опухолевых антигенов CD4-позитивным и CD8-позитивным Т-клеткам [33, 34]. Дефекты в МНС-I и -II могут быть связаны с неблагоприятными клиническими исходами [35, 36]. Наиболее важные особенности мутационного и регуляторного профиля опухолевых клеток отражены на рис. 1 (см. ниже).

Вирус Эпштейна—Барр и лимфома Ходжкина

Важную роль в онкогенезе при ЛХ, в т. ч. в формировании aberrantных сигнальных профилей, играет вирус Эпштейна—Барр (EBV). Наличие EBV в опухолевых клетках фиксируется примерно у 40% пациентов с ЛХ [37]. В инфицированной клетке вирус чаще существует в форме эписомы, но может быть интегрирован в геном [38]. Статус EBV в опухолевых клетках обычно соответствует латенции II типа, которая предполагает экспрессию EBER, BART, EBNA-1, LMP1, LMP2 [39]. EBV способен обеспечивать долговременное самоподдержание, если не бессмертие опухолевых клеток, лишенных функционального BCR, и стимулировать их рост за счет дополнительной активации транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 и способности LMP1 и LMP2 имитировать CD40- и BCR-опосредованную передачу сигналов [40–42]. Кроме того, LMP1 индуцирует гиперэкспрессию PD-L1, что вносит дополнительный вклад в формирование механизмов уклонения опухоли от иммунного ответа [30].

Структура и гистологические подтипы лимфомы Ходжкина

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый за последние несколько десятилетий в области понимания генетической основы выживания клеток ЛХ, механизмов активации сигнальных путей, способствующих пролиферации и препятствующих апоптозу, многие аспекты структуры опухоли и поведения опухолевых клеток остаются неясными. Широкий мутационный спектр способен только частично объяснить биологические особенности ЛХ [18]. Основные трансформирующие события, которые приводят к развитию ЛХ, в значительной степени известны [43]. Однако по-прежнему не до конца ясно, почему в опухолевой ткани столь низкая доля опухолевых клеток и почему опухолевые клетки в большинстве случаев не способны образовывать поля сплошного роста. Полагают, что в клетках возникают критические нарушения клеточного деления и цитокинеза, по крайней мере отчасти связанные с дисрегуляцией контрольных точек клеточного цикла [44]. Важным аспектом понимания биологии ЛХ является анализ механизмов, которые обеспечивают выживание опухолевых клеток в потенциально летальном для них окружении, богатом иммунными клетками. Действительно, микроокружение ЛХ формируется различ-

ными классами Т-клеток, В-клетками, макрофагами, НК-клетками, дендритными клетками, супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), тучными клетками, сосудами, фибробластами, эозинофильными и нейтрофильными гранулоцитами. Анализ микроокружения важен для определения гистологического подтипа опухоли, поиска новых прогностических и предиктивных факторов и обнаружения новых мишеней для таргетной терапии [45].

На основании клеточного состава, взаимного расположения опухолевых и иммунных клеток, архитектуры стромы выделяют четыре варианта опухолевого роста [46]:

- вариант с нодулярным склерозом (НС);
- смешанно-клеточный вариант (СК);
- вариант с лимфоидным истощением;
- вариант, богатый лимфоцитами.

Британская национальная группа по исследованию лимфом (BNLI) предложила классифицировать НС на два подтипа: grade 1 и grade 2 (НС1 и НС2). Случаи с НС2 характеризуются, в частности, образованием крупных полей синцитиального роста клеток Х-РШ, связанных с очагами некроза и выраженной гистиомакрофагальной инфильтрацией, значительным полиморфизмом клеток, нередко с приобретением ими анапластических черт [47]. Изначально НС2 связывали с более слабым ответом на терапию и более высокой частотой рецидивов [48, 49]. Прогностическая значимость такого деления утратила силу в связи с внедрением новых терапевтических подходов [50].

Морфология лимфомы Ходжкина.

Удачи и неудачи лечения

К классическим (диагностическим) опухолевым клеткам относятся одноядерные клетки Ходжкина и двоядерные клетки Рид—Штернберга. Их морфология свидетельствует о выраженной синтетической функции. Вариантом классических клеток являются так называемые лакунарные, свойственные НС-варианту, хотя структура их ядер совершенно иная по сравнению с классическими клетками Х-РШ. Однако среди опухолевых клеток встречаются, а иногда и преобладают клетки среднего или умеренно крупного размера, напоминающие активированные, а также клетки LP-типа. В ряде случаев в опухолевой популяции имеется значительное количество клеток с анапластическими чертами [51]. Почти постоянно наблюдаются так называемые мумифицированные клетки — гибнущие клетки опухоли. Полагают, что механизм их гибели близок к апоптозу, но отличается отсутствием фрагментации ДНК [52]. Иммунофенотип клеток Х-РШ существенно отличается от других лимфоидных или гемопоэтических клеток. Он характеризуется главным образом наличием нелинейных активационных антигенов при почти полной утрате В-клеточной программы. CD30 служит диагностическим маркером: в опухолевых клетках имеется яркое мембранное окрашивание и/или точечное окрашивание клеток в парануклеарной зоне (Гольджи). Экспрессия маркера активации/постфолликулярной дифференцировки *MuM.1* постоянная, а CD15 — вариабельная.

Диагностическое значение имеет экспрессия В-клеточного фактора транскрипции *Rax-5*. Она сохра-

няется, но ядра опухолевых клеток обычно окрашиваются значительно слабее ядер резидуальных В-лимфоцитов. Экспрессия CD45 отсутствует. В-клеточные антигены (CD20, CD19, CD22, CD79 α , Vcl-6, Oct-2 и т. п.), как правило, утрачены, хотя слабая гетерогенная экспрессия по крайней мере одного из них может наблюдаться в небольшой части клеток [53, 54]. В ряде случаев отмечается aberrантная экспрессия Т-клеточных маркеров (чаще CD4 и CD2, цитотоксических молекул) [55]. Нельзя исключить, что такое окрашивание возникает за счет абсорбции молекул, высвободившихся из мембран или цитоплазмы гибнущих Т-клеток. Большинство случаев aberrантной экспрессии Т-клеточных маркеров относится к НС2. Существовало мнение, что такая ассоциация сопряжена с неблагоприятным прогнозом [56].

За последние десятилетия расширяются знания о значении опухолевого микроокружения, которое претендует на роль ключевого биологического фактора прогрессии, поскольку обеспечивает рост опухоли, ее распространение и формирование резистентности к терапии [57, 58]. Несмотря на многообразие генетических аномалий, необычную структуру опухоли, выраженное подавление противоопухолевого иммунного ответа, ЛХ излечима. Достижение стойких ремиссий или излечение наблюдаются у 70–80 % пациентов в первой линии терапии, но до 30 % пациентов имеют рефрактерное течение или у них развивается рецидив заболевания [59, 60]. Высокодозная химиотерапия с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) считается стандартом второй линии терапии ЛХ. Она приводит к излечению примерно 50 % пациентов [61]. Однако в случае отсутствия ответа после аутоТГСК достижение длительных ремиссий возможно лишь у небольшой группы больных (15–20 %). Улучшение прогноза в этой группе было достигнуто благодаря широкому внедрению в практику брентуксимаба ведотина и ингибиторов иммунных контрольных точек ниволумаба, пембролизумаба, эффективность которых была продемонстрирована как в клинических исследованиях, так и в реальной клинической практике [62–65].

Тщательное изучение структуры опухоли — это попытка объяснить неудачи терапии, разгадать причины резистентности и развития рецидивов, найти новые точки приложения противоопухолевых препаратов. Кроме того, появление новых схем лечения и совершенствование прогностических шкал, основанных на оценке клинических, лабораторных, рентгенологических и морфологических данных, могли бы помочь индивидуализировать терапию и определить оптимальную стратегию лечения.

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ И КОМПОНЕНТАМИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ ЛИМФОМЕ ХОДЖКИНА

Клеточный состав ЛХ подробно охарактеризован. В рутинной практике его оценивают с помощью гистологического и иммуногистохимического исследований. Характеристика клеточного состава

уточняется с помощью проточной цитометрии [66], масс-цитометрии (в т. ч. CyTOF-cytometry by time of flight) [67], молекулярно-генетического исследования (в т. ч. генного профилирования опухоли) [68], топографического и пространственного анализа (в т. ч. IMC-Imaging Mass Cytometry, MIBI-Multiplexed Ion Beam Imaging) [69–71].

Цитокины и хемокины

Опухолевые и реактивные клетки микроокружения формируют плотную регуляторную сеть, основанную преимущественно на паракринных взаимодействиях и мембранных контактах [72]. Аномальная активация сигнальных путей и факторов транскрипции в клетках Х-РШ индуцирует синтез и секрецию цитокинов, хемокинов, факторов роста, в частности CCL5 [73], CCL17 (TARC) [74, 75], CCL22 [76], интерлейкина-7 (IL-7) [77], IL-10 [78], трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [79, 80], которые обеспечивают хемотаксис клеток различных классов. За счет них клетки Х-РШ перепрограммируют иммунные клетки, создавая уникальную архитектуру микроокружения. Так, CCL5, CCL17 (TARC), CCL22 обеспечивают миграцию главным образом CD4-позитивных Т-лимфоцитов — Т-хелперов 1 и 2 (Th1 и Th2) и различных классов Т-регуляторных клеток (Treg). IL-7, IL-10, TGF- β создают благоприятную иммуносупрессивную нишу для клеток Х-РШ: они подавляют рост и дифференцировку Т- и НК-клеток, их эффекторные функции, блокируют секрецию провоспалительных цитокинов (например, IL-2, IFN- γ) клетками Th1, способствуют ангиогенезу. Кроме того, TGF- β наряду с IL-13 и фактором некроза опухолей α (TNF- α) усиливает пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, а CCL5 способен привлекать макрофаги, тучные клетки, эозинофильные гранулоциты. Продукция TGF- β , интерферона- γ (IFN- γ), колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1), CX3CL1 стимулирует миграцию макрофагов и усиливает их функции.

Клетки микроокружения также обладают высокой секреторной активностью, способствуя поддержанию многообразия неклональных популяций в ткани опухоли. Фибробласты могут привлекать эозинофильные гранулоциты и Th2 за счет секреции CCL11, а IL-8, секретлируемый макрофагами, способствует нейтрофильной инфильтрации. Вырабатываемые различными клетками IL-5, IL-9 и CCL28, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) способствуют, в частности, привлечению эозинофильных гранулоцитов, а уровень CCL28 и CXCL16 связан с инфильтрацией плазматическими клетками [81–86].

Определенный вклад в формирование иммуносупрессивной среды вносит EBV. Инфицированные клетки усиливают секрецию хемокинов CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22 и CXCL9, а вирусные белки EBNA1 и LMP1 могут активировать миграцию Th2 и Treg. В EBV-позитивной в отличие от EBV-негативной ЛХ определяется более высокий уровень CCL20 и большее количество FOXP3-позитивных Treg, которые ингибируют эффекторные CD4- и CD8-позитивные Т-клетки [41, 87–92].

Цитокины, секретируемые клетками Х-РШ и иммунными клетками, способны стимулировать активацию сигнальных путей. Так, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF активируют сигнальный путь JAK/STAT [93].

Сывороточная концентрация некоторых цитокинов и хемокинов, участвующих в формировании и моделировании микроокружения ЛХ, может служить прогностическим маркером. Например, концентрация хемокина, регулируемого тимусом и активацией (thymus and activation-regulated chemokine, TARC), повышена у пациентов с ЛХ в сравнении с другими лимфомами [94]. Кроме того, уровень TARC связан со стадией заболевания, ПЭТ-статусом и эффективностью терапии. Сниженный уровень TARC служит значимым предиктором благоприятного клинического течения [95–98], а повышенный уровень сывороточного IL-10 коррелирует с более низкими показателями выживаемости [99]. Наиболее важные элементы цитокинового профиля опухолевой ткани отражены на рис. 1 (см. ниже).

Т-клетки и макрофаги в ткани лимфомы Ходжкина

Вокруг опухолевой клетки при ЛХ формируется иммуносупрессивная ниша. Ее основными компонентами являются Т-лимфоциты и макрофаги. Клетки ниши характеризуются низкой реактивностью. Они вырабатывают сигналы, которые стимулируют ангиогенез, обеспечивают миграцию новых иммунных клеток, но блокируют их функцию [100].

Т-клетки

Среди иммунных клеток, мобилизованных клетками Х-РШ, Т-лимфоциты являются одной из наиболее крупных популяций. Субпопуляции Т-клеток включают CD8-позитивные цитотоксические Т-лимфоциты и различные классы CD4-позитивных клеток (Th1, Th2, Th17, Т-фолликулярные хелперы [Tfh] и Treg) [101]. По направлению и степени дифференцировки Т-лимфоциты могут быть охарактеризованы как наивные клетки, клетки центральной памяти, эффекторные клетки-предшественники и терминально дифференцированные эффекторные клетки (TEMRA) [67, 102].

Активация и ингибирование функций Т-клеток.

Для активации Т-клеток требуется взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) с МНС и запуск координирующих сигналов, возникающих, в частности, при взаимодействии рецептора CD28 на Т-клетках и лигандов семейства B7 (CD80 и CD86). Однако активация Т-клеточного сигнала может быть подавлена благодаря конкуренции CTLA-4 с CD28 за связывание с B7 или высокой экспрессии коингибирующих рецепторов — молекул иммунных контрольных точек (PD-1, LAG-3, TIM-3 и др.), которые приводят к функциональной блокаде Т-клеток. В результате снижается их эффекторный потенциал (продукция цитокинов, цитотоксичность) и способность к пролиферации [103–106]. Однако такое истощение Т-клеток является обратимым, а нарушение связей между лигандами и рецепторами иммунных контрольных точек может

приводить к реактивации Т-клеток [107]. Кроме того, описывается способность PD-L1 (лиганда PD-1) конкурировать с CD28 за связывание с его лигандом CD80, а также ингибировать коингибирующую функцию CD28 и активацию Т-клеток [108]. Экспрессия ингибирующих молекул на Т-клетках неоднородна, а их коэкспрессия (> 2 молекул) на Т-клетках встречается редко [109].

Анализ межклеточных контактов продемонстрировал, что Т-клетки, находящиеся в прямом контакте с клетками Х-РШ, чаще экспрессируют CTLA-4, чем PD-1 или LAG-3. Экспрессия PD-1 на Т-клетках в ткани ЛХ была значительно ниже, чем других коингибирующих молекул [109–111]. Кроме того, показана высокая экспрессия CD86, лиганда для CTLA-4, почти на всех клетках опухоли и более слабая его экспрессия на макрофагах [109]. Плотность PD-1 на Т-клетках в ткани ЛХ была значительно ниже, чем в лимфоидной ткани при реактивных состояниях [112, 113], а уровень экспрессии PD-L1 не был связан с экспрессией PD-1 на Т-клетках [113]. Интересно отметить, что CD8-позитивные Т-лимфоциты, включая цитотоксические Т-клетки, не являются основной популяцией, экспрессирующей PD-1 и LAG-3, что указывает на значение популяции CD4-позитивных Т-клеток в регуляции иммунных контрольных точек при ЛХ [109, 110]. Коингибирующие рецепторы и их лиганды могут служить мишенями лекарственной терапии, а комбинация препаратов, блокирующих PD-1, CTLA-4, TIM-3 или LAG-3, способна обеспечить терапевтическую синергию и усилить противоопухолевый иммунный ответ, преодолевая резистентность к терапии [114].

Формирование иммуносупрессивной среды из Т-клеток.

Как известно, в клеточном инфильтрате преобладают CD4-позитивные клетки. Они способствуют росту опухоли и ее прогрессированию, экспрессируя молекулы (например, CD40L), вовлеченные в активацию различных сигнальных путей, например, NF-κB [115, 116]. Именно CD4-позитивные клетки формируют за счет молекул адгезии розеткоподобные скопления вокруг опухолевых клеток. В образовании такого иммунного контакта участвует ряд рецепторов и лигандов, например пара CD2-CD58. Нокаут гена *CD58* в клетке опухоли с одновременной потерей его продукта на мембране клетки или блокада CD2 снижали как образование розеток, так и активацию Т-клеток, способствуя ускользанию клеток Х-РШ от иммунного ответа [117–119].

Общее среднее количество CD8-позитивных и CD4-позитивных Т-клеток в образцах лимфоидной ткани при гиперплазиях и ткани ЛХ в целом существенно не различается [120], но при ЛХ изменяется соотношение их субпопуляций. Ряд авторов наблюдали в ткани ЛХ значительно меньшее количество CD8-позитивных наивных Т-клеток и NK-клеток с высокой экспрессией CD56, чем при реактивных состояниях. Оказалось, что и CD8-позитивные, и CD4-позитивные клетки в ткани ЛХ имеют более высокий уровень дифференцировки. Более дифференцированные CD4-позитивные Th1-поляризованные эффекторные клетки-предшественники и TEMRA экспрессировали PD-1, а менее дифференцированные CD4-позитивные Th1-, Th2- и Th17-поляризованные

клетки центральной памяти, а также Treg имели более низкий уровень экспрессии PD-1. CD4-позитивные наивные клетки были PD-1-негативными. Полагают, что в механизмах иммуносупрессии, опосредованной CD4-позитивными Т-клетками, участвуют две основные популяции: Th1-поляризованные функционально активные PD-1-негативные Treg и дифференцированные, вероятно истощенные, PD-1-позитивные эффекторные клетки, в частности Th1 [67, 102, 110, 112, 113]. Th1-поляризованные Treg располагались значительно ближе к клеткам Х-РШ, чем Th1 и неполяризованные Treg. Кроме того, наблюдалась корреляция между количеством Th1-поляризованных Treg и площадью PD-L1-окрашенных клеток, интенсивностью экспрессии PD-L1 на клетках Х-РШ и макрофагах, а также с МНС-II-статусом опухоли [113].

В опухолевом микроокружении происходит накопление классических Treg, экспрессирующих фактор FOXP3, значительная часть которых характеризуется экспрессией CD25 и CTLA-4. Treg играют важную роль в ограничении противоопухолевого иммунного ответа, в частности, за счет подавления противоопухолевых Th1. Treg реализуют иммуномодулирующую функцию через несколько механизмов, включая гиперэкспрессию молекул иммунных контрольных точек, потребление IL-2 и секрецию толерогенных цитокинов, таких как IL-10, TGF- β , IL-35 и галектин-1 [109, 112, 121–124].

Кроме классических Treg существует уникальная популяция FOXP3-негативных клеток с гиперэкспрессией LAG-3, которая обладает выраженными иммуносупрессивными свойствами, — это регуляторные Т-клетки 1 (Tr1). Они практически отсутствуют в лимфоидной ткани при реактивных гиперплазиях. Tr1 ингибируют эффекторные функции Т-клеток путем секреции больших количеств IL-10 и TGF- β . Было продемонстрировано, что иммуносупрессивные LAG-3-позитивные Tr1 находятся в пространственном контакте с преимущественно МНС-II-негативными клетками Х-РШ, в то время как классические FOXP3-позитивные Treg обычно локализуются вблизи МНС-II-позитивных опухолевых клеток. Как известно, IL-6 является фактором дифференцировки Tr1 и обогащения ими ткани, уровень IL-6 был значительно выше в случаях с МНС-II-негативными по сравнению с МНС-II-позитивными клетками Х-РШ. Можно предположить, что IL-6 индуцирует LAG-3-позитивные Т-клетки, а МНС-II-позитивность опухоли активно истощает их, следовательно, механизм индукции Tr1 и поддержание их популяции присутствуют только в МНС-II-негативных опухолях [100, 110].

Макрофаги

Опухоль-ассоциированные макрофаги представляют собой еще одну многочисленную клеточную популяцию, «обученную» опухолевыми клетками и частично подчиненную им. Макрофаги обладают высокой секреторной активностью, экспрессируют ряд молекул иммунных контрольных точек и соответствующих лигандов. Выраженная инфильтрация макрофагами может способствовать прогрессированию опухоли и/или формированию резистентности к те-

рапии. Популяция макрофагов гетерогенная, характеризуется пластичной функциональной активностью в зависимости от типа поляризации. Макрофаги обычно делят на две большие подгруппы: классически активированные M1 и альтернативно активированные M2. Они различаются поверхностными маркерами, транскрипционными факторами, секретируемыми цитокинами и биологическими функциями [125–127].

Субпопуляции макрофагов. Поляризацию M1-макрофагов (M1) индуцируют цитокины, секретируемые, в частности, Th1, — это IFN- γ и TNF- α . Поверхностный фенотип M1 включает в себя экспрессию таких маркеров, как TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, iNOS и МНС-II. Экспрессию генов M1 регулируют ключевые факторы транскрипции NF- κ B, STAT1, STAT5, IRF3 и IRF5, которые активируют их бактерицидные и противоопухолевые функции за счет высокой экспрессии TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 и CXCL10.

Поляризацию макрофагов по M2-пути обеспечивают клетки Х-РШ и некоторые субпопуляции Т-клеток (Th2, Treg, ареактивные цитотоксические Т-клетки) благодаря продукции цитокинов, таких как IL-4, IL-10, IL-13, IL-33, TGF- β , фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), TARC, CCL20, CCL22, молочная кислота. M2-макрофаги (M2) можно идентифицировать по экспрессии поверхностных маркеров CD206, CD163, CD209, FIZZ1, Ym1/2 и основных транскрипционных факторов STAT6, IRF4, JMJD3, PPAR δ/γ , c-maf, c-myc. M2, лишенные фагоцитарной активности, могут способствовать выживанию, пролиферации и прогрессированию опухоли и активировать ангиогенез [128–132].

Антифагоцитарный и проопухолевый механизмы в M2 реализуются в т. ч. комплексом CD47–SIRP- α . При взаимодействии CD47, гиперэкспрессированного на опухолевых клетках, с SIRP- α , расположенного на макрофагах (в частности, на M2) и дендритных клетках, нарушается перестройка цитоскелета и формирование фагоцитарного синапса. Блокада оси CD47/SIRP- α может ингибировать рост опухоли за счет подавления супрессивных эффектов SIRP- α , повышения активности макрофагов и перепрограммирования последних из M2 в M1 [133–138].

Система PD-1/PD-L1 в макрофагах. Макрофаги играют критическую роль в иммуносупрессии и ускользании опухоли от иммунного ответа. Реализации их иммуносупрессивных функций могут способствовать механизмы, связанные с осью PD-L1/PD-1 [139].

Макрофаги в ткани ЛХ гиперэкспрессируют PD-L1 [140], а M2 характеризуются высокой экспрессией PD-1 [141]. Активация макрофагов через PD-1 и PD-L1 приводит к их перепрограммированию в M2, снижению фагоцитоза и повышению секреции иммуносупрессивного IL-10 [139, 142]. Конститутивная экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и макрофагах создает благоприятную PD-L1-ассоциированную экосистему, подавляющую иммунный ответ. PD-L1-позитивные макрофаги находятся в непосредственной близости с клетками Х-РШ и PD-1-позитивными Т-лимфоцитами. Отмечается, что контактов с PD-L1-позитивными макрофагами и клетками Х-РШ больше именно у

PD-1/CD4-позитивных Т-лимфоцитов, а не у PD-1/CD8-позитивных Т-клеток [69]. Взаимосвязь между осью PD-1/PD-L1 и поляризацией макрофагов, функциональная PD-L1-ассоциированная среда в ткани ЛХ позволяют предполагать, что PD-1-позитивные и PD-L1-позитивные макрофаги могут стать мишенями, воздействие на которые приведет к переключению с M2- на M1-фенотип и активации противоопухолевого ответа [142].

Таким образом, данные о структурных и функциональных взаимосвязях клеток в ткани ЛХ, полученные в последние десятилетия, указывают на то, что клетки X-PШ «набирают и переобучают» свое микроокружение, в результате чего создается иммуносупрессивная ниша. Осознание биологического и клинического значения микроокружения обуславливает разработку новых подходов к терапии, направленных на различные составляющие элементы и перекрестные клеточные взаимодействия внутри микроокружения. Морфологические предиктивные/прогностические шкалы при ЛХ в настоящее время не разработаны. Одной из проблем внедрения таких шкал в клиническую практику является то, что клеточные популяции в ткани ЛХ высоко пластичны и их значение для прогноза, по-видимому, может меняться в зависимости от типа применяемой терапии. Большинство публикаций посвящено влиянию опухолевых клеток и особенностей микроокружения на клинические исходы после стандартной химиотерапии, а исследования роли клеточного состава ЛХ при иммунотерапии в имеющейся литературе единичны [101].

ГРАФИЧЕСКОЕ РЕЗЮМЕ

Основные клеточные компоненты иммуносупрессивной среды и связи между ними отражены на рис. 1.

Опухолевые клетки X-PШ обычно составляют менее 1 % всего клеточного состава опухоли. Они привлекают различные классы клеток за счет обильной секреции цитокинов и хемокинов (см. рис. 1). Продукция CCL5, CCL17, CCL20, CCL22 рекрутирует Т-клетки (например, Treg, Th1, Th2), IFN- γ , CSF-1, CX3CL1 — макрофаги (M), CCL5, IL-5 — эозинофильные гранулоциты (EO), тучные клетки (MC), CXCL16 — плазматические клетки (PC). TGF- β , TNF- α стимулируют дифференцировку в направлении фибробластов (F), а IL-8, секретируемый макрофагами, способствует нейтрофильной инфильтрации (N). Активация сигнальных путей NF- κ B, JAK/STAT, гиперэкспрессия ингибитора апоптоза с-FLIP, хромосомные aberrации, связанные с локусом 9p24, обеспечивают бесперебойную работу механизмов выживания и пролиферации клеток X-PШ. Частые мутации в генах MHC-I могут снижать эффективность представления опухолевых антигенов CD8-позитивным Т-клеткам (CTL). Отсутствие экспрессии молекул MHC-II на клетках X-PШ связано с интенсивной инфильтрацией Tr1, обладающих выраженными иммуносупрессивными функциями ввиду секреции IL-10 и TGF- β . В механизмах иммуносупрессии участвуют две основные популяции: Th1-поляризованные функционально активные PD-1-негативные (часто CTLA-4-позитивные)

Treg и дифференцированные, вероятно истощенные, эффекторные PD-1-позитивные клетки, в частности Th1. Последние образуют розеткоподобные скопления вокруг клеток X-PШ за счет взаимодействия CD2-CD58. Такие розетки становятся естественным барьером для CTL. Кроме того, подавлять эффекторные функции CTL, Th1, а также NK-клеток может система PD-1–PD-L1/2. Взаимодействия между клетками X-PШ и макрофагами через оси PD-1/PD-L1 и CD47/SIRP- α способствуют поляризации макрофагов в иммуносупрессивные M2 и торможению фагоцитоза (см. рис. 1).

ТЕРАПИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ

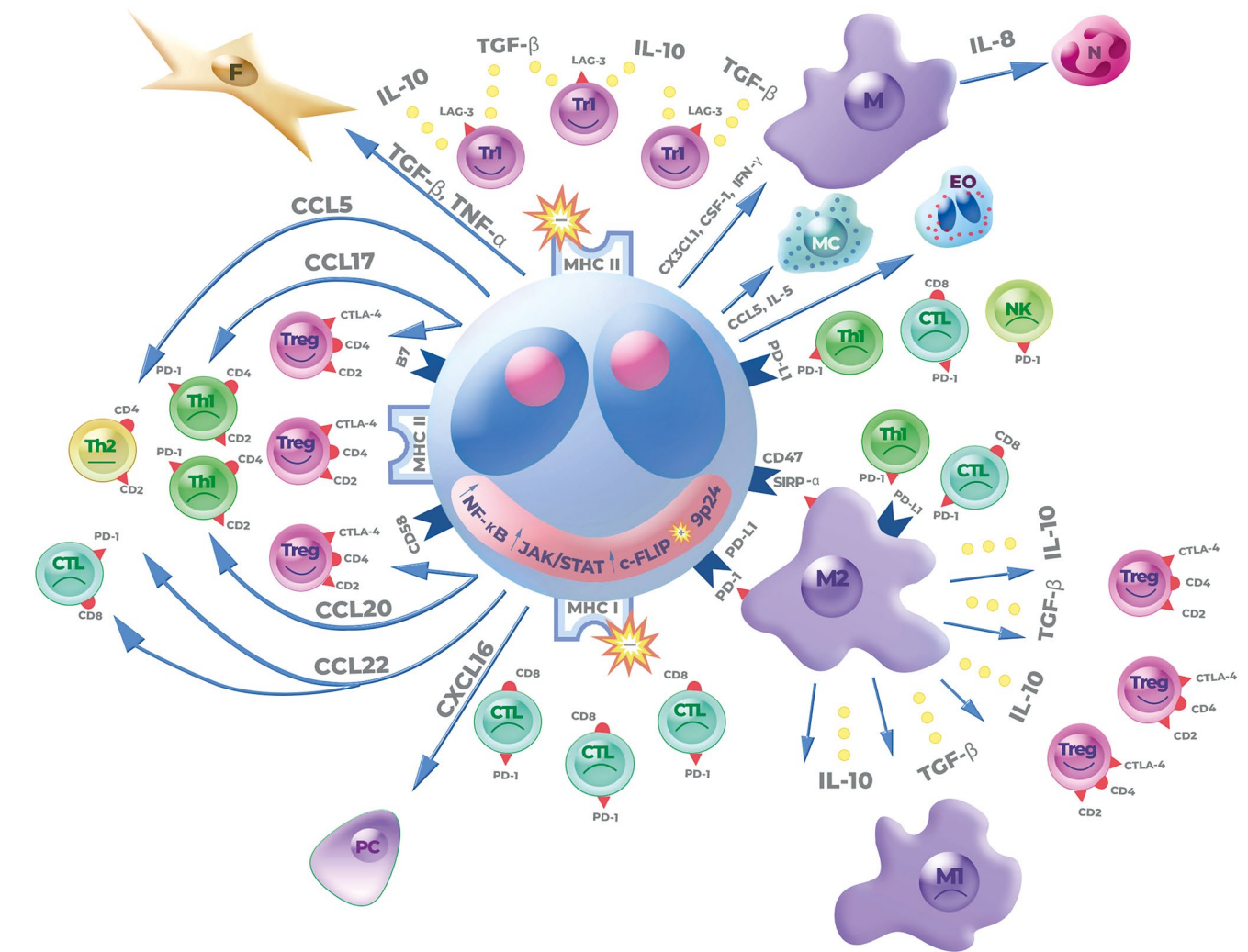
В настоящее время прогноз у пациентов с рефрактерной/рецидивирующей ЛХ (р/р ЛХ) значительно изменился за счет появления новых препаратов, в т. ч. оказывающих действие на компоненты опухолевого микроокружения. Особенности биологии ЛХ создают серьезные предпосылки для изучения терапевтических подходов, нацеленных на реактивные иммунные клетки как в качестве самостоятельного метода лечения, так и в сочетании с другими группами препаратов [143, 144].

Ингибиторы иммунных контрольных точек

Реализацию одного из ключевых механизмов уклонения от иммунного надзора, продемонстрированного при различных опухолях, обеспечивает ось PD-1/PD-L1. Наличие хромосомных aberrаций, вовлекающих локус 9p24.1 в более 98 % случаев ЛХ, обуславливает чувствительность опухоли к иммунотерапии [27, 29]. В настоящее время для лечения ЛХ в России зарегистрировано два препарата — ингибитора PD-1: ниволумаб и пембролизумаб. Высокая эффективность PD-1-ингибиторов при ЛХ связана в первую очередь с PD-L1-ассоциированной нишей в микроокружении опухоли за счет повышенной экспрессии PD-L1 на клетках X-PШ и макрофагах, PD-1 на иммунных клетках (в лимфоцитах и макрофагах), а также тесных контактов между PD-L1-позитивными и PD-1-позитивными клетками [69, 145].

Была продемонстрирована регулирующая роль PD-1 и PD-L1 в пролиферации и активации макрофагов, а также в их поляризации [146]. Экспрессия PD-L1 и PD-1 на макрофагах может приводить к анергии Т-клеток и поляризации M2, что способствует усилению иммунной дисфункции и толерантности опухоли. Таким образом, анти-PD-1-терапия подавляет иммуносупрессивную функцию PD-1 в макрофагах и влияет на их поляризацию [139, 142].

Эффективный цитотоксический ответ в солидных опухолях при анти-PD-1-терапии достигается в основном за счет эффекторных функций CD8-позитивных клеток [147]. Однако особенности иммуоархитектуры ЛХ указывают на то, что ответ на лечение может быть обусловлен не только цитотоксическими CD8-позитивными Т-клетками [148]. Эти клетки составляют меньшинство в опухолевом микроокружении, а CD4-позитивные клетки преобладают. Контакт между CD4-позитивными клетками и клетками















-  мутация, «-» приводящая к потере экспрессии продукта, «+» приводящая к повышенной экспрессии продукта
-  NF-κB, JAK/STAT — активация сигнальных путей NF-κB, JAK/STAT
-  c-FLIP — гиперэкспрессия c-FLIP, ключевого ингибитора апоптоза
-  CCL5, CCL17, CCL20, CCL22 — хемокины, участвующие в рекрутировании Т-клеток, в частности Treg, Th1, Th2
-  CXCL11, CSF-1, IFN-γ — цитокины/хемокины, участвующие в рекрутировании макрофагов (M)
-  CCL5, IL-5 — цитокины/хемокины, участвующие в рекрутировании эозинофильных гранулоцитов (EO)
-  CXCL16 — хемокин, участвующий в рекрутировании плазматических клеток (PC)
-  TGF-β, TNF-α — цитокины, участвующие в дифференцировке фибробластов (F)
-  IL-8 — цитокин, участвующий в рекрутировании нейтрофильных гранулоцитов (N)
-  IL-10, TGF-β — выраженная секреция толерогенных цитокинов иммунными клетками (в частности, Tr1, M2-макрофагами)
-  клетки с ограничением эффекторных функций, в частности клетки CD8+ (CTL), Th1, M1-макрофаги, NK-клетки
-  функционально активные клетки с иммуносупрессивными функциями, в частности Treg, Tr1, M2-макрофаги

Рис. 1. Классическая лимфома Ходжкина. Опухолевая клетка и реактивное микроокружение (пояснение в тексте)

Fig. 1. Classical Hodgkin lymphoma. A tumor cell and the reactive microenvironment (for details see text)

X-PШ значительно больше, чем у CD8-позитивных Т-клеток [69]. Степень инфильтрации опухолевой ткани CD4-позитивными Т-клетками коррелировала с интенсивностью экспрессии PD-L1 на клетках X-PШ и макрофагах и с экспрессией компонентов МНС-II на клетках X-PШ. В то же время между этими маркерами и степенью инфильтрации CD8-позитивными лимфоцитами наблюдалась обратная связь [113]. Кроме того, PD-1 чаще экспрессируется на CD4-позитивных клетках, расположенных вблизи клеток X-PШ и PD-L1-позитивных макрофагов [69]. Имеется также связь между экспрессией PD-L1 на клетках X-PШ и макрофагах и инфильтрацией опухолевой ткани Th1-поляризованными Treg с уменьшением доли цитотоксических Т-клеток [113]. Для реализации иммунного ответа, опосредованного CD8-позитивными Т-лимфоцитами, необходим МНС-I, а CD4-позитивными лимфоцитами — МНС-II [149]. В значительной части случаев мутации в гене, кодирующем $\beta 2M$, приводят к утрате экспрессии молекул МНС-I на клетках X-PШ [35]. Таким образом, эффективность иммунотерапии при ЛХ, по-видимому, связана в основном с возобновлением активности CD4-позитивных, а не CD8-позитивных Т-клеток.

Показано, что при анти-PD-1-терапии именно наличие экспрессии молекул МНС-II, а не МНС-I на клетках X-PШ было связано с более благоприятным клиническим прогнозом [36]. Кроме того, терапия ингибиторами PD-1 была наиболее эффективной в рефрактерной группе пациентов с большим разнообразием исходного репертуара TCR. При этом более ограниченный спектр TCR коррелировал с частичным ответом или прогрессированием ЛХ. После терапии ингибиторами PD-1 наблюдалось значимое расширение репертуара TCR на CD4-позитивных, но не CD8-позитивных Т-клетках, особенно у пациентов, у которых достигнут полный ответ и/или имелась экспрессия молекул МНС-II на клетках X-PШ [150, 151]. Эти данные подчеркивают важность изменения статуса CD4-позитивных Т-клеток при анти-PD-1-терапии.

Помимо рефрактерных форм описаны уникальные морфологические характеристики в раннем периоде ответа на лечение ингибиторами PD-1 в первой линии у первичных больных ЛХ. У этой категории пациентов не наблюдалось клональной экспансии Т-клеток и расширения репертуара клональных TCR. В этой связи весьма вероятно, что в качестве основного механизма действия анти-PD-1-терапии у первичных больных выступает не индукция адаптивного противоопухолевого иммунного ответа, а отмена критических факторов выживания опухолевых клеток, реализуемых, в частности, через PD-L1 [152]. В целом эти результаты могут свидетельствовать о том, что иммунный ответ при ЛХ у пациентов, ранее не получавших лечения, кардинально отличается от такового при р/р ЛХ. При рецидивах могут появляться субклоны ЛХ, которые приобрели способность реконструировать свое микроокружение и становиться менее зависимыми от него. Было продемонстрировано, что в течение нескольких дней после первого применения ингибиторов PD-1 в ткани ЛХ резко снижалось число опухолевых клеток. Кроме того, уменьшалась доля Tr1 и экспрессия PD-L1 на макрофагах, которые пространственно связаны с

клетками X-PШ, а экспансии цитотоксических клеток не наблюдалось. В крови в первые дни снижалось число NK-клеток и CD8-позитивных Т-лимфоцитов, увеличивалось количество CD4-позитивных Т-клеток, отмечалось значительное подавление экспрессии генов, характерных для Tr1 и Treg [152]. В свою очередь, в повторных биоптатах ткани при р/р ЛХ после анти-PD-1-терапии увеличивалось количество PD-1-позитивных Т-лимфоцитов и LAG-3-позитивных клеток, снижалось число макрофагов, оцениваемых в ткани ЛХ по экспрессии CD163 и CD68 [111]. Таким образом, результаты исследования парных биоптатов, полученных до терапии и при рецидивах, позволяют считать, что механизмы формирования микроокружения ЛХ после лечения анти-PD-1-препаратами существенно изменяются.

Во время иммунотерапии между клетками микроокружения формируются сложные функциональные взаимосвязи. По результатам клинических исследований, в которых оценивалась эффективность терапии PD-1-ингибиторами ниволумабом [64, 153] и пембролизумабом [154] у пациентов с ЛХ, общий ответ составил 69 %, что в дальнейшем было подтверждено данными реальной клинической практики [65, 155]. Таким образом, PD-1-ингибиторы изменили прогноз у пациентов с рефрактерными формами ЛХ. В настоящее время эта группа препаратов активно внедряется во вторую [156] и даже первую линию терапии [157], что, вероятно, позволит достигнуть длительной ремиссии с возможностью излечения на ранних этапах терапии в большем числе случаев.

Кроме того, активно исследуются другие молекулы, влияющие на пути как PD-1/PD-L1 (например, анти-PD-L1 авелумаб [158]), так и других иммунных контрольных точек (например, анти-LAG-3 фавезилумаб [159], анти-CTLA-4 ипилимумаб [160]), которые уже демонстрируют высокий потенциал эффективности у пациентов с ЛХ. Показано, что коэкспрессия молекул иммунных контрольных точек на одних и тех же клетках встречается нечасто, а наличие экспрессии определенных ингибирующих рецепторов связано с различными функциональными субпопуляциями реактивных клеток. Так, для Tr1 характерна ассоциация с LAG-3 [110], а для классических Treg — с CTLA-4 [109]. Таким образом, стратегия комбинации различных препаратов, направленных на ингибирование иммунных контрольных точек, может обеспечить воздействие на разные звенья иммуносупрессивной среды опухоли [161].

Иммунokonъюгаты

Иммунokonъюгаты представляют собой антитела, связанные со второй молекулой, обычно токсином, радиоизотопом или меткой [162]. Иммунokonъюгатом, активно применяющимся в лечении пациентов с ЛХ, является брентуксимаб ведотин (анти-CD30-антитело, связанное с монометилауристатином E), который оказывает непосредственное цитотоксическое действие на клетки X-PШ [163].

В настоящее время появился новый представитель этого класса препаратов для лечения пациентов с ЛХ — камиданлумаб тесирин (ADCT-301), состоящий из гуманизированного моноклонального антитела

против CD25 и мощного токсина — пирролобензодиазепинового димера, агента, сшивающего ДНК [164]. В ткани ЛХ CD25 (IL2RA, компонент рецептора IL-2) экспрессируется на клетках Х-РШ и активированных Т-лимфоцитах [165]. Высокая экспрессия отмечается на поверхности Treg, вызывающих выраженный иммуносупрессивный эффект [166]. Таким образом, препарат воздействует не только на опухолевую клетку, но и на опухолевое микроокружение. По результатам клинических исследований камиданлумаба тесирина у пациентов с р/р ЛХ общий ответ составил 70 %, однако отмечалась высокая частота тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений, которые связаны с подавлением иммунотолерантности [167].

Терапия, направленная на опухоль-ассоциированные макрофаги

Опухоль-ассоциированные макрофаги продуцируют различные факторы роста, цитокины и хемокины, которые способствуют росту опухоли, ее прогрессированию и ангиогенезу [168]. Ранее полученные данные о негативной прогностической роли макрофагов послужили основанием для оценки результатов их ингибирования молекулой PLX3397, селективным блокатором CSF1R (фактора роста для макрофагов). PLX3397 связывается и ингибирует фосфорилирование рецептора KIT, CSF1R и FLT3, что приводит к подавлению пролиферации опухолевых клеток, активности макрофагов и тучных клеток [169, 170]. PLX3397 способствует перепрограммированию макрофагов в M1, подавлению функций Treg и инфильтрации опухолевой ткани CD8-позитивными Т-клетками [171]. Несмотря на успешное ингибирование как CSF1R, так и KIT, результаты II фазы клинического исследования по применению этого препарата в лечении 20 пациентов с р/р ЛХ продемонстрировали его низкую эффективность с общим ответом 5 % и медианой выживаемости без прогрессирования (ВВП) 56 дней [170].

Компоненты механизма «не ешь меня» CD47/SIRP- α позволяют опухолевым клеткам уклоняться от иммунного ответа. На клетках Х-РШ часто отмечается гиперэкспрессия CD47, что связано с менее благоприятным клиническим прогнозом [136]. Ингибирование передачи сигналов CD47 усиливает фагоцитарную активность макрофагов, переключение макрофагов с M2 на M1, а в доклинических моделях приводит к нарушению роста опухоли и уменьшению опухолевой массы. Кроме того, блокада CD47 может усиливать антигенное праймирование Т-клеток и запускать опухолеспецифические Т-клеточные ответы [137]. Четыре различные молекулы антител, направленных на комплекс CD47-SIRP- α (Hu5F9-G4, CC-90002, TTI-621, ALX-148) при злокачественных новообразованиях, в настоящее время изучаются в клинических исследованиях. Hu5F9-G4, гуманизированное блокирующее антитело против CD47, изучается в 4 различных испытаниях I фазы. Эти исследования могут заложить основу для разработки лечебных биспецифических антител [133, 137].

Биспецифические антитела

Одним из наиболее активно развивающихся направлений в лечении различных вариантов злока-

чественных лимфопролиферативных заболеваний является разработка биспецифических антител, которые представляют собой искусственный белок, способный одновременно связываться с двумя разными типами антигенов или двумя разными эпитопами одного и того же антигена. Препараты этой группы уже продемонстрировали высокую эффективность при В-клеточных лимфомах. Отмечались устойчивые ремиссии у пациентов после нескольких линий противоопухолевой терапии, в частности при применении глофитамаба, нацеленного на CD20 и CD3 [172]. Такое взаимодействие активирует Т-лимфоциты и обеспечивает цитотоксический контакт с опухолевой В-клеткой. В то же время биспецифические антитела у пациентов с ЛХ могут оказаться менее эффективными, что было продемонстрировано для такой молекулы, как AFM13, нацеленной на CD30 на клетках Х-РШ и CD16A на NK-клетках. Связываясь с CD16A, AFM13 рекрутирует и активирует NK-клетки для уничтожения CD30-позитивных опухолевых клеток. При использовании препарата в монорежиме ответ был достигнут лишь у около 20 % пациентов [173]. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования, направленные на подбор эффективных пар, а также изучение эффективности комбинаций различных методов терапии. Так, было продемонстрировано, что использование комбинированной терапии, включавшей биспецифическое антитело AFM13 и NK-клетки пуповинной крови, привело к достижению ответа у 89 % пациентов с рефрактерными CD30-позитивными лимфомами в рамках исследования I-II фазы, результаты которого были представлены на конференции Американской ассоциации исследования рака (AACR) в 2022 г. [174].

В одном исследовании показана возможность повышения специфичности антитела к клеткам Х-РШ путем одновременного связывания с CD30 и CD137 (их коэкспрессия на клетках Х-РШ наблюдается в 80–90 % случаев). Это биспецифическое антитело демонстрирует прочное высокоаффинное связывание с клеткой-мишенью, высокую антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клеток с одновременной экспрессией CD30 и CD137, минимальные общие токсические эффекты. Кроме того, это антитело блокирует передачу сигналов через CD137 в клетках Х-РШ и тем самым препятствует усилению их пролиферации, а также секреции IL-13, способствующего уклонению от иммунного ответа за счет активации Th2 [175]. Похожий синергический эффект в доклинических моделях В-клеточных лимфом описан у биспецифического антитела CD20-CD47SL [176].

Многообещающей моделью при ЛХ выглядит молекула, направленная на CD47 и PD-L1, эффект которой может заключаться в усилении антителозависимого лизиса и разобщении компонентов системы «не ешь меня» [177]. Таким образом, биспецифические антитела являются перспективными кандидатами для более эффективного и безопасного лечения ЛХ.

CAR Т-клеточная терапия

CAR (химерный антигенный рецептор) Т-клеточная терапия является новой формой иммунотерапии, при которой собственные иммунные клетки

пациента конструируются *ex vivo* для распознавания опухолевых антигенов-мишеней. Эти химерные молекулы слиты с внутриклеточными костимулирующими и сигнальными доменами, которые при связывании родственного им антигена вызывают активацию Т-клеток и стимулируют их эффекторные функции. Ключевым преимуществом сконструированных Т-клеток является то, что распознавание ими опухоли не зависит от статуса МНС, отсутствие компонентов которого может быть одним из механизмов уклонения клеток Х-РШ от иммунного надзора. CAR Т-клетки показали исключительную перспективность в исследованиях В-клеточных лимфом и продемонстрировали высокие показатели ответа с потенциалом длительной ремиссии [178].

CAR Т-клеточная терапия при ЛХ использовалась нечасто. Однако в недавних исследованиях показано, что она является эффективным подходом к лечению рецидивов и/или рефрактерных форм заболевания. У пациентов с ЛХ активно изучается мишень CD30 на клетках Х-РШ. В настоящее время различные исследования, направленные на эту молекулу, демонстрируют общий ответ в интервале 28–80 %. Однако большинство исследований включало ограниченное число пациентов с ЛХ. Кроме того, включались пациенты с другими CD30-позитивными лимфомами, в частности с периферическими Т-клеточными лимфомами [179]. На доклинических этапах также оценивалась роль мишени CD123 — α -цепи рецептора IL-3, которая экспрессируется как на клетках Х-РШ, так и на миелоидных клетках, присутствующих в микроокружении опухоли [180]. Таким образом, еще предстоит изучить оптимальность предлагаемых мишеней и дать общую оценку роли CAR Т-клеточной терапии у пациентов с ЛХ.

Иммунотерапевтическая терапия

Иммунотерапевтическая терапия включает в себя препараты, структурно и функционально родственные талидомиду. Их биологические эффекты включают ингибирование ангиогенеза за счет уменьшения продукции эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) стромальными клетками, ингибирование провоспалительных цитокинов (например, IL-6 и TNF- α), стимуляцию клеточного иммунитета и способность непосредственно вызывать остановку роста и апоптоз опухолевых клеток. Одним из наиболее активно используемых представителей этого класса является леналидомид, который широко применяется при множественной миеломе, а также одобрен для лечения миелодиспластического синдрома, сопровождающегося утратой 5q [181]. Леналидомид продемонстрировал свою активность в отношении различных вариантов В-клеточных лимфом, например диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы [182], а также ЛХ [183]. Препарат оказывает прямое влияние на врожденную и адаптивную иммунную систему, действует как мощный костимулятор для активации Т-клеток за счет увеличения продукции Т-клеточных цитокинов и активации CD8-позитивных цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток. Леналидомид также усиливает антителозависимую цитотоксичность и активность мононуклеарных клеток,

что приводит к апоптозу опухолевых клеток. В многоцентровом исследовании II фазы у пациентов с р/р ЛХ, ранее получавших различные варианты терапии (87 % после аутоТГСК), общий ответ составил 19 %. При этом у 1 пациента достигнут полный ответ, у 6 — частичный [183]. В других небольших исследованиях подтверждены активность и благоприятный профиль токсичности леналидомида в качестве монотерапии при рецидивах ЛХ, что делает его привлекательным для использования в сочетании с цитостатическими агентами [184].

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Т-лимфоциты

Т-лимфоциты являются доминирующей клеточной популяцией в структуре микроокружения ЛХ. Оценке их прогностического значения посвящено большое количество исследований (табл. 1). Интерпретация результатов этих исследований затруднена из-за гетерогенности и изменчивости субпопуляций Т-лимфоцитов. К настоящему времени накоплены данные в отношении нескольких субпопуляций Т-клеток: CD8-позитивных, CD4-позитивных, Th1 и Treg. В большинстве работ идентификация клеток осуществляется с помощью иммуногистохимического исследования.

Данные о прогностическом значении CD8-позитивных Т-лимфоцитов в отношении эффективности противоопухолевой терапии ЛХ противоречивы. В ряде исследований высокая доля активированных (GrB+/TIA-1+) Т-клеток была связана с низкими показателями ОБ и/или ВБП, в то время как в других работах такая связь не обнаружена [150, 185–194]. В отношении содержания CD4-позитивных Т-лимфоцитов имеются сведения об ассоциации с лучшей выживаемостью, однако в ряде работ подобная связь не подтверждена [150, 185, 186, 192].

Среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов больше сведений о прогностическом значении Treg. Пациенты с ЛХ, у которых в биоптатах было высокое содержание Treg, имели менее агрессивное течение заболевания [191, 192, 194–197]. При этом в ряде работ доля Treg не оказывала влияния на результаты терапии [150, 186, 189]. Имеются данные о положительном значении Th1 и Th2 в отношении прогноза при ЛХ [112, 190]. Информации о прогностическом значении опухоль-ассоциированных Th17, Tfh и минорных субпопуляций Т-лимфоцитов пока немного.

Влияние экспрессии молекул иммунных контрольных точек на Т-лимфоцитах интенсивно изучается. Однако накопленных знаний недостаточно для использования их в качестве прогностических маркеров. Значительная часть работ посвящена экспрессии PD-1 на Т-клетках. Хотя пороговые значения, определяющие высокий уровень PD-1, в разных исследованиях различались, их результаты сходятся в отрицательной оценке влияния этого фактора на прогноз [112, 192, 198]. В нескольких работах число PD-1-позитивных Т-лимфоцитов не оказывало воздействия на показатели ОБ и ВБП [193, 196]. Исследований, в ко-

Таблица 1. Прогностическое значение реактивных клеточных популяций при классической ЛХ

Морфологический параметр			Корреляция с прогнозом	Исследование
Т-лимфоциты	Т-лимфоциты CD8+	CD8+	НЗ (ОВ) о/а. Неблагоприятный (ВСНЛ) о/а. НЗ (ВСНЛ) м/а	S. Alonso-Alvarez et al., 2017 [185]
			НЗ (ОВ, БСВ) о/а	B. Chetaille et al., 2009 [194], J. Nagasaki et al., 2020 [150], I. Zawati et al., 2022 [186]
			GrB+	Неблагоприятный (ОВ, ВБП) о/а. НЗ (ОВ) м/а НЗ (ОВ, БСВ) о/а
	Т-лимфоциты CD4+	TIA-1+	Неблагоприятный (ОВ) о/а. НЗ (ОВ) м/а	S. Muenst et al., 2009 [192]
			Неблагоприятный (ОВ, БСВ) о/а	T. Alvaro et al., 2005 [188]
			Неблагоприятный (ОВ), НЗ (БСВ) о/а. НЗ (ОВ, БСВ) м/а Неблагоприятный (ОВ) о/а. НЗ (ОВ) м/а	B. Chetaille et al., 2009 [194] S. Muenst et al., 2009 [192], T.T. Nguyen et al., 2016 [193]
	Т-лимфоциты CD4+	FOXP3+ Treg	НЗ (ОВ, ВБП) о/а	C. Agostinelli et al., 2016 [191]
			НЗ (ОВ, ВБП) о/а	C. Agostinelli et al., 2016 [191]
			НЗ (ОВ) о/а. Неблагоприятный (ВСНЛ) о/а. НЗ (ВСНЛ) м/а Благоприятный (ОВ) о/а и м/а. НЗ (ВБП) н/з НЗ (ОВ, БСВ) о/а	S. Alonso-Alvarez et al., 2017 [185] J. Nagasaki et al., 2020 [150] I. Zawati et al., 2022 [186]
	Т-лимфоциты PD-1+	TBET Th1 с-maf Th2	Благоприятный (ВСБ) о/а. НЗ (ВСБ) м/а	P. Greaves et al., 2013 [195]
			НЗ (ОВ) о/а. Благоприятный (БСВ) о/а	S. Schreck et al., 2009 [190]
			Неблагоприятный (ВСБ) о/а и м/а Неблагоприятный (ОВ) о/а. НЗ (ОВ) м/а Неблагоприятный (ОВ, ВИ) о/а НЗ (ОВ, ВБП) о/а	P. Greaves et al., 2013 [195] S. Muenst et al., 2009 [192] D.F.R. Lacet, C.C. Oliveira, 2022 [198] C. Wang et al., 2018 [196], T.T. Nguyen et al., 2016 [193]
	Т-лимфоциты LAG-3+		Неблагоприятный (ВСНЛ) о/а НЗ (ОВ, БСВ) о/а	T. Aoki et al., 2020 [110] S. Moerdler et al., 2021 [199]
	Т-лимфоциты TIGIT+		НЗ (ОО) о/а	O. Annibali et al., 2021 [200]
	Макрофаги	Макрофаги CD68+	Неблагоприятный (ВСБ, ВБП) о/а и м/а. Неблагоприятный (ВСБ) и НЗ (ВБП) м/а	C. Steidl et al., 2010 [206]
Неблагоприятный (ОВ, БСВ) о/а. Неблагоприятный (ОВ) и НЗ (БСВ) м/а			P. Kamper et al., 2011 [237]	
Неблагоприятный (ОВ, ВСНЛ) о/а и м/а НЗ (ВСБ, ВБП) о/а			K.L. Tan et al., 2012 [238] D. Azambuja et al., 2012 [239]	
Макрофаги CD163+		Неблагоприятный (ОВ, ВБП) метаанализ Благоприятный* (ВБП) о/а. Анти-PD-1-терапия*	B. Guo et al., 2016 [202] A. Gusak et al., 2021 [111]	
		Неблагоприятный (ОВ, БСВ) о/а. НЗ (ОВ, БСВ) м/а Неблагоприятный (ОВ, ВСНЛ) о/а и м/а НЗ (ВСБ, ВБП) о/а	P. Kamper et al., 2011 [237] K.L. Tan et al., 2012 [238] D. Azambuja et al., 2012 [239]	
		Неблагоприятный (ОВ, ВБП) метаанализ Благоприятный* (ВБП) о/а. Анти-PD-1-терапия*	B. Guo et al., 2016 [202] A. Gusak et al., 2021 [111]	
M1	CD163+ pSTAT1+	Благоприятный (ОВ) о/а	M.H.M. Barros et al., 2015 [131]	
		CD68+ pSTAT1+	НЗ (ВБП) о/а	M.H.M. Barros et al., 2015 [131]
		CD68+ с-тус–	Благоприятный (ОВ) о/а	L. Werner et al., 2020 [240]
		CD163+ с-тус–	Благоприятный (ОВ) о/а	L. Werner et al., 2020 [240]

Окончание таблицы 1 на следующей странице

Таблица 1. Окончание

Макрофаги	M2	CD163+ c-maf+	Неблагоприятный (ВБП) о/а	M.H.M. Barros et al., 2015 [131]
		CD68+ c-maf+	НЗ (ВБП) о/а	M.H.M. Barros et al., 2015 [131]
		CD163+ c-мус+	Благоприятный (ОВ) о/а для промежуточного уровня клеток	L. Werner et al., 2020 [240]
		CD68+ c-мус+	НЗ (ОВ) о/а	L. Werner et al., 2020 [240]
		CD163+ c-maf+	Неблагоприятный* (ОО) о/а. Анти-PD-1-терапия*	A. Gusak et al., 2021 [111]
	CD68+ PD-L1+		Неблагоприятный (ОВ, ВСНЛ) о/а. НЗ (ОВ), неблагоприятный (ВСНЛ) м/а	K. Karihtala et al., 2020 [127]
		CD68+ IDO-1+	Неблагоприятный (ВСНЛ) о/а и м/а. НЗ (ОВ) о/а	K. Karihtala et al., 2020 [127]
В-лимфоциты	В-лимфоциты CD20+		Благоприятный (ОВ, БСВ) о/а. Благоприятный (ОВ) м/а	B. Chetaille et al., 2009 [194]
			Благоприятный (ОВ, БСВ) о/а. НЗ (ОВ, БСВ) м/а	C. Steidl et al., 2010 [206]
			Благоприятный (ОВ) о/а. НЗ (ВСНЛ) о/а. НЗ (ОВ, ВСНЛ) м/а	P. Greaves et al., 2013 [195]
			Благоприятный (БСВ) о/а	C.S. Tudor et al., 2013 [207]
			Благоприятный (ВИ) о/а. НЗ (ОВ) о/а	D.F.R. Lacet, C.C. Oliveira, 2022 [198]
Плазматические клетки	Плазмоциты CD138+		НЗ (БСВ, БСВ) о/а	C.S. Tudor et al., 2013 [207]
			Неблагоприятный (ОВ, БСВ) о/а. НЗ (ОВ, БСВ) м/а	A.R. Gholiha et al., 2022 [136]
			НЗ (ОВ) о/а. Неблагоприятный (СБВ) о/а	D.F.R. Lacet, C.C. Oliveira, 2022 [198]
Тучные клетки	Триптаза-1-позитивные тучные клетки		НЗ (ОВ) о/а. Неблагоприятный (БСВ) о/а	D. Molin et al., 2002 [214]
			НЗ (ОВ, БСВ) о/а	K. Keresztes et al., 2007 [215]
			НЗ (ОВ, БСВ) о/а	B. Chetaille et al., 2009 [194]
			Неблагоприятный (ОВ, БСВ) о/а при ЛХ-СК	M.D. Andersen et al., 2016 [216]
Эозинофилы		Неблагоприятный (ОВ, ВСНЛ) о/а и м/а	R. von Wasielewski et al., 2000 [221]	
		НЗ (ОВ, БСВ) о/а	K. Keresztes et al., 2007 [215]	
Циркулирующие НК-клетки		Благоприятный* (ОО) о/а. Анти-PD-1-терапия*	F.Z. Cader et al., 2020 [151]	
Дендритные клетки	Плазмоцитоподобные CD123+	НЗ (БСВ) о/а	C.S. Tudor et al., 2014 [229]	
	Плазмоцитоподобные BCL11A+	Благоприятный (ОВ, БСВ) о/а и м/а	B. Chetaille et al., 2009 [194]	
	Миелоидные CD83+	Благоприятный (БСВ) о/а	C.S. Tudor et al., 2014 [229]	
	Фолликулярные CD21+	Благоприятный (ОВ), НЗ (БСВ) о/а	C.S. Tudor et al., 2013 [207]	
MDSC	MDSC CD34+	Неблагоприятный (ВБП) о/а и м/а	A. Romano et al., 2015 [231]	
Стромальные элементы	Сосуды		Неблагоприятный (ОВ) о/а и м/а. НЗ (ВСНЛ) о/а	P. Korkolopoulou et al., 2005 [234]
			Неблагоприятный (ВБП) о/а	I. Glimelius et al., 2005 [209]
			НЗ (ОВ, ВБП)	L. Panico et al., 2013 [241]
		НЗ (ВБП), неблагоприятный (РР) о/а	D.F.R. Lacet, C.C. Oliveira, 2022 [198]	
	Фибробласты	FAP+ PDGFR-α+ FAP+	Неблагоприятный (ВСНЛ) о/а Благоприятный (ВСНЛ), НЗ (ОВ) о/а	K. Karihtala et al., 2022 [235] K. Karihtala et al., 2022 [235]
Иммунные контрольные точки	PD-1 на клетках микроокружения	НЗ (ОВ, БСВ) о/а	B. Chetaille et al., 2009 [194]	
	PD-1, PD-L1, IDO-1, TIM-3, LAG-3 на клетках микроокружения	Неблагоприятный (ОВ) о/а и м/а (группа с гиперэкспрессией ≥ 1 молекулы)	K. Karihtala et al., 2022 [201]	
	TIGIT, TIM-3, LAG-3, PD-1, CTLA-4 на клетках микроокружения	НЗ* (ОО) о/а (раздельный анализ молекул). Анти-PD-1-терапия*	A. Gusak et al., 2021 [111]	

БСВ — бессобытийная выживаемость; ВБП — выживаемость без прогрессирования; ВИ — время до излечения; ВСБ — выживаемость, специфичная для болезни; ВСНЛ — выживаемость, свободная от неудач лечения; ЛХ-СК — смешанно-клеточный вариант лимфомы Ходжкина; м/а — многофакторный анализ; НЗ — неопределенного значения; о/а — однофакторный анализ; ОВ — общая выживаемость; РР — риск рецидива; СБВ — свободная от болезни выживаемость; ОО — общий ответ.

* Иммунотерапия ниволумабом.

торых изучается влияние других молекул иммунных контрольных точек (LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT) на выживаемость пациентов с ЛХ, пока немного. Т. Аоки и соавт. идентифицировали LAG-3-позитивные Т-клетки как негативный предиктор выживаемости, свободной от неудач лечения [110]. В то же время у детей с ЛХ экспрессия LAG-3 не была связана с показателями выживаемости [199]. Статус TIGIT на Т-лимфоцитах не коррелировал с ответом на лечение [200]. К. Karihtala и соавт. объединили информацию об экспрессии на

Т-лимфоцитах микроокружения и макрофагах ряда ингибиторных молекул: PD-1, IDO-1, PD-L1, TIM-3 и LAG-3. Пациенты с высоким уровнем хотя бы одной из них отличались худшей ОВ после химио- и/или лучевой терапии [201]. В исследовании нашей группы уровень экспрессии молекул иммунных контрольных точек на клетках микроокружения (TIGIT, TIM-3, LAG-3, PD-1, CTLA-4), проанализированный по отдельности, не был связан с ответом на терапию ниволумабом [111].

Макрофаги

Опухоль-ассоциированные макрофаги (ТАМ) — важная составная часть клеточного микроокружения ЛХ. В большинстве работ, посвященных изучению влияния макрофагов на клинические исходы, применялись иммуногистохимические методы окрашивания (реакции с антителами к CD68 и CD163) [202], в некоторых исследованиях — анализ профиля экспрессии генов [68].

Ряд авторов считают, что CD163 (scavenger — рецептор-мусорщик), экспрессируемый почти исключительно на циркулирующих моноцитах и тканевых макрофагах, — более надежный маркер ТАМ по сравнению с CD68 [203], но он не является специфичным для М2 [204]. Во многих исследованиях показано, что большое количество ТАМ коррелирует с неблагоприятным клиническим прогнозом у пациентов с ЛХ, получавших противоопухолевое лечение [202]. В то же время высокая инфильтрация ТАМ образцов лимфоидной ткани у пациентов с р/р ЛХ, получавших анти-PD-1-терапию, связана с лучшей выживаемостью [111]. Для того чтобы дифференцировать макрофаги по статусу поляризации в общей популяции рекомендуют применять комбинированное определение поверхностных маркеров CD68, CD163 и транскрипционных факторов (например, STAT1 для М1 или c-maf для М2) [204]. Результаты целого ряда исследований усиливают мнение о критической роли М2-макрофагов в торможении противоопухолевого ответа. Так, было показано, что низкий уровень М2 был связан с лучшим прогнозом у пациентов, получавших как химио-, так и иммунотерапию [111, 205].

В-лимфоциты

Реактивные В-клетки (вне резидуальных фолликулов), как правило, присутствуют в микроокружении опухоли. Вероятно, они остались или мигрировали в опухолевую нишу из остатков предсуществующих фолликулярных структур. Однако их роль в микроокружении ЛХ до конца не определена. С одной стороны, IL-10, секретируемый В-клетками, может подавлять противоопухолевый Т-клеточный ответ, с другой — В-клетки могут конкурировать с клетками Х-РШ за сигналы выживания, получаемые от взаимодействия, в частности, с CD40L на Т-клетках. Таким образом, подавляется рост клеток Х-РШ [103]. В ряде работ имеются сведения о том, что инфильтрация В-клетками ткани ЛХ положительно коррелирует с клиническим прогнозом [112, 194, 198, 206, 207].

Тучные клетки

Внутри опухолевого микроокружения тучные клетки (ТК) активно кооперируют с другими реактивными клетками, опухолевыми клетками и внеклеточным матриксом посредством прямых межклеточных взаимодействий и высвобождения широкого спектра цитокинов и хемокинов. Пролиферация ТК индуцируется IL-3, IL-13 и фактором стволовых клеток (SCF). ТК могут способствовать ангиогенезу (за счет IL-8, VEGF, TGF- β , TNF- α , MMP9) и фиброзу (за счет TGF- β и IL-13), росту и прогрессированию опухоли (за счет IL-10, TGF- β , TNF- α). Кроме того, ТК модулируют микроокружение ЛХ путем привлечения

нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов, В- и Т-клеток, фибробластов, способствуют дифференцировке Т-клеток в FOXP3-позитивные CD25-позитивные Treg [208–212]. ТК могут усиливать пролиферацию и активацию опухолевых клеток за счет передачи сигналов через ось CD30-CD30L, поскольку активно экспрессируют CD30L на своей поверхности [213]. ТК можно визуализировать в образцах ткани ЛХ с помощью окрашивания толуидиновым синим или азуром и эозином благодаря эффекту метакромазии, а также иммуногистохимическим методом с помощью антител к триптазе ТК и CD117. Количество ТК при ЛХ коррелирует в ряде работ с неблагоприятным прогнозом. При этом содержание ТК значительно выше при НС, чем при других гистологических подтипах ЛХ [214–216].

Эозинофильные гранулоциты

Градации НС по критериям BNLI постепенно утратили свою прогностическую значимость, хотя и сохраняется в диагностических заключениях [217]. В начале 2000-х годов было проведено крупное клиническое исследование у пациентов с ЛХ-НС, после которого германской группой по изучению ЛХ критерии субклассификации НС были несколько переработаны. В список критериев были включены эозинофилия, атипия клеток Х-РШ и лимфоидное истощение ткани [218]. Эозинофильные гранулоциты часто встречаются при ЛХ, особенно при вариантах НС и СК. Они способны передавать активирующие, пролиферативные и антиапоптотические сигналы через взаимодействие лигандов, в частности CD30L и CD40L, с соответствующими рецепторами семейства TNF на клетках Х-РШ [219]. Оценка прогностического значения тканевой эозинофилии остается спорной из-за малого числа исследований. Обычно инфильтрацию ткани эозинофилами связывают с неблагоприятным прогнозом [220, 221].

НК-клетки

НК-клетки — важный элемент врожденного противоопухолевого иммунитета, который играет ключевую роль в распознавании и уничтожении опухолевых клеток. Однако опухолевые клетки способны развивать механизмы ускользания от НК-опосредованного иммунного ответа [222].

НК-клетки у пациентов с ЛХ функционально неактивные, или их активность резко ограничена. Они имеют дефекты в механизмах апоптоза, уничтожении клеток-мишеней и «спящий» фенотип, однако такое состояние является обратимым. Активирующие рецепторы НК-клеток (например, NKG2D и NKp30) могут быть подавлены растворимыми лигандами, секретируемыми клетками Х-РШ: MICA, MIF и BAG6. Эффекторные функции НК-клеток жестко контролируются балансом между ингибирующими и активирующими сигналами. Так, клетки Х-РШ экспрессируют ингибирующие лиганды (HLA-E, HLA-G, PD-L1), в то время как НК-клетки могут экспрессировать ингибирующие молекулы иммунных контрольных точек. В НК-клетках нарушены процессы взаимодействия с клетками Х-РШ и их элиминации, в частности, за счет барьеров в виде плотных CD4-позитивных Т-клеточных розеток.

Кроме того, пролиферация и активация NK-клеток ингибируются иммунными клетками с иммуносупрессивными функциями за счет секреции ими большого количества TGF- β , IL-10 [102, 120, 144, 223–225].

Работы по изучению влияния NK-клеток на клиническое течение ЛХ единичные. Некоторые авторы отмечают, что при ЛХ большое количество и активация NK-клеток имеют благоприятное прогностическое значение [151]. Меньшее количество некоторых популяций NK-клеток у пациентов с ЛХ было связано с распространенными клиническими стадиями заболевания [226].

Дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК) — фенотипически и функционально гетерогенная популяция. К субпопуляциям ДК относятся миелоидные ДК (CD11+), плазмоцитоидные ДК (CD123+), фолликулярные ДК (CD21+, CD23+), клетки Лангерганса (CD1 α +). ДК, как правило, выполняют функции антигенпрезентирующих клеток, способных инициировать иммунный ответ [227]. Сообщается о способности ДК ингибировать пролиферацию некоторых клеточных линий ЛХ [101]. У пациентов с ЛХ отмечается низкий уровень ДК в крови до лечения и увеличение их доли во время лечения [228]. Кроме того, наблюдается корреляция между высоким уровнем ДК в ткани ЛХ и благоприятным прогнозом [194, 207, 229]. Однако роль ДК в микроокружении ЛХ до конца не определена.

Миелоидные клетки

К миелоидным клеткам относятся нейтрофильные гранулоциты, популяции моноцитов, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). MDSC — это нейтрофильные гранулоциты и моноциты, аномально активированные вследствие длительной стимуляции миелоидными факторами роста и воспалительными сигналами. Они обладают мощной иммуносупрессивной активностью и участвуют в регуляции иммунных реакций, в частности, при опухоли. Популяция MDSC гетерогенная; выделяют две основные группы: гранулоцитарные/полиморфноядерные MDSC (PMN-MDSC) и моноцитарные MDSC (M-MDSC), а также одну малочисленную группу миелоидных клеток-предшественников с признаками MDSC (ранние MDSC).

Большинство фенотипических черт MDSC совпадает с нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами. Достоверно их можно различить по различным профилям экспрессии генов. Морфологические отличительные черты изучены недостаточно. Основным признаком, определяющим MDSC, является их способность ингибировать иммунные ответы, в т. ч. опосредованные T-, B- и NK-клетками. G-MDSC реализуют эту функцию за счет активных форм кислорода, аргиназы 1, PGE₂, в то время как M-MDSC — благодаря NO, IL-10, TGF- β и экспрессии ряда блокирующих молекул, в частности PD-L1. В некоторых исследованиях для описания поляризованного статуса нейтрофильных гранулоцитов используется терминология, сходная с описанием статуса макрофагов: «классические N1» и «альтернативные N2». Последние имеют типичные черты PMN-MDSC. Понятие PMN-MDSC также вклю-

чает в себя G-MDSC и нейтрофилы низкой плотности [143, 144, 230].

Несмотря на потенциально значимые функции в опухолевом микроокружении, исследования, направленные на изучение прогностического значения нейтрофильных гранулоцитов, субпопуляций MDSC в ткани ЛХ, ограничены. Вероятно, это связано со сложностью идентификации этих клеток и отсутствием унифицированной терминологии.

Исследования MDSC в прогностическом аспекте единичные. Сообщается, что высокий уровень MDSC коррелирует с неблагоприятным прогнозом [231, 232].

Стромальные элементы

Способность индуцировать ангиогенез — одна из ключевых черт опухолевых клеток [233]. Степень развития сосудов в ткани опухоли может служить предиктором неблагоприятного прогноза выживаемости у пациентов с ЛХ. В частности, диаметр сосудов, плотность васкуляризации, а также общая площадь сосудов были связаны с худшими общей и бессобытийной выживаемостью пациентов с ЛХ [198, 209, 234].

Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) представляют собой еще один важный компонент стромального микроокружения ЛХ. В качестве маркеров ОАФ в ряде работ использовались такие молекулы, как PDGFR- α , PDGFR- β , FAP и α -SMA. Было показано, что высокая доля FAP-позитивных ОАФ связана со снижением показателей ВБП, в то время как PDGFR- α /FAP-позитивные ОАФ — с улучшением выживаемости, свободной от неудач лечения [235]. Кроме того, в эксперименте продемонстрировано, что ОАФ подавляют гибель клеток X-PШ при применении брентуксимаба ведотина [236].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы произошло изменение восприятия компонентов опухолевого микроокружения при ЛХ. Ранее их рассматривали лишь как свидетелей неэффективного иммунного ответа, а в настоящее время — как непосредственных и динамичных участников процесса становления и прогрессирования опухоли. Учитывая, что клетки X-PШ немногочисленные, а их варианты не имеют выраженного прогностического значения [93], все больший объем научных данных свидетельствует о том, что ответ на различные варианты лечения при ЛХ определяется именно особенностями микроокружения. В это понятие входит широкий спектр известных типов клеток и биологических молекул, а также их функциональные взаимосвязи, которые трудно или невозможно описать с исчерпывающей полнотой. Исследования клеточного состава микроокружения при ЛХ выявляют преобладание так называемых супрессивных популяций клеток (Treg, M2-макрофагов и MDSC) и дисфункциональных клеток-эффекторов (CD8-позитивных T-клеток, Th1 и NK-клеток). Накопление данных о структуре микроокружения позволило идентифицировать ряд биологических мишеней, перспективных в

отношении разработки новых методов таргетной иммунотерапии. Среди них ингибиторы альтернативных путей иммунных контрольных точек LAG-3, TIGIT и TIM-3, моноклональные антитела и ингибиторы CD47, направленные на изменение функции TAM [242].

При анализе прогностического значения компонентов микроокружения обращают на себя внимание противоречивые результаты и плохая воспроизводимость исследований биомаркеров, из которых в настоящее время ни один не внедрен в рутинную клиническую практику. Причинами могут служить несовершенство используемых методик анализа структуры с преобладанием субъективного характера оценки, отсутствие адекватных функциональных моделей микроокружения, позволяющих охарактеризовать его динамику с учетом различных факторов, в т. ч. вида проводимого лечения.

По мере накопления данных о комплексных взаимодействиях структур микроокружения ЛХ становится очевидна недостаточность простой количественной оценки отдельных клеток и других его компонентов. Увеличивается доступность методов, обеспечивающих большую информативность. Двойная иммуногистохимическая окраска [243] уже относительно доступна в реальной клинической практике. Более технологичные мультиплексные иммунофлуоресцентные панели позволяют визуализировать около десятка типов иммунных клеток [244], а масс-спектрометрия [245] — оценить экспрессию нескольких десятков маркеров в одном образце и значительно расширить представление о структуре любой тканевой системы. Методом 2021 г. по версии журнала «Nature» была признана пространственная оценка профиля экспрессии генов в отдельных клетках в составе гистологических срезов [246]. В настоящее время можно только предполагать, какие открытия ждут исследователей при применении подобных технологий в отношении микроокружения ЛХ.

Важнейшим фактором, затрудняющим создание универсальной прогностической модели, является тип терапии. Большинство элементов опухолевого микроокружения, имеющих корреляцию с клиническим ответом и прогнозом, идентифицировано в когортах пациентов, получавших классическую химиотерапию, и может быть не связано с ответом на ингибиторы иммунных контрольных точек. Яркой иллюстрацией является число макрофагов в составе опухолевого микроокружения, насыщенность которыми может служить неблагоприятным прогностическим фактором при проведении противоопухолевого лечения у пациентов с впервые диагностированной ЛХ, но связано с благоприятным прогнозом при терапии ингибиторами иммунных контрольных точек [111]. Таким образом, при анализе прогностического значения структурных элементов микроокружения чрезвычайно важно учитывать вид проводимой противоопухолевой лекарственной терапии.

Топография клеточных популяций в опухоли может иметь ключевое значение для понимания механизмов патогенеза. Так, толерогенные субпопуляции клеток окружают опухолевые клетки [185], в то время как эффекторные субпопуляции, включая

CD8-позитивные Т-клетки, Th17, NK-клетки и PD-L1-негативные CD86^{low} TAM, которые должны обладать остаточной противоопухолевой цитолитической активностью, занимают участки на расстоянии от клеток X-PШ [102]. Есть основания предполагать наличие и менее очевидных функциональных взаимосвязей в составе опухоли, которые могут найти отражение в архитектуре опухолевой ткани. Для их выявления и систематизации необходимо развитие и внедрение более сложных методов алгоритмического анализа изображений, включая компьютерное зрение [247]. Важными преимуществами подобных методов считаются низкие материальные затраты на их применение, возможность автоматизации учета, формирования и биоинформатического анализа «больших данных» [248].

В настоящее время информация о различиях в гистологической структуре опухоли на разных этапах течения ЛХ крайне скудна. Таким образом, анализ динамики состава опухолевого микроокружения представляется перспективным направлением исследований. С учетом активности опухолевого микроокружения при ЛХ и объективных ограничений анализа, проводимого на фиксированном и залитом в парафин биоматериале, важный вклад в понимание динамики функционального состояния микроокружения могло бы внести создание более адекватных *in vitro* и *in vivo* моделей заболевания [249].

Таким образом, значимые предиктивные маркеры исхода лечения при ЛХ ожидают разработки и проверки с помощью новых методов, позволяющих проведение комплексной оценки состава и функции микроокружения. Исследования, направленные на развитие такой методологии, необходимы для создания прогностических моделей, позволяющих индивидуализировать стратегию терапии на основе биологических характеристик опухоли, выявления мишеней для новых препаратов, оптимизации параметров безопасности лечения и улучшения качества жизни пациентов с классической ЛХ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена в рамках проекта «Исследование структуры иммунного микроокружения при злокачественных лимфомах с целью выявления новых терапевтических мишеней и прогностических факторов эффективности иммунотерапии» за счет средств гранта РФ № 22-75-00117.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования: А.А. Гусак, К.В. Лепик, Л.В. Федорова.

Сбор и обработка данных: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: А.А. Гусак.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):517–34. doi: 10.1038/nrc3774.
- Gallagher JA, Brown JS, Anderson ARA. The impact of proliferation-migration trade-offs on phenotypic evolution in cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):2425. doi: 10.1038/s41598-019-39636-x.
- Kuppers R, Engert A, Hansmann ML. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3439–47. doi: 10.1172/JCI61245.
- Hertel CB, Zhou XG, Hamilton-Dutoit SJ, Junker S. Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene*. 2002;21(32):4908–20. doi: 10.1038/sj.onc.1205629.
- Kuppers R, Rajewsky K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:471–93. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.471.
- Schwering I, Brauning A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101(4):1505–12. doi: 10.1182/blood-2002-03-0839.
- Weniger MA, Kuppers R. NF- κ B deregulation in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2016;39:32–9. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.05.001.
- Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131(22):2454–65. doi: 10.1182/blood-2017-11-814913.
- Garces de Los Fayos Alonso I, Liang HC, Turner SD, et al. The Role of Activator Protein-1 (AP-1) Family Members in CD30-Positive Lymphomas. *Cancers (Basel)*. 2018;10(4):93. doi: 10.3390/cancers10040093.
- Jundt F, Anagnostopoulos I, Forster R, et al. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2002;99(9):3398–403. doi: 10.1182/blood.v99.9.3398.
- Zheng B, Fiumara P, Li YV, et al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*. 2003;102(3):1019–27. doi: 10.1182/blood-2002-11-3507.
- Aravinth SP, Rajendran S, Li Y, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 induces ectopic CD137 expression on Hodgkin and Reed-Sternberg cells via the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(11):2697–704. doi: 10.1080/10428194.2019.1607330.
- Tiacci E, Doring C, Brune V, et al. Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;120(23):4609–20. doi: 10.1182/blood-2012-05-428896.
- Gruss HJ, Hirschstein D, Wright B, et al. Expression and function of CD40 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells and the possible relevance for Hodgkin's disease. *Blood*. 1994;84(7):2305–14.
- Gruss HJ, Duyster J, Herrmann F. Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 1996;7(Suppl 4):19–26. doi: 10.1093/annonc/7.suppl_4.s19.
- Yurchenko M, Sidorenko SP. Hodgkin's lymphoma: the role of cell surface receptors in regulation of tumor cell fate. *Exp Oncol*. 2010;32(4):214–23.
- Chiu A, Xu W, He B, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 2007;109(2):729–39. doi: 10.1182/blood-2006-04-015958.
- Brune MM, Juskevicius D, Haslbauer J, et al. Genomic Landscape of Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):682. doi: 10.3390/cancers13040682.
- Steidl C, Telenius A, Shah SP, et al. Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood*. 2010;116(3):418–27. doi: 10.1182/blood-2009-12-257345.
- Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, et al. expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1521–8. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62578-3.
- Zhao X, Qiu W, Kung J, et al. Bortezomib induces caspase-dependent apoptosis in Hodgkin lymphoma cell lines and is associated with reduced c-FLIP expression: a gene expression profiling study with implications for potential combination therapies. *Leuk Res*. 2008;32(2):275–85. doi: 10.1016/j.leukres.2007.05.024.
- Maggio EM, Van Den Berg A, de Jong D, et al. Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*. 2003;162(1):29–35. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63795-9.
- Metkar SS, Naresh KN, Redkar AA, et al. Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. 1999;33(5–6):521–30. doi: 10.3109/10428199909058456.
- Verbeke CS, Wenhe U, Grobholz R, Zentgraf H. Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(3):388–94. doi: 10.1097/0000478-200103000-00014.
- Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, et al. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med*. 2004;199(8):1041–52. doi: 10.1084/jem.20031080.
- Weniger MA, Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2021;35(4):968–81. doi: 10.1038/s41375-021-01204-6.
- Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2690–7. doi: 10.1200/JCO.2016.66.4482.
- Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1248:33–59. doi: 10.1007/978-981-15-3266-5_3.
- Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116(17):3268–77. doi: 10.1182/blood-2010-05-282780.
- Green MR, Rodig S, Juszczynski P, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1611–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1942.
- Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011;471(7338):377–81. doi: 10.1038/nature09754.
- Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2015;125(7):1061–72. doi: 10.1182/blood-2014-11-610436.
- Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2021;12:636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568.
- Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Lapointe R. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2012;1(6):908–16. doi: 10.4161/onci.21205.
- Roemer MG, Advani RH, Redd RA, et al. Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced β 2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(11):910–6. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0201.
- Roemer MGM, Redd RA, Cader FZ, et al. Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(10):942–50. doi: 10.1200/JCO.2017.77.3994.
- Murray P, Bell A. Contribution of the Epstein-Barr Virus to the Pathogenesis of Hodgkin Lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):287–313. doi: 10.1007/978-3-319-22822-8_12.
- Xu M, Zhang WL, Zhu Q, et al. Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies. *Theranostics*. 2019;9(4):1115–24. doi: 10.7150/tno.29622.
- Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2009;1(2):e2009013. doi: 10.4084/MJHID.2009.013.
- Murray PG, Young LS. An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2019;134(7):591–6. doi: 10.1182/blood.2019000568.
- Carbone A, Ghoghini A. Epstein Barr Virus-Associated Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2018;10(6):163. doi: 10.3390/cancers10060163.
- Santesteban-Espejo A, Perez-Requena J, Atienza-Cuevas L, et al. Prognostic Role of the Expression of Latent-Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus in Classical Hodgkin Lymphoma. *Viruses*. 2021;13(12):2523. doi: 10.3390/v13122523.
- Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):15–27. doi: 10.1038/nrc2542.
- Rengstl B, Newrzela S, Heinrich T, et al. Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(51):20729–34. doi: 10.1073/pnas.1312509110.
- Aldinucci D, Ghoghini A, Pinto A, et al. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol*. 2010;221(3):248–63. doi: 10.1002/path.2711.
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720–48. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2.
- Bennett MH, Tu A, Hudson GV. Analysis of grade 1 Hodgkin's disease (Report no 6). *Clin Radiol*. 1981;32(5):491–8. doi: 10.1016/s0009-9260(81)80174-2.
- Bennett MH, MacLennan KA, Easterling MJ, et al. The prognostic significance of cellular subtypes in nodular sclerosing Hodgkin's disease: an analysis of 271 non-laparotomised cases (BNLI report no. 22). *Clin Radiol*. 1983;34(5):497–501. doi: 10.1016/s0009-9260(83)80148-2.
- MacLennan KA, Bennett MH, Tu A, et al. Relationship of histopathologic features to survival and relapse in nodular sclerosing Hodgkin's disease. A study of 1659 patients. *Cancer*. 1989;64(8):1686–93. doi: 10.1002/1097-0142(19891015)64:8<1686::aid-cnrc2820640822>3.0.co;2-i.
- Van Spronsen DJ, Vrints LW, Hofstra G, et al. Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972–92. *Br J Haematol*. 1997;96(2):322–7. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2010.x.
- Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol*. 2002;55(3):162–76. doi: 10.1136/jcp.55.3.162.

52. Lorenzen J, Thiele J, Fischer R. The mummified Hodgkin cell: cell death in Hodgkin's disease. *J Pathol.* 1997;182(3):288–98. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<288::AID-PATH859>3.0.CO;2-3.
53. Eberle FC, Mani H, Jaffe ES. Histopathology of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J.* 2009;15(2):129–37. doi: 10.1097/PPO.0b013e31819e31cf.
54. Wang HW, Balakrishna JP, Pittaluga S, Jaffe ES. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *Br J Haematol.* 2019;184(1):45–59. doi: 10.1111/bjh.15614.
55. Tzankov A, Bourgau C, Kaiser A, et al. Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol.* 2005;18(12):1542–9. doi: 10.1038/modpathol.3800473.
56. Venkataraman G, Song JY, Tzankov A, et al. Aberrant T-cell antigen expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with decreased event-free survival and overall survival. *Blood.* 2013;121(10):1795–804. doi: 10.1182/blood-2012-06-439455.
57. Wang M, Zhao J, Zhang L, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761–73. doi: 10.7150/jca.17648.
58. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer.* 2018;118(1):9–16. doi: 10.1038/bjc.2017.434.
59. Andre MPE, Carde P, Viviani S, et al. Long-term overall survival and toxicities of ABVD vs BEACOPP in advanced Hodgkin lymphoma: A pooled analysis of four randomized trials. *Cancer Med.* 2020;9(18):6565–75. doi: 10.1002/cam4.3298.
60. Engert A, Diehl V, Franklin J, et al. Escalated-Dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol.* 2009;27(27):4548–54. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8820.
61. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet.* 2002;359(9323):2065–71. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08938-9.
62. Arai S, Fanale M, Devos S, et al. Defining a Hodgkin lymphoma population for novel therapeutics after relapse from autologous hematopoietic cell transplant. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(11):2531–3. doi: 10.3109/10428194.2013.798868.
63. Chen R, Gopal A, Smith SE, et al. Five-Year survival and durability results of brentuximab vedotin in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2016;128(12):1562–6. doi: 10.1182/blood-2016-02-699850.
64. Armand P, Engert A, Younes A, et al. Nivolumab for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma after failure of autologous hematopoietic cell transplantation: Extended follow-up of the multicohort single-arm phase II checkmate 205 trial. *J Clin Oncol.* 2018;36(14):1428–39. doi: 10.1200/JCO.2017.76.0793.
65. Lepik KV, Mikhailova NB, Moiseev IS, et al. Nivolumab for the treatment of relapsed and refractory classical Hodgkin lymphoma after ASCT and in ASCT-naïve patients. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(9):2316–9. doi: 10.1080/10428194.2019.1573368.
66. Flores MBA, Corvinos MSa, Elez MM, et al. A new approach to the study of Hodgkin lymphoma by flow cytometry. *Pathology.* 2023;55(1):86–93. doi: 10.1016/j.pathol.2022.07.005.
67. Cader FZ, Schackmann RCJ, Hu X, et al. Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4+ regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood.* 2018;132(8):825–36. doi: 10.1182/blood-2018-04-843714.
68. Scott DW, Steidl C. The classical Hodgkin lymphoma tumor microenvironment: macrophages and gene expression-based modeling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014;2014(1):144–50. doi: 10.1182/asheducation-2014.1144.
69. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, et al. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2017;130(22):2420–30. doi: 10.1182/blood-2017-03-770719.
70. Elaldi R, Hemon P, Petti L, et al. High Dimensional Imaging Mass Cytometry Panel to Visualize the Tumor Immune Microenvironment Contexture. *Front Immunol.* 2021;12:666233. doi: 10.3389/fimmu.2021.666233.
71. Ptacek J, Locke D, Finck R, et al. Multiplexed ion beam imaging (MIBI) for characterization of the tumor microenvironment across tumor types. *Lab Invest.* 2020;100(8):1111–23. doi: 10.1038/s41374-020-0417-4.
72. Aldinucci D, Celegato M, Casagrande N. Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. *Cancer Lett.* 2016;380(1):243–52. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.007.
73. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, et al. Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer.* 2008;122(4):769–76. doi: 10.1002/ijc.23119.
74. Van den Berg A, Visser L, Poppema S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 1999;154(6):1685–91. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65424-7.
75. Hnatkova M, Mocikova H, Trnny M, Zivny J. The biological environment of Hodgkin's lymphoma and the role of the chemokine CCL17/TARC. *Prague Med Rep.* 2009;110(1):35–41.
76. Niens M, Visser L, Nolte IM, et al. Serum chemokine levels in Hodgkin lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. *Br J Haematol.* 2008;140(5):527–36. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06964.x.
77. Cattaruzza L, Gloghini A, Olivo K, et al. Functional coexpression of interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer.* 2009;125(5):1092–101. doi: 10.1002/ijc.24389.
78. Vera-Lozada G, Minnicelli C, Segges P, et al. Interleukin 10 (IL-10) proximal promoter polymorphisms beyond clinical response in classical Hodgkin lymphoma: Exploring the basis for the genetic control of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2018;7(5):e1389821. doi: 10.1080/2162402X.2017.1389821.
79. Hsu SM, Lin J, Xie SS, et al. Abundant expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 by Hodgkin's Reed-Sternberg cells and by reactive T lymphocytes in Hodgkin's disease. *Hum Pathol.* 1993;24(3):249–55. doi: 10.1016/0046-8177(93)90034-e.
80. Kadin ME, Agnarsson BA, Ellingsworth LR, Newcom SR. Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol.* 1990;136(6):1209–14.
81. Maggio E, van den Berg A, Diepstra A, et al. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol.* 2002;13(Suppl 1):52–6. doi: 10.1093/annonc/13.s1.52.
82. Fischer M, Juremalm M, Olsson N, et al. Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer.* 2003;107(2):197–201. doi: 10.1002/ijc.11370.
83. Liu Y, Sattarzadeh A, Diepstra A, et al. The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: an actively shaped and essential tumor component. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:15–22. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.07.002.
84. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2002;99(12):4283–97. doi: 10.1182/blood-2002-01-0099.
85. Machado L, Jarrett R, Morgan S, et al. Expression and function of T cell homing molecules in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(1):85–94. doi: 10.1007/s00262-008-0528-z.
86. Opinto G, Agostinelli C, Ciavarella S, et al. Hodgkin Lymphoma: A Special Microenvironment. *J Clin Med.* 2021;10(20):4665. doi: 10.3390/jcm10204665.
87. Zijtregtop EAM, Tromp I, Dandis R, et al. The Prognostic Value of Eight Immunohistochemical Markers Expressed in the Tumor Microenvironment and on Hodgkin Reed-Sternberg Cells in Pediatric Patients With Classical Hodgkin Lymphoma. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610482. doi: 10.3389/pore.2022.1610482.
88. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2008;173(1):195–204. doi: 10.2353/ajpath.2008.070845.
89. Nagpal P, Descalzi-Montoya DB, Lodhi N. The circuitry of the tumor microenvironment in adult and pediatric Hodgkin lymphoma: cellular composition, cytokine profile, EBV, and exosomes. *Cancer Rep (Hoboken).* 2021;4(2):e1311. doi: 10.1002/cnr.21311.
90. Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2009;1(2):e2009013. doi: 10.4084/MJHID.2009.013.
91. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2008;173(1):195–204. doi: 10.2353/ajpath.2008.070845.
92. Pavlovic A, Glavina Durdov M, Capkun V, et al. Classical Hodgkin Lymphoma with Positive Epstein-Barr Virus Status is Associated with More FOXP3 Regulatory T Cells. *Med Sci Monit.* 2016;22:2340–6. doi: 10.12659/msm.896629.
93. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol.* 2011;29(14):1812–26. doi: 10.1200/JCO.2010.32.8401.
94. Peh SC, Kim LH, Poppema S. TARC, a CC chemokine, is frequently expressed in classic Hodgkin's lymphoma but not in NLP Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and most cases of anaplastic large cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):925–9. doi: 10.1097/00000478-200107000-00011.
95. Driessen J, Kersten MJ, Visser L, et al. Prognostic value of TARC and quantitative PET parameters in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma patients treated with brentuximab vedotin and DHAP. *Leukemia.* 2022;36(12):2853–62. doi: 10.1038/s41375-022-01717-8.
96. Kopinska A, Koclega A, Francuz T, et al. Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) levels in newly diagnosed patients with Hodgkin lymphoma: a new promising and predictive tool? Preliminary report. *J Hematopathol.* 2021;14(4):277–81. doi: 10.1007/s12308-021-00470-8.
97. Romano I, Puccini B, Signori L, et al. Serum TARC Concentration Kinetic in Classical Hodgkin Lymphoma during First-Line Treatment. *Blood.* 2021;138(Suppl 1):4500. doi: 10.1182/blood-2021-148137.
98. Zijtregtop EAM, Tromp I, Dandis R, et al. The Prognostic Value of Eight Immunohistochemical Markers Expressed in the Tumor Microenvironment and on Hodgkin Reed-Sternberg Cells in Pediatric Patients With Classical Hodgkin Lymphoma. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610482. doi: 10.3389/pore.2022.1610482.
99. Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, et al. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2001;86(3):274–81.
100. Aldinucci D, Borghese C, Casagrande N. Formation of the Immunosuppressive Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma and Therapeutic Approaches to Counter It. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2416. doi: 10.3390/ijms20102416.
101. Menendez V, Solorzano JL, Fernandez S, et al. The Hodgkin Lymphoma Immune Microenvironment: Turning Bad News into Good. *Cancers (Basel).* 2022;14(5):1360. doi: 10.3390/cancers14051360.
102. Ferrarini I, Rigo A, Visco C, et al. The Evolving Knowledge on T and NK Cells in Classic Hodgkin Lymphoma: Insights into Novel Subsets Populating the Immune Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):3757. doi: 10.3390/cancers12123757.

103. Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica*. 2016;101(7):794–802. doi: 10.3324/haematol.2015.132761.
104. Liu WR, Shipp MA. Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017;130(21):2265–70. doi: 10.1182/blood-2017-06-781989.
105. Joller N, Kuchroo VK. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;410:127–56. doi: 10.1007/82_2017_62.
106. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989–1004. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.001.
107. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207(10):2187–94. doi: 10.1084/jem.20100643.
108. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7–1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111–22. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.016.
109. Patel SS, Weirather JL, Lipschitz M, et al. The microenvironmental niche in classic Hodgkin lymphoma is enriched for CTLA-4-positive T cells that are PD-1-negative. *Blood*. 2019;134(23):2059–69. doi: 10.1182/blood.2019002206.
110. Aoki T, Chong LC, Takata K, et al. Single-Cell transcriptome analysis reveals disease-defining T-cell subsets in the tumor microenvironment of classic Hodgkin lymphoma. *Cancer Discov*. 2019;10(3):406–21. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0680.
111. Gusak A, Fedorova L, Lepik K, et al. Immunosuppressive Microenvironment and Efficacy of PD-1 Inhibitors in Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma: Checkpoint Molecules Landscape and Macrophage Populations. *Cancers*. 2021;13(22):5676. doi: 10.3390/cancers13225676.
112. Greaves P, Clear A, Owen A, et al. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood*. 2013;122(16):2856–63. doi: 10.1182/blood-2013-06-508044.
113. Taylor JG, Truelove E, Clear A, et al. PDL1 shapes the classical Hodgkin lymphoma microenvironment without inducing T-cell exhaustion. *Haematologica*. 2023;108(4):1068–82. doi: 10.3324/haematol.2022.280014.
114. Diefenbach CS, Hong F, Ambinder RF, et al. Ipilimumab, nivolumab, and brentuximab vedotin combination therapies in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: phase 1 results of an open-label, multicentre, phase 1/2 trial. *Lancet Haematol*. 2020;7(9):e660–e670. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30221-0.
115. Wein F, Kuppers R. The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2016;99(1):45–50. doi: 10.1189/jlb.3MR0315-136R.
116. Aldinucci D, Ghoghini A, Pinto A, et al. The role of CD40/CD40L and interferon regulatory factor 4 in Hodgkin lymphoma microenvironment. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(2):195–201. doi: 10.3109/10428194.2011.605190.
117. Veldman J, Visser L, Huberts-Kregel M, et al. Rosetting T cells in Hodgkin lymphoma are activated by immunological synapse components HLA class II and CD58. *Blood*. 2020;136(21):2437–41. doi: 10.1182/blood.2020005546.
118. Abdul Razak FR, Diepstra A, Visser L, van den Berg A. CD58 mutations are common in Hodgkin lymphoma cell lines and loss of CD58 expression in tumor cells occurs in Hodgkin lymphoma patients who relapse. *Genes Immun*. 2016;17(6):363–6. doi: 10.1038/gene.2016.30.
119. Schneider M, Schneider S, Zuhlke-Jenisch R, et al. Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(10):638–45. doi: 10.1002/gcc.22276.
120. Mulder TA, Andersson ML, Pena-Perez L, et al. Immune Biomarkers in the Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Classical Hodgkin Lymphoma Patients in Relation to Tumor Burden and Response to Treatment. *Hemasphere*. 2022;6(11):e794. doi: 10.1097/HS9.0000000000000794.
121. Koenecke C, Ukena SN, Ganser A, Franzke A. Regulatory T cells as therapeutic target in Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(6):769–82. doi: 10.1517/14728222.12.6.769.
122. Tanijiri T, Shimizu T, Uehira K, et al. Hodgkin's Reed-Sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+ cytotoxic T lymphocytes from CD4+ naive T cells. *J Leukoc Biol*. 2007;82(3):576–84. doi: 10.1189/jlb.0906565.
123. Littringer K, Moresi C, Rakebrandt N, et al. Common Features of Regulatory T Cell Specialization During Th1 Responses. *Front Immunol*. 2018;9:1344. doi: 10.3389/fimmu.2018.01344.
124. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;103(5):1755–62. doi: 10.1182/blood-2003-07-2594.
125. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2020;11:583084. doi: 10.3389/fimmu.2020.583084.
126. Steidl C, Farinha P, Gascoyne RD. Macrophages predict treatment outcome in Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2011;96(2):186–9. doi: 10.3324/haematol.2010.033316.
127. Karihtala K, Leivonen SK, Bruck O, et al. Prognostic Impact of Tumor-Associated Macrophages on Survival Is Checkpoint Dependent in Classical Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):877. doi: 10.3390/cancers12040877.
128. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*. 2019;10:792. doi: 10.3389/fimmu.2019.00792.
129. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425–40. doi: 10.1002/jcp.26429.
130. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: Tumor-Associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549–55. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5.
131. Barros MHM, Segges P, Vera-Lozada G, et al. Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0124531. doi: 10.1371/journal.pone.0124531.
132. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem*. 2018;120(3):2756–65. doi: 10.1002/jcb.27646.
133. Jiang Z, Sun H, Yu J, et al. Targeting CD47 for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):180. doi: 10.1186/s13045-021-01197-w.
134. Li Z, Li Y, Gao J, et al. The role of CD47-SIRPα immune checkpoint in tumor immune evasion and innate immunotherapy. *Life Sci*. 2021;273:119150. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119150.
135. Oronsky B, Carter C, Reid T, et al. Just eat it: A review of CD47 and SIRP-α antagonism. *Semin Oncol*. 2020;47(2–3):117–24. doi: 10.1053/j.seminoncol.2020.05.009.
136. Gholiha AR, Hollander P, Lof L, et al. Checkpoint CD47 expression in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2022;197(5):580–9. doi: 10.1111/bjh.18137.
137. Russ A, Hua AB, Montfort WR, et al. Blocking “don't eat me” signal of CD47-SIRPα in hematological malignancies, an in-depth review. *Blood Rev*. 2018;32(6):480–9. doi: 10.1016/j.blre.2018.04.005.
138. Hayat SMG, Bianconi V, Pirro M, et al. CD47: role in the immune system and application to cancer therapy. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(1):19–30. doi: 10.1007/s13402-019-00469-5.
139. Lu D, Ni Z, Liu X, et al. Beyond T Cells: Understanding the Role of PD-1/PD-L1 in Tumor-Associated Macrophages. *J Immunol Res*. 2019;2019:1919082. doi: 10.1155/2019/1919082.
140. Vari F, Arpon D, Keane C, et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood*. 2018;131(16):1809–19. doi: 10.1182/blood-2017-07-796342.
141. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017;545(7655):495–9. doi: 10.1038/nature22396.
142. Li W, Wu F, Zhao S, et al. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: A key player in tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2022;67:49–57. doi: 10.1016/j.cytogfr.2022.07.004.
143. De la Cruz-Merino L, Lejeune M, Nogales Fernandez E, et al. Role of immune escape mechanisms in Hodgkin's lymphoma development and progression: a whole new world with therapeutic implications. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:756353. doi: 10.1155/2012/756353.
144. Calabretta E, d'Amore F, Carlo-Stella C. Immune and Inflammatory Cells of the Tumor Microenvironment Represent Novel Therapeutic Targets in Classical Hodgkin Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21):5503. doi: 10.3390/ijms20215503.
145. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1/PD-L1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(6):3220–4. doi: 10.1182/blood-2007-05-085159.
146. Xiong H, Mittman S, Rodriguez R, et al. Anti-PD-L1 Treatment Results in Functional Remodeling of the Macrophage Compartment. *Cancer Res*. 2019;79(7):1493–506. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3208.
147. Tumeq PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568–71. doi: 10.1038/nature13954.
148. Willenbrock K, Roers A, Blohbaum B, et al. CD8(+) T cells in Hodgkin's disease tumor tissue are a polyclonal population with limited clonal expansion but little evidence of selection by antigen. *Am J Pathol*. 2000;157(1):171–5. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64528-2.
149. Neefjes J, Jongmsa MLM, Paul P, et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823–36. doi: 10.1038/nri3084.
150. Nagasaki J, Togashi Y, Sugawara T, et al. The critical role of CD4+ T cells in PD-1 blockade against MHC-II-expressing tumors such as classic Hodgkin lymphoma. *Blood Adv*. 2020;4(17):4069–82. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002098.
151. Cader FZ, Hu X, Goh WL, et al. A peripheral immune signature of responsiveness to PD-1 blockade in patients with classical Hodgkin lymphoma. *Nat Med*. 2020;26(9):1468–79. doi: 10.1038/s41591-020-1006-1.
152. Reinke S, Brockelmann PJ, Iaccarino I, et al. Tumor and microenvironment response but no cytotoxic T-cell activation in classic Hodgkin lymphoma treated with anti-PD1. *Blood*. 2020;136(25):2851–63. doi: 10.1182/blood.2020008553.
153. Brockelmann PJ, Goergen H, Keller U, et al. Efficacy of Nivolumab and AVD in Early-Stage Unfavorable Classic Hodgkin Lymphoma: The Randomized Phase 2 German Hodgkin Study Group NIVAHL Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(6):872–80. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.0750.
154. Chen R, Zinzani PL, Lee HJ, et al. Pembrolizumab in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: 2-year follow-up of KEYNOTE-087. *Blood*. 2019;134(14):1144–53. doi: 10.1182/blood.2019000324.
155. Lepik KV, Fedorova LV, Kondakova EV, et al. A Phase 2 Study of Nivolumab Using a Fixed Dose of 40mg (Nivo40) in Patients With Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma. *Hemasphere*. 2020;4(5):e480. doi: 10.1097/HS9.0000000000000480.

156. Herrera AF, Chen R, Palmer J, et al. PET-adapted nivolumab or nivolumab plus ICE as first salvage therapy in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2019;134(Suppl 1):239. doi: 10.1182/blood-2019-123162.
157. Allen PB, Savas H, Evens AM, et al. Pembrolizumab followed by AVD in untreated early unfavorable and advanced-stage classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2021;137(10):1318–26. doi: 10.1182/blood.2020007400.
158. Herrera AF, Burton C, Radford J, et al. Avelumab in relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma: phase 1b results from the JAVELIN Hodgkins trial. *Blood Adv*. 2021;5(17):3387–96. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004511.
159. Timmerman J, Lavie D, Johnson NA, et al. Favezelimab (anti-LAG-3) plus pembrolizumab in patients with relapsed or refractory (R/R) classical Hodgkin lymphoma (cHL) after anti-PD-1 treatment: An open-label phase 1/2 study. *J Clin Oncol*. 2022;40(Suppl 16):7545. doi: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.7545.
160. Diefenbach CS, Hong F, Ambinder RF, et al. Ipilimumab, nivolumab, and brentuximab vedotin combination therapies in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: phase 1 results of an open-label, multicentre, phase 1/2 trial. *Lancet Haematol*. 2020;7(9):e660–e670. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30221-0.
161. Fares CM, van Allen EM, Drake CG, et al. Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:147–64. doi: 10.1200/EDBK_240837.
162. Smaglo BG, Aldeghaither D, Weiner LM. The development of immunonjugates for targeted cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(11):637–48. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.159.
163. Younes A, Gopal AK, Smith SE, et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2183–9. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0410.
164. Hamadani M, Collins GP, Samaniego F, et al. Phase 1 study of ADCT-301 (Camidanlumab Tesirine), a novel pyrrolbenzodiazepine-based antibody drug conjugate, in relapsed/refractory classical Hodgkin Lymphoma. *Blood*. 2018;132(Suppl 1):928. doi: 10.1182/blood-2018-99-118198.
165. Flynn MJ, Hartley JA. The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *Br J Haematol*. 2017;179(1):20–35. doi: 10.1111/bjh.14770.
166. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, et al. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(11):4091–6. doi: 10.1073/pnas.0408679102.
167. Zinzani PL, Carlo-Stella C, Hamadani M, et al. Camidanlumab tesirine efficacy and safety in an open-label, multicenter, phase 2 study of patients (pts) with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (r/r cHL). *Hematol Oncol*. 2021;39(S2):125–7. doi: 10.1002/hon.75_2879.
168. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006;66(2):605–12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4005.
169. Smith CC, Perl AE, Lasater E, et al. PLX3397 Is An Investigational Selective FLT3 Inhibitor That Retains Activity Against the Clinically-Relevant FLT3-ITD/F691L "Gatekeeper" Mutation in Vitro. *Blood*. 2011;118(21):764. doi: 10.1182/blood.V118.21764.764.
170. Moskowitz CH, Younes A, de Vos S, et al. CSF1R Inhibition by PLX3397 in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: Results From a Phase 2 Single Agent Clinical Trial. *Blood*. 2012;120(21):1638. doi: 10.1182/blood.V120.211638.1638.
171. Fujiwara T, Yakoub MA, Chandler A, et al. CSF1/CSF1R Signaling Inhibitor Pexidartinib (PLX3397) Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Stimulates T-cell Infiltration in the Sarcoma Microenvironment. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(8):1388–99. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0591.
172. Dickinson MJ, Carlo-Stella C, Morschhauser F, et al. Glofitamab for Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;387(24):2220–31. doi: 10.1056/NEJMoa2206913.
173. Rothe A, Sasse S, Topp MS, et al. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015;125(26):4024–31. doi: 10.1182/blood-2014-12-614636.
174. Kerbaui LN, Marin ND, Kaplan M, et al. Combining AFM13, a Bispecific CD30/CD16 Antibody, with Cytokine-Activated Blood and Cord Blood-Derived NK Cells Facilitates CAR-like Responses Against CD30+ Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2021;27(13):3744–56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0164.
175. Rajendran S, Li Y, Ngho E, et al. Development of a Bispecific Antibody Targeting CD30 and CD137 on Hodgkin and Reed-Sternberg Cells. *Front Oncol*. 2019;9:945. doi: 10.3389/fonc.2019.00945.
176. Piccione EC, Juarez S, Liu J, et al. A bispecific antibody targeting CD47 and CD20 selectively binds and eliminates dual antigen expressing lymphoma cells. *MAbs*. 2015;7(5):946–56. doi: 10.1080/19420862.2015.1062192.
177. Wang Y, Ni H, Zhou S, et al. Tumor-selective blockade of CD47 signaling with a CD47/PD-L1 bispecific antibody for enhanced anti-tumor activity and limited toxicity. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(2):365–76. doi: 10.1007/s00262-020-02679-5.
178. Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2022;399(10343):2294–308. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00662-6.
179. Ramos CA, Grover CA, Beaven AW, et al. Anti-CD30 CAR-T cell therapy in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2020;38(32):3794–804. doi: 10.1200/JCO.20.01342.
180. Ruella M, Klichinsky M, Kenderian SS, et al. Overcoming the Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Hodgkin Lymphoma Using Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancer Discov*. 2017;7(10):1154–67. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0850.
181. Shah SR, Tran TM. Lenalidomide in myelodysplastic syndrome and multiple myeloma. *Drugs*. 2007;67(13):1869–81. doi: 10.2165/00003495-200767130-00005.
182. Wang M, Fowler N, Wagner-Bartak N, et al. Oral lenalidomide with rituximab in relapsed or refractory diffuse large cell, follicular and transformed lymphoma: a phase II clinical trial. *Leukemia*. 2013;27(9):1902–9. doi: 10.1038/leu.2013.95.
183. Fehniger TA, Larson S, Trinkaus K, et al. A phase 2 multicenter study of lenalidomide in relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;118(19):5119–25. doi: 10.1182/blood-2011-07-362475.
184. Kuruvilla J, Taylor D, Wang L, et al. Phase II trial of lenalidomide in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;112(11):3052. doi: 10.1182/blood.V112.11.3052.3052.
185. Alonso-Alvarez S, Vidrales MB, Caballero MD, et al. The number of tumor infiltrating T-cell subsets in lymph nodes from patients with Hodgkin lymphoma is associated with the outcome after first line ABVD therapy. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(5):1144–52. doi: 10.1080/10428194.2016.1239263.
186. Zawati I, Adouni O, Manai M, et al. FOXP3+/CD68+ ratio within the tumor microenvironment may serve as a potential prognostic factor in classical Hodgkin lymphoma. *Hum Immunol*. 2022;83(12):843–56. doi: 10.1016/j.humimm.2022.08.013.
187. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, et al. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. *Blood*. 1997;89(4):1376–82.
188. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1467–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1869.
189. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(6):958–65. doi: 10.1309/NCB3947K383DJOLQ2.
190. Schreck S, Friebel D, Buettner M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. 2009;27(1):31–9. doi: 10.1002/hon.878.
191. Agostinelli C, Gallamini A, Stracqualursi L, et al. The combined role of biomarkers and interim PET scan in prediction of treatment outcome in classical Hodgkin's lymphoma: a retrospective, European, multicentre cohort study. *Lancet Haematol*. 2016;3(10):e467–e479. doi: 10.1016/S2352-3026(16)30108-9.
192. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol*. 2009;40(12):1715–22. doi: 10.1016/j.humpath.2009.03.025.
193. Nguyen TT, Frater JL, Klein J, et al. Expression of TIA1 and PAX5 in Classical Hodgkin Lymphoma at Initial Diagnosis May Predict Clinical Outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(6):383–91. doi: 10.1097/PAI.0000000000000200.
194. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 2009;113(12):2765–3775. doi: 10.1182/blood-2008-07-168096.
195. Greaves P, Clear A, Coutinho R, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):256–62. doi: 10.1200/JCO.2011.39.9881.
196. Wang C, Xia B, Wang T, et al. PD-1, FOXP3, and CSF-1R expression in patients with Hodgkin lymphoma and their prognostic value. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(4):1923–34.
197. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93(2):193–200. doi: 10.3324/haematol.11702.
198. Lacet DFR, Oliveira CC. The role of immunohistochemistry in the assessment of classical Hodgkin lymphoma microenvironment. *Int J Clin Exp Pathol*. 2022;15(10):412–24.
199. Moerdler S, Ewart M, Friedman DL, et al. LAG-3 is expressed on a majority of tumor infiltrating lymphocytes in pediatric Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(3):606–13. doi: 10.1080/10428194.2020.1839651.
200. Annibaldi O, Bianchi A, Grifoni A, et al. A novel scoring system for TIGIT expression in classic Hodgkin lymphoma. *Sci Rep*. 2021;11(1):7059. doi: 10.1038/s41598-021-86655-8.
201. Karihtala K, Leivonen SK, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Checkpoint protein expression in the tumor microenvironment defines the outcome of classical Hodgkin lymphoma patients. *Blood Adv*. 2022;6(6):1919–31. doi: 10.1182/bloodadvances.2021006189.
202. Guo B, Cen H, Tan X, Ke Q. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC Med*. 2016;14(1):159. doi: 10.1186/s12916-016-0711-6.

- 203.** Klein JL, Nguyen TT, Bien-Wilner GA, et al. CD163 Immunohistochemistry is superior to CD68 in predicting outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(3):381–7. doi: 10.1309/AJCP61TLMXLSLJYS.
- 204.** Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, et al. Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013;8(11):e80908. doi: 10.1371/journal.pone.0080908.
- 205.** Barros MH, Segges P, Vera-Lozada G, et al. Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. *PLoS One.* 2015;10(5):e0124531. doi: 10.1371/journal.pone.0124531.
- 206.** Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;362(10):875–85. doi: 10.1056/NEJMoa0905680.
- 207.** Tudor CS, Distel LV, Eckhardt J, et al. B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. *Hum Pathol.* 2013;44(11):2475–86. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.006.
- 208.** Mizuno H, Nakayama T, Miyata Y, et al. Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib. *Leukemia.* 2012;26(10):2269–76. doi: 10.1038/leu.2012.81.
- 209.** Glimelius I, Edstrom A, Fischer M, et al. Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2005;19(12):2360–2. doi: 10.1038/sj.leu.2403992.
- 210.** Ribatti D, Tamma R, Annesse T, et al. Inflammatory microenvironment in classical Hodgkin's lymphoma with special stress on mast cells. *Front Oncol.* 2022;12:964573. doi: 10.3389/fonc.2022.964573.
- 211.** Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Micro-environment. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(3):313–25. doi: 10.1007/s12016-019-08753-w.
- 212.** Nakayama S, Yokote T, Hiraoka N, et al. Role of mast cells in fibrosis of classical Hodgkin lymphoma. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016;29(4):603–11. doi: 10.1177/0394632016644447.
- 213.** Molin D, Fischer M, Xiang Z, et al. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 2001;114(3):616–23. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02977.x.
- 214.** Molin D, Edstrom A, Glimelius I, et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 2002;119(1):122–4. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03768.x.
- 215.** Keresztes K, Szollosi Z, Simon Z, et al. Retrospective analysis of the prognostic role of tissue eosinophil and mast cells in Hodgkin's lymphoma. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(3):237–42. doi: 10.1007/BF02893504.
- 216.** Andersen MD, Kamper P, Nielsen PS, et al. Tumour-associated mast cells in classical Hodgkin's lymphoma: correlation with histological subtype, other tumour-infiltrating inflammatory cell subsets and outcome. *Eur J Haematol.* 2016;96(3):252–9. doi: 10.1111/ejh.12583.
- 217.** Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. Lyon: IARC Press; 2017.
- 218.** Von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, et al. Nodular sclerosing Hodgkin disease: new grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. *Blood.* 2003;101(10):4063–9. doi: 10.1182/blood-2002-05-1548.
- 219.** Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, et al. The role of eosinophils in the pathology of Hodgkin's disease. *Ann Oncol.* 1997;8(Suppl 2):89–96.
- 220.** Enblad G, Sundstrom C, Glimelius B. Infiltration of eosinophils in Hodgkin's disease involved lymph nodes predicts prognosis. *Hematol Oncol.* 1993;11(4):187–93. doi: 10.1002/hon.2900110404.
- 221.** Von Wasielewski R, Seth S, Franklin J, et al. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood.* 2000;95(4):1207–13.
- 222.** Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, et al. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunol Res.* 2012;52(1–2):139–56. doi: 10.1007/s12026-012-8285-7.
- 223.** Chiu J, Ernst DM, Keating A. Acquired Natural Killer Cell Dysfunction in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma. *Front Immunol.* 2018;9:267. doi: 10.3389/fimmu.2018.00267.
- 224.** Reiners KS, Kessler J, Sauer M, et al. Rescue of impaired NK cell activity in Hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Mol Ther.* 2013;21(4):895–903. doi: 10.1038/mt.2013.14.
- 225.** Tursz T, Dokhelar MC, Lipinski M, Amiel JL. Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma. *Cancer.* 1982;50(11):2333–5. doi: 10.1002/1097-0142(19821201)50:11<2333::aid-cnrcr2820501119>3.0.co;2-w.
- 226.** Alvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvado-Usach MT, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leuk Lymphoma.* 2005;46(11):1581–91. doi: 10.1080/10428190500220654.
- 227.** Zanna MY, Yasmin AR, Omar AR, et al. Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8044. doi: 10.3390/ijms22158044.
- 228.** Galati D, Zanotta S, Corazzelli G, et al. Circulating dendritic cells deficiencies as a new biomarker in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2019;184(4):594–604. doi: 10.1111/bjh.15676.
- 229.** Tudor CS, Bruns H, Daniel C, et al. Macrophages and dendritic cells as actors in the immune reaction of classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One.* 2014;9(12):e114345. doi: 10.1371/journal.pone.0114345.
- 230.** Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(8):485–98. doi: 10.1038/s41577-020-00490-y.
- 231.** Romano A, Parrinello NL, Vetro C, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *Br J Haematol.* 2015;168(5):689–700. doi: 10.1111/bjh.13198.
- 232.** Novosad O, Gorbach O, Skachkova O, et al. Role of Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cell (MDSC) in Hodgkin Lymphoma (HL) Progression: Updated Prospective Study. *Blood.* 2020;136(Suppl 1):31. doi: 10.1182/blood-2020-141259.
- 233.** Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- 234.** Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia.* 2005;19(6):894–900. doi: 10.1038/sj.leu.2403690.
- 235.** Karihtala K, Leivonen SK, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. T026: Characterization of cancer-associated fibroblasts in classical Hodgkin lymphoma. *Hemasphere.* 2022;6(Suppl):13. doi: 10.1097/01.HS9.0000890672.81592.33.
- 236.** Bankov K, Doring C, Ustaszewski A, et al. Fibroblasts in Nodular Sclerosing Classical Hodgkin Lymphoma Are Defined by a Specific Phenotype and Protect Tumor Cells from Brentuximab-Vedotin Induced Injury. *Cancers (Basel).* 2019;11(11):1687. doi: 10.3390/cancers11111687.
- 237.** Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, et al. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2011;96(2):269–76. doi: 10.3324/haematol.2010.031542.
- 238.** Tan KL, Scott DW, Hong F, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood.* 2012;120(16):3280–7. doi: 10.1182/blood-2012-04-421057.
- 239.** Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2012;23(3):736–42. doi: 10.1093/annonc/mdr157.
- 240.** Werner L, Dreyer JH, Hartmann D, et al. Tumor-associated macrophages in classical Hodgkin lymphoma: homeostatic relationship to outcome. *Sci Rep.* 2020;10(1):9410. doi: 10.1038/s41598-020-66010-z.
- 241.** Panico L, Ronconi F, Lepore M, et al. Prognostic role of tumor-associated macrophages and angiogenesis in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(11):2418–25. doi: 10.3109/10428194.2013.778405.
- 242.** Ng WL, Ansell SM, Mondello P. Insights into the tumor microenvironment of B cell lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022;41(1):362. doi: 10.1186/s13046-022-02579-9.
- 243.** Chen X, Cho DB, Yang PC. Double staining immunohistochemistry. *N Am J Med Sci.* 2010;2(5):241–5. doi: 10.4297/najms.2010.2241.
- 244.** Parra ER, Uraoka N, Jiang M, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci Rep.* 2017;7(1):13380. doi: 10.1038/s41598-017-13942-8.
- 245.** Ijsselstein ME, van der Breggen R, Farina Sarasqueta A, et al. A 40-Marker Panel for High Dimensional Characterization of Cancer Immune Microenvironments by Imaging Mass Cytometry. *Front Immunol.* 2019;10:2534. doi: 10.3389/fimmu.2019.02534.
- 246.** Marx V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics. *Nat Methods.* 2021;18:9–14. doi: 10.1038/s41592-020-01033-y.
- 247.** Lee MKI, Rabindranath M, Faust K, et al. Compound computer vision workflow for efficient and automated immunohistochemical analysis of whole slide images. *J Clin Pathol.* 2022;jcclinpath-2021-208020. doi: 10.1136/jclinpath-2021-208020.
- 248.** Wilson CM, Ospina OE, Townsend MK, et al. Challenges and Opportunities in the Statistical Analysis of Multiplex Immunofluorescence Data. *Cancers (Basel).* 2021;13(12):3031. doi: 10.3390/cancers13123031.
- 249.** M'kacher R, Frenzel M, Al Jawhari M, et al. Establishment and Characterization of a Reliable Xenograft Model of Hodgkin Lymphoma Suitable for the Study of Tumor Origin and the Design of New Therapies. *Cancers (Basel).* 2018;10(11):414. doi: 10.3390/cancers10110414.