

ОТ РЕДАКЦИИ



Учитывая важность заявленной проблемы обнаружения единичных опухолевых клеток при злокачественных опухолях, редакция сочла возможным публикацию статьи С.А. Кузнецова и соавт. «Методы идентификации микрометастазов при злокачественных новообразованиях», несмотря на неоднозначность оценки рецензентами данного материала, с надеждой на активное участие читателей в обсуждении данной тематики. Мы ждем ваших писем и отзывов и будем рады представить читателям ваши оригинальные статьи и обзоры.

Методы идентификации микрометастазов при злокачественных новообразованиях

С.А. Кузнецов, И.Ж. Шубина, Л.Т. Мамедова, А.Н. Грицай, М.В. Киселевский

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Станислав Андреевич Кузнецов stas3011992@mail.ru

Проанализированы данные литературы, касающиеся методов, применяемых для обнаружения единичных опухолевых клеток в костном мозге, лимфатических узлах и периферической крови. Рассмотрен уровень чувствительность современных методов детекции. Несмотря на успехи в развитии молекулярной биологии и цитологии, до сих пор не существует универсального подхода к идентификации микрометастазов и рекомендуется оптимизация существующих методик.

Ключевые слова: рак молочной железы, проточная цитометрия, иммуногистохимия, микрометастазы

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-75-79

Micrometastases identification in malignant tumors

S.A. Kuznetsov, I.Zh. Shubina, L.T. Mamedova, A.N. Gritsay, M.V. Kiselevskiy

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

The article reviewed literature data relating to the methods used for detection of single tumor cells in bone marrow, lymph nodes, and peripheral blood. Sensitivity of modern detection methods is analyzed. Despite advances in the development of molecular biology and cytology, until now there is no universal approach to the micrometastases identification, and existing methods optimization are recommended.

Key words: breast cancer, flow cytometry, immunohistochemistry, micrometastases

Введение

Проблема идентификации микрометастазов в костном мозге, лимфатических узлах (ЛУ) и крови является одной из важных задач современной онкологии. Микрометастазами обычно называют единичные опухолевые клетки или небольшие клеточные конгломераты, обнаруживаемые вне локализации основной опухоли. В зависимости от места обнаружения таких

клеток их разделяют на циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) и диссеминированные опухолевые клетки (ДОК). К ЦОК относят те, которые обнаруживают в периферической крови пациентов, а к ДОК — те, которые выявляют в тканях и органах [1].

До сих пор не существует единого мнения среди исследователей относительно прогностического значения наличия ЦОК и ДОК. По данным различных

исследований, микрометастазы выявляются в лимфе, ЛУ и костном мозге в послеоперационном периоде [2, 3]. В настоящее время утвердилось мнение, что наличие более 7–8 опухолевых клеток среди нескольких миллионов клеток лимфы уже является неблагоприятным прогнозом [4, 5]. Одна из задач при изучении роли микрометастазов – адекватный способ идентификации этих клеток. В настоящее время существует несколько методов, которые с разной точностью позволяют определить наличие опухолевых клеток в крови и костном мозге:

- 1) проточная цитометрия;
- 2) световая микроскопия;
- 3) полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- 4) иммуномагнитная сепарация;
- 5) иммуноферментный анализ (система EPISPOT);
- 6) иммуногистохимия и иммуноцитохимия;
- 7) метод клеточных культур;
- 8) система избирательного определения опухолевых клеток CellSearch.

Проточная цитометрия

Метод проточной цитометрии основан на лазерной идентификации клеток, которые окрашены специфическими моноклональными антителами (МКА), конъюгированными с флуоресцентными красителями. Данный метод позволяет обнаружить 1 трансформированную клетку на 10^4 – 10^6 нормальных клеток.

Для проточной цитометрии используют такие флуорохромы, как, например, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE), аллофикоцианин (APC) и др., конъюгированные с МКА. Для обнаружения эпителиальных клеток используют МКА против цитокератина-19 (СК19), СК18 и др., а также молекулы адгезии эпителиальных клеток (EрСАМ) и другие рецепторы эпителиальных клеток. Проточная цитометрия позволяет определять микрометастазы в периферической крови, лимфе, костном мозге, при этом объем пунктата костного мозга обычно не превышает 0,5 мл, так как при большем объеме возможно разбавление образца периферической кровью [6]. К достоинствам данного метода можно отнести относительную простоту исполнения (в отличие, например, от иммуногистохимии), а также высокую точность подсчета клеток. Однако существует вероятность обнаружения ложноположительных клеток в пробе. В работе О.Б. Бжадуг [3] определение опухолевых клеток в периферической крови у больных раком молочной железы (РМЖ) проводили с помощью проточной цитометрии. Забор крови осуществляли в объеме 10 мл. Полученные клетки окрашивали антителами к общему лейкоцитарному антигену CD45 и к эпителиальному антигену Eр34 (HEA125). В исследование были включены 65 больных РМЖ. Частота выявления ЦОК в периферической крови составила 41,3 % [7]. В исследовании L. Wang и соавт. [5] изучаемые образцы готовили из смешанной суспензии клеток линии A431 (эпидермоидная карцинома чело-

века). Исследовали 73 образца периферической крови, включавших 48 пациенток с РМЖ различных стадий и 25 здоровых доноров. Предварительно количество клеток A431 было подсчитано с помощью флуоресцентной микроскопии. Изучаемые образцы окрашивали МКА против СК19 (FITC). Микрометастазами считали наличие окрашенных клеток, количество которых выходило за пределы предварительно подсчитанного числа клеток A431. В образцах 27 % пациенток с РМЖ были найдены микрометастазы. В образцах контрольной группы окрашенных клеток не обнаружено. Авторы отмечают, что количество микрометастазов коррелировало со стадией заболевания: чем выше стадия, тем больше опухолевых клеток было выявлено. По утверждению авторов, чувствительность метода проточной цитометрии составляет 1 опухолевую клетку на 10^4 нормальных [5].

Световая микроскопия

Анализ цитологического препарата, приготовленного стандартным образом, позволяет отличать трансформированные клетки от нетрансформированных по морфологическим признакам. Световая микроскопия используется при рутинных диагностических мероприятиях, однако для выявления единичных клеток при изучении большого количества материала такой подход становится трудновыполнимым.

В работе Е.В. Чигриновой и соавт. [8] при стандартном цитологическом и гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга и мазков аспирата не было обнаружено патологических элементов, при этом цитокератин-положительные клетки были обнаружены при иммуногистохимическом окрашивании.

Полимеразная цепная реакция

ПЦР основана на способности ДНК к репликации. Благодаря этому методу стало возможным обнаружение даже незначительного количества генетического материала в пробе [9]. В течение нескольких часов можно получить до 10^{10} копий одной молекулы ДНК (или ее фрагмента). Цикл ПЦР состоит из нескольких стадий. Сначала происходит денатурация двухцепочечной молекулы ДНК, затем следует процесс гибридизации, для которого используются праймеры – специальные фрагменты матричной РНК (мРНК). Для поиска микрометастазов используют мРНК антигенов, которые экспрессируются клетками злокачественных новообразований. Следующим этапом является достраивание полной двухцепочечной молекулы ДНК или ее фрагмента. Идентификация фрагментов проводится с помощью электрофореза в агарозном геле. Помимо этого, можно использовать праймеры к генам, в которых могут быть мутации при злокачественных новообразованиях (*p53*, *KRAS*) [10]. ПЦР обладает очень высокой чувствительностью (1 трансформированная на 10^6 нетрансформированных клеток).

Кроме того, ДНК является более удобным субстратом для исследования, чем клетки, и легко переносит неблагоприятные условия окружающей среды.

Существует возможность исследовать ДНК из парафиновых срезов, что позволяет увеличить точность исследования благодаря комбинации нескольких методов [3]. В работе К. Uzawa и соавт. [11] производилась детекция ЦОК с помощью метода ПЦР в реальном времени. Исследователи обнаруживали мутантные митохондриальные ДНК (мут-мтДНК), ассоциированные с опухолью, при плоскоклеточном раке полости рта. Были приготовлены праймеры к 3 последовательностям: 12S-pРНК, 16S-pРНК, D-петле (фрагмент ДНК, участвующий в репликации генетического материала митохондрий и хлоропластов). Были проведены исследования 240 клинических образцов *in vitro* и *in vivo*. В клетках полученных линий плоскоклеточного рака полости рта была обнаружена одна из приведенных выше последовательностей, в то время как в клетках нормальных тканей они не выявлялись. В послеоперационном периоде наличие мут-мтДНК в сыворотке крови четко коррелировало с плохим прогнозом течения заболевания. Авторы предполагают, что описанный метод может стать новым подходом в определении микрометастазов, где молекулярным маркером является циркулирующая мут-мтДНК. В работе N. Xenidis и соавт. [12] исследовалось наличие клеток, в которых присутствовали мРНК, кодирующие СК19, у больных РМЖ на ранней стадии при лечении тамоксифеном. Были исследованы образцы периферической крови 119 больных РМЖ с рецепторами прогестерона или эстрогенов. Детекцию мРНК осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. У 22 (18,5 %) пациентов были обнаружены клетки с кодирующей СК19 мРНК. Авторы отметили, что наличие таких клеток является прогностически неблагоприятным фактором.

Иммуномагнитная сепарация

Иммуномагнитная сепарация является одним из новых методов выявления цитокератин-положительных клеток. Показана эффективность метода для пациентов с остеосаркомой, злокачественной меланомой, РМЖ и др. [13]. Данный метод может использоваться для определения наличия микрометастазов в интраоперационном периоде, в целях уточнения стадии заболевания и необходимого объема хирургического вмешательства [14]. В методике используется принцип обогащения пула цитокератин-положительных клеток с помощью магнитных микрошариков, конъюгированных с различными антителами к цитокератинам (например, СК19, СК20, СК7/8). Суспензию клеток, инкубированных с магнитными шариками с цитокератинами, пропускают через колонку, которая прикреплена к магниту. После того как суспензия прошла через колонку, ее отсоединяют от магнита и смывают оставшиеся клетки буфером, таким образом получая клеточную суспензию, обогащенную цитокератин-

положительными клетками. Для уточнения цитологической характеристики обогащенных магнитной сепарацией клеток их окрашивают гематоксилином и эозином для последующего морфологического анализа. В работе И.С. Стилиди и соавт. [14] методом магнитной сепарации клеток костного мозга у 15 из 25 больных раком пищевода и легких II–III стадии в образцах костного мозга, полученного интраоперационно, были обнаружены от 2 до 15 клеток, конъюгированных с магнитными шариками (СК7/8). Иммуноцитохимическим методом было подтверждено наличие цитокератин-положительных клеток.

Иммуноферментный анализ (система EPISPOT)

Система EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) является разновидностью иммуноферментного анализа, которая позволяет проводить прижизненное изучение трансформированных клеток. Благодаря этому методу можно определять белки, которые выделяют опухолевые клетки в процессе своей жизнедеятельности [15]. В основе метода лежит реакция клеток (или продуктов их жизнедеятельности) с МКА. В основном этот метод используется для детекции ЦОК. Клетки культивируются на мембране, на которую предварительно были нанесены антитела. Эти антитела «захватывают» белки, которые продуцируются опухолевыми клетками, а затем их определяют с помощью вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами. Используемые маркеры имеют опухолевую специфичность, например для РМЖ – СК19 и муцин-1 (MUC1) [15]. При раке предстательной железы в качестве маркера используют секрецию простатспецифического антигена. Показано, что значительная часть ЦОК секретируют фактор роста фибробластов (FGF2) [15], что позволяет использовать антитела к этому фактору роста как маркер для детекции опухолевых клеток.

Помимо культивирования клеток на мембране можно использовать жидкие среды, как, например, сыворотку крови при детекции ЦОК. Данный метод позволяет проводить биохимический анализ молекул, секретируемых опухолевыми клетками. Однако концентрация факторов, продуцируемых опухолевыми клетками, будет низкой, если количественно самих клеток было мало. А в случае идентификации микрометастазов можно говорить об 1–7 трансформированных клетках на сотни тысяч нетрансформированных. В исследовании S. P. Leong и соавт. [16] приняли участие 68 больных меланомой. Клетки для идентификации выделяли из сторожевых ЛУ. Использовали следующие маркеры: интерферон- γ (ИФН- γ), интерлейкин-2 (ИЛ-2), гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (ГМ-КСФ), ИЛ-10. Контролем служили клетки, выделенные из близлежащих несторожевых ЛУ. В целом разницы в уровне ИЛ-10 в клетках сторожевых и несторожевых ЛУ обнаружено не было, однако отмечено значительное увеличение продукции ИФН- γ , ИЛ-2 и ГМ-КСФ в сторожевых

ЛУ по сравнению с уровнем секреции этих цитокинов в ЛУ, не дренирующей опухоль. По данным авторов, микрометастазы были определены в сторожевых ЛУ у 8 пациентов из 68. Повышенный уровень цитокинов в сторожевых ЛУ зарегистрирован у больных без микрометастазов ($n = 60$), в то время как у пациентов с микрометастазами ($n = 8$) уровень цитокинов не превышал параметров в образцах сравнения [16].

Иммуногистохимия и иммуноцитохимия

Эти два метода в настоящее время наиболее широко применяются при определении микрометастазов в костном мозге и ЛУ. Данный метод основан на специфическом окрашивании определенных фрагментов клеток, что облегчает их визуальное определение с помощью светового микроскопа.

В случае, когда иммуноцитохимия используется для определения микрометастазов в костном мозге, основой служат МКА к антигенам, не характерным для гемопоэтической ткани [17], но экспрессирующимся опухолевыми клетками. Как правило, используют антитела к эпителиальному мембранному антигену (ЕМА), цитокератинам, опухоль-ассоциированному гликопротеину 12 (TAG12). Иммуноцитохимия позволяет определить 1–2 опухолевые клетки на 1 млн нетрансформированных. Таким образом, это один из самых точных методов идентификации микрометастазов.

К недостаткам данного метода можно отнести вероятность получения ложноположительных результатов, так как известно, что некоторые ранние миелоидные клетки и некоторые лимфоидные клетки костного мозга несут на себе ЕМА. Помимо этого, в костном мозге здоровых людей встречаются единичные клетки, несущие СК18 [17]. Иммуногистохимия сходна с иммуноцитохимией, но в данной методике происходит окрашивание тканей, а не отдельных клеток. Однако гистологическое окрашивание более трудоемко и требует более длительного времени, вследствие чего данная методика не подходит для экспресс-диагностики единичных опухолевых клеток.

В исследовании В.В. Родионова и соавт. [6] были включены 50 больных РМЖ. Метастатический процесс отмечен у 37 из них, у 19 обнаружены микрометастазы в костном мозге. С использованием гистологического метода микрометастазы в костный мозг выявлены у 10 больных, а с помощью цитологического — у 5. Авторы отмечают, что наибольшую чувствительность показал именно метод иммуноцитохимии, с его помощью в 12 из 19 образцов были обнаружены единичные опухолевые клетки. Положительными считались образцы при наличии 1 опухолевой клетки на 1 млн миелокариоцитов [17].

Метод клеточных культур

При данной методике в питательную среду помещают образцы, полученные с помощью биопсии. Нетрансформированные клетки костного мозга не будут делиться в непривычных для себя условиях. Поэтому получение вторичных колоний позволяет говорить о наличии в образце опухолевых клеток [17].

Метод CellSearch

Одним из наиболее современных методов диагностики ЦОК является система CellSearch. Метод активно используется для обнаружения ЦОК в периферической крови во время лечения (он позволяет идентифицировать 5 опухолевых клеток в 7,5 мл цельной крови, что свидетельствует о высокой чувствительности). Определение микрометастазов с помощью метода CellSearch выполняется в 2 этапа: обогащение клеток магнитными наночастицами, конъюгированными со специфическими антителами, и детекция этих клеток на специальном приборе или на флуоресцентном микроскопе. Для определения клеток эпителиального происхождения используют СК8, СК18, СК19 и EpCAM. После связывания клеток с наночастицами их окрашивают 4,6-диамидино-2-фенилиндолом дигидрохлоридом (DAPI). Идентификацию клеток проводят на приборе CellTracks Analyzer II, который представляет собой флуоресцентный микроскоп, способный к воссозданию изображений клеток. Опухолевыми клетками принято считать клетки, которые несут на себе СК8, СК18, СК19 и EpCAM, но не несут CD45 [18]. В настоящее время получены данные об идентификации трансформированных клеток при метастатическом раке предстательной железы, метастатическом РМЖ, метастатическом колоректальном раке. Результаты проведенных исследований [18, 19] показали, что наличие микрометастазов в периферической крови является прогностически неблагоприятным фактором [19].

Заключение

Сегодня существует несколько различных методов идентификации микрометастазов в костном мозге и периферической крови. При этом наиболее часто используемыми, несмотря на их трудоемкость, остаются иммуноцитохимия и иммуногистохимия. Тем не менее продолжают поиск, разработка и совершенствование методов идентификации микрометастазов, поскольку их роль в течении заболевания до сих пор не однозначна, и в настоящее время проводятся интенсивные исследования по определению микрометастазов и изучению их прогностической значимости.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Тупицын Н.Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников. Онкогинекология 2013;(1):12–8. [Tupitsyn N.N. Circulating and disseminated tumor cells in breast cancer and ovarian cancer. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2013;(1):12–8. (In Russ.)].
2. Balbi G., Manganaro M.A., Monteverde A. et al. Ovarian cancer: lymph node metastases. Eur J Gynaecol Oncol 2009;30(3):289–91.
3. Бжадуг О.Б. Рак молочной железы. Значение выявления микрометастазов в периферической крови и костном мозге. Иммунология гемопоеза 2005;(4):48–59. [Bzhadug O.B. Breast cancer. The value of micrometastases detection in peripheral blood and bone marrow. Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology 2005;(4):48–59. (In Russ.)].
4. Hwang K.Y., Yoon Y.I., Hwang S. et al. Survival analysis following resection of AJCC stage III gallbladder carcinoma based on different combinations of T and N stages. Korean J Hepatobiliary Pancreat Surg 2015;19(1):11–6.
5. Wang L., Wang Y., Liu Y. et al. Flow cytometric analysis of CK19 expression in the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection. J Exp Clin Cancer Res 2009;28:57.
6. Родионов В.В., Тупицын Н.Н., Богомолова О.А. и др. Диагностика диссеминированных опухолевых клеток рака молочной железы в костном мозге с помощью метода проточной цитометрии. Фундаментальные исследования 2013;(3):147–51. [Rodionov V.V., Tupitsyn N.N., Bogomolova O.A. et al. Diagnosis of disseminated breast cancer tumor cells in bone marrow by flow cytometry. Fundamental'nye issledovaniya = Basic Research 2013;(3):147–51. (In Russ.)].
7. Бжадуг О.Б., Тюляндин С.А., Гривцова Л.Ю. и др. Клиническое значение определения циркулирующих опухолевых клеток в крови больных распространенным раком молочной железы. Иммунология гемопоеза 2007;(2):72–102. [Bzhadug O.B., Tyulyandin S.A., Grivtsova L.Yu. et al. Clinical significance of circulating tumor cells in patients with advanced breast cancer. Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology 2007;(2):72–102. (In Russ.)].
8. Чигринова Е.В., Бокин И.И., Жордания К.И. и др. Микрометастазы в костном мозге у больных раком яичников – новая проблема? Опухоли женской репродуктивной системы 2007;(1–2):59–63. [Chigrinova E.V., Bokin I.I., Zhordaniya K.I. et al. Micrometastases in bone marrow of patients with ovarian cancer – a new problem? Opuhohli zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of the Female Reproductive System 2007;(1–2):59–63. (In Russ.)].
9. Ghossein R., Bhattacharya S., Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. Clin Cancer Res 1999;5(8):1950–60.
10. Aerts J., Wynendaele W., Paridaens R. et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. Ann Oncol 2003;12(1):39–46.
11. Uzawa K., Kasamatsu A., Baba T. et al. Quantitative detection of circulating tumor-derived mitochondrial NADH subunit variants as a potential prognostic biomarker for oral cancer. Int J Oncol 2015;47(3):1077–83.
12. Xenidis N., Markos V., Apostolaki S. et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. Ann Oncol 2007;18(10):1623–31.
13. Wang G.Y., Wang S.J., Li Y. et al. Detecting bone marrow micrometastasis of gastric cancer by magnetic activated cell sorting combined with fluorescent activated cell sorting. Ai Zheng 2005;24(5):605–10.
14. Стилиди И.С., Лебединская О.В., Шубина И.Ж. и др. Выявление микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах онкологических больных с использованием метода иммуномагнитной сепарации. Сибирский онкологический журнал 2007;(1):44–8. [Stilidi I.S., Lebedinskaya O.V., Shubina I.Zh. et al. Detection of micrometastasis in the bone marrow and lymph nodes of cancer patients using immunomagnetic separation method. Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2007;(1):44–8. (In Russ.)].
15. Alix-Panabieres C., Pantel K. Detection and characterization of disseminating cancer cells in patients with solid epithelial malignancies. Haematopoiesis Immunology 2012;(1):78–93.
16. Leong S.P., Peng M., Zhou Y.M. et al. Cytokine profiles of sentinel lymph nodes draining the primary melanoma. Ann Surg Oncol 2002;9(1):82–7.
17. Родионов В.В., Петров С.В. Проблемы костномозгового метастазирования у больных раком молочной железы. Иммунология гемопоеза 2008;(1):38–53. [Rodionov V.V., Petrov S.V. Problems of bone marrow metastasis in patients with breast cancer. Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology 2008;(1):38–53. (In Russ.)].
18. Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med 2004;351(8):781–91.
19. Miller M.C., Doyle G.V., Terstappen L.W. Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast, colorectal and prostate cancer. J Oncol 2010;2010:617421.

Уважаемые читатели!

К сожалению, в № 4 журнала «Онкогематология» за 2015 г. была допущена ошибка на стр. 15. Редакция приносит свои извинения и публикует правильное название и список авторов статьи:

Лечение зрелоклеточных В-клеточных неходжкинских лимфом у детей и подростков с использованием комбинированной иммунохимиотерапии: возможности оптимизации терапевтической стратегии.

Авторы: Н.В. Смирнова¹, Н.В. Мякова¹, М.Б. Белогурова², О.В. Рыскаль³, О.Е. Никонова³, О.П. Хлебникова⁴, Г.Р. Шарাপова⁵, А.С. Федорова⁶, Н.А. Григорьева⁷, А.В. Шамардина⁸, Н.И. Пономарева⁹, Д.С. Абрамов¹, Д.М. Коновалов¹, М.Э. Дубровина¹, А.А. Масчан¹, Е.В. Самочатова¹.

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1; ²СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31»; Россия, 197110, Санкт-Петербург, пр-т Динамо, 3; ³ГБУЗ ПК «Пермская краевая детская клиническая больница»; Россия, 614066, Пермь, ул. Баумана, 22; ⁴ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149, Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32; ⁵БУ ХМАО – Югры «Нижневартовская окружная клиническая детская больница»; Россия, 628609, Нижневартовск, ул. Северная, 30; ⁶ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Минздрава Республики Беларусь; Республика Беларусь, Минская область, дер. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43; ⁷ГБУЗ АО «Архангельская областная детская клиническая больница им. П.Г. Выжлецова»; Россия, 163002, Архангельск, пр-т Обводный канал, 7; ⁸ГБУЗ НО «Нижегородская областная детская клиническая больница»; Россия, 603136, Нижний Новгород, ул. Ванеева, 211; ⁹ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России; Россия, 117513, Москва, Ленинский пр-т, 117.