

*На правах рукописи*

**ДАНИЛОВА**  
**Анна Борисовна**

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ «УКЛОНЕНИЯ» ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК  
ОТ ИММУННОГО НАДЗОРА В КОНТЕКСТЕ РАЗРАБОТКИ  
СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ  
АКТИВНОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия  
3.2.7. Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, доцент **Балдуева Ирина Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Чердынцева Надежда Викторовна** – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Научно-исследовательский институт онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения "Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук", заведующий лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, заместитель директора по научной работе (Томск)

**Заботина Татьяна Николаевна** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией клинической иммунологии и инновационных технологий (Москва)

**Самойлович Марина Платоновна** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией гибридной технологии (Санкт-Петербург)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Обнинск)

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, на сайте: <https://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 21.1.033.01  
доктор медицинских наук

**Филатова Лариса Валентиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Иммунотерапия злокачественных опухолей – одна из наиболее бурно развивающихся областей онкологии, которая базируется на открытиях последних десятилетий в биологии и иммунологии, позволивших объяснить различные механизмы клеточных и гуморальных иммунных реакций, а также выявить целый ряд клеток и биологически активных веществ, при помощи которых эти реакции осуществляются, в том числе при опухолевом росте [Perez-Gracia J.L. et al., 2014; Parcesepe P. et al., 2016; Ozga A.J. et al., 2021]. Не вызывает сомнений, что именно биологические особенности опухоли определяют гетерогенность иммунологического ответа на опухолевые антигены, различную чувствительность опухолевых клеток к действию клеток-эффекторов, различия в интенсивности ингибирующего влияния опухоли на иммунокомпетентные клетки и, как следствие, на различную чувствительность к иммунотерапии, химиотерапии, лучевой терапии [Karasaki T. et al., 2017; Massagué J., Ganesh K., 2021; Desai R. et al., 2022; Lv B. et al., 2022].

В настоящее время развивается концепция «иммунного редактирования опухоли» («cancer immunoediting»), динамического процесса, отражающего взаимоотношения опухоли и иммунной системы, когда в результате иммунного контроля выживают лишь те опухолевые клетки, которым удастся приобрести механизмы устойчивости, позволяющие «избегать» воздействия клеток иммунной системы. Активная специфическая иммунотерапия развивается параллельно с развитием теории о механизмах иммунного контроля, толерантности опухоли к воздействиям иммунной системы как феномена «уклонения», обеспечивающего ее прогрессию [Gang W. et al., 2018; Jenkins R.W. et al., 2018; Seliger B., Massa C., 2021; Desai R. et al., 2022; Wilczyński J.R., Nowak M., 2022].

Первоначально возникающие трансформированные клетки могут быть устранены клетками-эффекторами иммунной системы, такими как НК-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты. Однако процесс элиминации трансформированных клеток приводит к иммунной селекции и иммунному «редактированию», которые способствуют созданию клонов опухолевых клеток с меньшей иммуногенностью, обладающих возможностями аутокринной регуляции их роста, приобретения подвижности и инвазивных свойств, секретирующих целый спектр молекул, способных блокировать активность иммунокомпетентных клеток. В итоге во время опухолевой прогрессии, когда опухоль достигает размеров, обнаруживаемых клиническими методами, растворимые факторы, секретируемые клетками опухоли, могут создавать в опухолевом микроокружении (ТМЕ, «tumour microenvironment») благоприятные условия для «уклонения» от воздействия иммунной системы [Hui L., Chen Y., 2015; Arneth B., 2019; Hanahan D., 2022; Aktar N. et al., 2022]. В некотором смысле опухоль можно рассматривать как некую многокомпонентную «экосистему», в которой малигнизированные клетки оптимизируют ресурсы микроокружения для создания наилучших условий их пролиферации [Maley C.C. et al., 2017; Sleeboom J.J.F. et al., 2018; Lv B. et al., 2022]. ТМЕ представлено большим количеством разнообразных клеточных элементов, среди которых основными являются клетки иммунной системы, стромальные клетки и клетки, формирующие кровеносные сосуды [Hanahan D., 2022]. Благодаря многочисленным экспериментальным данным уже показана важная роль нейтрофилов, лимфоцитов, НК-клеток, макрофагов, фибробластов, эндотелиоцитов и перицитов в процессах опухолевого роста [Dumitru C.A. et al., 2013; Belli C. et al., 2018]. Накопление данных о жизнедеятельности ТМЕ формирует представление о сложных реципрокных взаимодействиях между всеми типами клеток в этом пространстве [Adjei I.M., Blanka S., 2015; Belli C. et al., 2018; Denk D., Greten F.R. et al., 2022]. Более детальное понимание механизмов «уклонения» от воздействия иммунной системы, реализуемых злокачественными клетками во взаимодействии с ТМЕ, имеет большое значение для разработки критериев отбора пациентов, которым показана активная специфическая иммунотерапия, для развития методологии создания клеточных противоопухолевых вакцин, обладающих достаточной клинической и иммунологической эффективностью, а также для совершенствования и создания новых методов иммунотерапии злокачественных новообразований.

### Степень разработанности темы

Несмотря на то, что, начиная с конца XIX века, процессы туморогенеза и эволюции злокачественных новообразований находятся под пристальным вниманием ученых, закономерности функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста, биологические свойства неоплазий, позволяющих «избегать» иммунного контроля и создавать условия для дальнейшей прогрессии и диссеминации в организме человека, по-прежнему, нуждаются в дальнейшей детализации и изучении. За последние десятилетия произведены концептуальные разработки в рамках теории иммунного «редактирования» опухоли, которые продемонстрировали, что иммунная система способна оказывать ингибирующее влияние на онкологический процесс и в то же время способствовать развитию и диссеминации опухоли [Kim R. et al., 2005, 2006; Schreiber R.D. et al., 2011; Mittal D. et al., 2014; O'Donnell J.S. et al., 2019; Starzer A.M. et al., 2022]. События, связанные с феноменом иммуноредактирования злокачественных новообразований, происходят во время их естественного прогрессирования, и вместе с тем исследования результатов применения различных методов противоопухолевой иммунотерапии показывают, что этот процесс частично или полностью повторяется в ответ на лечение [Teng M.W. et al., 2015; Desai R. et al., 2022; Bai R., Cui J., 2022]. На сегодняшний день успехи противоопухолевой иммунотерапии очевидны, однако первичная и приобретенная в ходе терапевтического воздействия иммунорезистентность остается серьезным препятствием [O'Donnell J.S. et al., 2017; Sharma P. et al., 2017; Hegde P.S., Chen D.S., 2020].

Первичная резистентность связана с отсутствием объективного ответа на иммунотерапию и может возникать в случае системной иммуносупрессии или при наличии злокачественного новообразования, клетки которого экспрессируют мало молекул, распознаваемых иммунной системой как чужеродные (опухоль с низкой мутационной нагрузкой) [Sharma P. et al., 2017; Kim T.K. et al., 2022]. В то же время иммуносупрессивные механизмы, которые делают возможным «ускользание» опухолевых клеток от иммунного надзора, могут предотвращать активацию иммунной системы в процессе иммунотерапии, что индуцирует формирование устойчивости опухолевых клеток к последующим воздействиям [Schultz L., Gardner R., 2019; Sun J.Y. et al., 2020]. Чтобы повысить эффективность противоопухолевой иммунотерапии, расширить диапазон опухолей, которые будут чувствительны к иммунотерапии, и когорту пациентов, которым показаны эти методы лечения, необходимо полностью изучить уже в некоторой степени известные механизмы и обнаружить еще неизвестные закономерности, благодаря которым малигнизированные клетки проявляют устойчивость к иммунологическим реакциям или развивают иммунорезистентность в процессе терапии.

В 2013 г. D.S. Chen и I. Mellman предложили концепцию «противоопухолевого иммунного цикла», который они рассматривали как динамический пространственно-временной процесс, функционирование которого нарушено у больных злокачественными новообразованиями и должно быть инициировано или реинициировано с помощью противоопухолевой иммунотерапии [Chen D.S., Mellman I., 2013].

В настоящее время изучаются внутренние причины нарушения иммунного цикла и уже накоплены данные о роли ТМЕ, сложной, постоянно меняющейся системы, состоящей из стромы, имеющей элементы собственного кровоснабжения, лимфатической системы, клеток иммунной системы и внеклеточного матрикса [Khalaf K. et al., 2021; Starzer A.M. et al., 2022]. Все эти компоненты, в том числе нормальные и злокачественные клетки, создают иммунодепрессивную среду с дефицитом питательных веществ, благоприятную для роста, пролиферации, фенотипической пластичности и вариабельности опухолевых клеток [Khalaf K. et al., 2021; Benboubker V. et al., 2022]. Взаимодействие опухолевых клеток с экстрацеллюлярным матриксом индуцирует высвобождение растворимых факторов, ответственных за «уклонение» от воздействия иммунной системы и ремоделирование внеклеточного матрикса, что способствует возникновению метастатического процесса и создает дополнительные условия для формирования иммунорезистентности [Aldea M. et al., 2021].

В контексте существующих данных совершенствование и разработка иммунотерапевтических подходов должна базироваться на использовании в доклинических

исследованиях клеточных моделей, максимально приближенных к реальной клинической ситуации [Kitaeva K.V. et al., 2020]. Для эффективных исследований *in vitro* необходимо создание и развитие банков биологических образцов онкологических больных, в том числе коллекций культур клеток злокачественных новообразований, охарактеризованных с использованием современных методов исследований на клеточном и субклеточном уровнях. Клеточное моделирование может стать основой для выявления предиктивных и прогностических факторов, позволяющих предсказать течение болезни и выбрать персонализированную терапию, оптимальную для конкретных пациентов.

Это определяет необходимость дальнейшего сравнительного изучения свойств клеток злокачественных новообразований различного гистогенеза с использованием методов культивирования *in vitro*, позволяющих оценивать реализацию феномена «уклонения» малигнизированных клеток от воздействия клеток иммунной системы и выявлять факторы, препятствующие развитию полноценного противоопухолевого иммунного ответа.

### **Цель**

Изучение закономерностей биологической изменчивости свойств злокачественных клеток, способствующих опухолевой прогрессии, и их экспериментальное обоснование как основа для развития перспективной методологии создания клеточных противоопухолевых вакцин.

### **Задачи**

1. Получить культуры опухолевых клеток из образцов первичных, рецидивирующих, метастатических солидных опухолей пациентов

2. Произвести анализ изменений антигенного фенотипа и пролиферативной активности злокачественных клеток, выделенных из образцов солидных опухолей пациентов, в процессе их длительного культивирования *in vitro*, включая дифференцировочные антигены, раково-тестикулярные антигены (РТА) и антигены главного комплекса гистосовместимости.

3. Оценить продукцию культивируемыми опухолевыми клетками факторов, направленных на поддержание процессов иммуносупрессии, ангиогенеза, инвазии, метастазирования (ИСФ).

4. Исследовать влияние пространственной организации клеточных моделей на секреторный профиль опухолевых клеток, ассоциированный с формированием иммуносупрессивного микроокружения, и их инвазивный потенциал.

5. Оценить роль антигенных и секреторных свойств опухолевых клеток в реализации феномена «ускользания» от воздействия клеток иммунной системы в экспериментах *in vitro*, моделирующих миграцию и инвазию малигнизированных клеток, миграцию дендритных клеток (ДК), взаимодействие с цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ).

6. Исследовать роль ИСФ, продуцируемых опухолевыми клетками, как потенциальных биомаркеров прогноза и эффективности клеточной иммунотерапии у больных злокачественными новообразованиями.

### **Научная новизна исследования**

1. Создана уникальная коллекция охарактеризованных индивидуальных клеточных линий меланомы кожи (МК), сарком мягких тканей и остеогенных сарком (СМТ/ОС) и опухолей эпителиального происхождения (ЭО), которые могут быть использованы в качестве экспериментальных моделей в доклинических исследованиях.

2. Обнаружено сходство изменений антигенного фенотипа клеток МК, СМТ/ОС, ЭО в процессе длительного культивирования, приводящих к обеднению презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА) и антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса (Human Leukocyte Antigens, HLA I класса), появлению антигенов HLA II класса, усилению пролиферативных и инвазивных свойств, с наблюдаемыми в реальной клинической практике.

3. Выявлена способность культивируемых клеток солидных опухолей синтезировать и секретировать в окружающую среду широкий спектр ИСФ, которая становится более выраженной при длительном культивировании. Обнаружено, что трехмерная пространственная организация клеточной модели *in vitro* способствует усилению секреторных функций культивируемых опухолевых клеток, связанных с формированием иммуносупрессивного микроокружения.

4. Установленное сходство профиля экспрессии раково-тестикулярных генов (РТГ) в клетках солидных опухолей разного гистогенеза позволяет использовать культивируемые клетки МК как источник раково-тестикулярных антигенов (РТА) в клеточной иммунотерапии. Создан новый универсальный клеточный продукт для нагрузки и активации ДК *in vitro* (патент № 2714208 от 13.02.2020).

5. Созданы новые клеточные модели, которые можно использовать для оценки миграционного и инвазивного потенциала клеток солидных опухолей, воздействия свойств малигнизированных клеток на активность антиген-презентирующих клеток и ЦТЛ (патенты №№ 2395573 и 2395571 от 27.07.2010, № 2642265 от 24.01.2018, №№ 2650757 и 2650759 от 17.04.2018, №№ 2673729 и 2675541 от 22.11.2018, №№ 2742244 и 2742245 от 04.02.2021, № 2722867 от 04.06.2020, № 2740800 от 21.01.2021, № 2779948 от 15.09.2022).

6. Создана модель, которая позволяет визуализировать процесс киллинга и выживаемости клеток солидных опухолей после взаимодействия с ЦТЛ *in vitro*, провести количественный и качественный анализ эффективности этого взаимодействия и может внести существенный вклад для предварительной оценки оправданности применения тех или иных подходов при создании новых противоопухолевых вакцин.

7. Обнаружена высокая предиктивная и прогностическая ценность данных о продукции культивируемыми опухолевыми клетками ИСФ для клеточной иммунотерапии, что позволяет их использовать в качестве прогностических и предиктивных факторов, которые могут применяться при планировании лекарственного лечения.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Созданная коллекция охарактеризованных клеточных культур солидных опухолей стала неотъемлемой частью Банка биологических образцов однотипно пролеченных больных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, существование которого значительно расширяет возможности проведения доклинических исследований. Получены свидетельства интеллектуальной собственности на создание и применение клеточных линий опухолей различного гистогенеза.

Обнаруженные общие закономерности эволюции антигенного профиля и метаболических особенностей клеток солидных опухолей в процессе длительного культивирования, зависимость секреторных свойств малигнизированных клеток от пространственной организации модели позволяют более адекватно подходить к вопросу клеточного моделирования с целью создания условий, максимально приближенных к реальной клинической ситуации.

Данные о сходстве профиля экспрессии РТГ клетками различных солидных опухолей позволили разработать клеточные модели, с помощью которых была показана принципиальная возможность универсального использования лизатов культивируемых клеток МК для нагрузки и активации ДК. Создан и запатентован для внедрения в клиническую практику новый клеточный продукт для активации вакцинных ДК.

Взаимосвязь экспрессии генов *PRAME*, *PASDI*, *SSX1* и продукции ИСФ, таких как интерлейкины (IL) IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, MICA, VEGF, с инвазивным потенциалом опухолевых клеток и реализацией феномена «ускользания» от воздействия клеток-эффекторов позволяет рассматривать эти факторы как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

Обнаруженная прогностическая и предиктивная значимость продукции ИСФ культивируемыми опухолевыми клетками пациентов позволяет использовать установленные закономерности как критерий выбора способа клеточной иммунотерапии для пациентов со злокачественными новообразованиями.

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность отдела онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФГБНУ «ФИЦ КНЦ СО РАН», КНЦ СО РАН (акты внедрения от 22.03.2023 и 05.03.2023).

### Методология и методы исследования

Объектом исследования служили культивируемые клетки солидных опухолей, полученные из интраоперационного материала пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2001–2019 гг. Был использован биологический материал 826 больных: образцы опухолевой ткани (826), супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток (1912), образцы периферической крови пациентов (84), фракции клеток крови после лейкофереза (32). Аналитический этап исследования предполагал сравнительное изучение морфологии, пролиферативной активности, миграционных и инвазивных свойств клеток солидных опухолей, их антигенного фенотипа и секреторного профиля. Экспериментальное исследование включало создание трехмерных систем, кокультивирования опухолевых клеток и клеток иммунной системы. Исследование ИСФ, продуцируемых опухолевыми клетками, как биомаркеров прогноза и эффективности методов активной специфической клеточной иммунотерапии было проведено с использованием данных 88 больных диссеминированной МК и рака почки (РП), получавших вакцину на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном *tag7/PGRP-S* (ГМВ), и 116 пациентов с МК, РП, СМТ/ОС, получавших вакцину на основе аутологичных активированных ДК (ДКВ).

Работа была проведена в научном отделе онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (зав. д.м.н. Балдуева И.А.). В работе применяли методы культивирования клеток, иммуноцито- и гистохимические, молекулярно-биологические методы, мультиплексный и иммуноферментный анализ, проточную цитофлуорометрию, методы клеточного моделирования, статистические методы обработки и анализа полученных данных.

### Положения, выносимые на защиту

1. Создана коллекция охарактеризованных культур клеток солидных опухолей, насчитывающая 575 образцов, эффективность перевода опухолевых клеток в культуру составила 67,41%; в результате длительного культивирования получено 110 (13,63%) клеточных линий злокачественных новообразований, обладающих стабильными пролиферативными характеристиками.

2. На ранних пассажах ( $\leq 10$ ) *in vitro* имеет место преимущественное сохранение иммунофенотипического профиля исходной опухолевой ткани, что позволяет использовать культивируемые малигнизированные клетки в качестве клеточных моделей для решения задач доклинических исследований. В процессе длительного культивирования установлен факт изменчивости презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА) клетками солидных опухолей, приводящей к обеднению специфического антигенного профиля и HLA I класса, появления молекул HLA II класса, усиления презентации антигенов, ассоциированных с процессами пролиферации, инвазии и метастазирования.

3. В культивируемых клетках солидных опухолей наблюдается гиперэкспрессия РТГ, при этом существует сходство профилей экспрессии этих генов клетками МК, СМТ/ОС и ЭО. В клетках МК выявлена транскрипционная активность 10 РТГ, что является основанием для их использования в качестве источника РТА в клеточной иммунотерапии на основе активированных ДК.

4. Сходство профиля РТА культивируемых клеток МК, СМТ/ОС, ЭО позволило отобрать стабильные клеточные линии МК с гиперэкспрессией РТГ и создать новый клеточный продукт для нагрузки и активации ДК IRTAN-2018.

5. В культивируемых клетках солидных опухолей наблюдается гиперпродукция ИСФ, которая увеличивается в процессе длительного культивирования ( $>20$  пассажа).

6. Пространственная организация клеточной модели *in vitro* оказывает влияние на метаболические и секреторные функции культивируемых клеток солидных опухолей, связанные с формированием иммуносупрессивного микроокружения.

7. Инвазивные свойства культивируемых клеток МК и СМТ/ОС связаны с экспрессией РТГ *PRAME*, *PASD1*, *SSX1*, продукцией факторов HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8,

которые возможно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

8. Факторы TGF- $\beta_1$ , IL-10, VEGF-A, EGF, FGF, HGF, синтезируемые опухолевыми клетками, оказывают ингибирующее воздействие на подвижность ДК в модельной системе *in vitro*.

9. ЦТЛ, генерированные в присутствии ДК, активированных препаратом IRTAN-2018, проявляют цитолитическую активность по отношению к клеткам СМТ/ОС, при этом выявлена корреляция с экспрессией генов *PRAME* ( $\rho=0,676$ ,  $p=0,005$ ), *PASDI* ( $\rho=0,522$ ,  $p=0,046$ ). Присутствие в секреторном профиле малигнизированных клеток IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta_1$ , MICA, VEGF ассоциировано с индексом их жизнеспособности в экспериментальной модельной системе.

10. Установлен факт высокой предиктивной и прогностической ценности продукции опухолевыми клетками ИСФ для специфической клеточной иммунотерапии. Выявлен диапазон концентраций TGF- $\beta_1$  от 1,4 до 3,0 нг/мл, пороговые концентрации MICA 574,7 пг/мл и IL-10 10,5 пг/мл в супернатантах опухолевых клеток пациентов, определяющие благоприятный прогноз. Уровни TGF- $\beta_1$  и MICA оказались значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости (ОВ) пациентов с МК, получавшими клеточную иммунотерапию. При анализе времени до прогрессирования (ВДП) значимым фактором являлся VEGF.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Значительный объем данных, длительный период наблюдения, применение адекватных методов исследования, публикация материалов в реферируемых изданиях определяет достоверность полученных результатов.

Реагенты, расходные материалы, приборы, использованные в работе, являются сертифицированными продуктами отечественных и зарубежных компаний. Оценка достоверности результатов проведена с использованием соответствующих методов статистической обработки данных. Методы, разработанные в рамках данного исследования, используются в работе отдела онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Материалы диссертации были представлены на I Всероссийской научно-практической конференции «Биотерапия рака», Москва, 2002; 14th International congress on anti-cancer treatment, Paris, France, 2003; Конференции «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия», Санкт-Петербург, 2004; I Российско-американской конференции «Биотехнология и онкология», Санкт-Петербург, 2005; Российской научно-практической конференции с международным участием «Новые технологии в онкологической практике», Барнаул, 2005; Конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения», Санкт-Петербург, 2005, 2012; VII, VIII, IX, XI Всероссийском форуме с международным участием им. акад. Иоффе В.И. «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 2003, 2004, 2005, 2007; V съезде онкологов и радиологов СНГ, Ташкент, 2008; VII съезде онкологов России, Москва, 2009; VI съезде онкологов и радиологов стран СНГ, Душанбе, 2010; Всероссийской научно-практической конференции «Организационные вопросы реализации Национальной онкологической программы в Российской Федерации», Казань, 2011; ASCO Annual Meeting, Chicago, USA, 2012, 2013, 2017, 2019; Annual Meeting of the French Society for Immunology, Paris, France, 2013; Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению», Екатеринбург, 2013, 2014, 2016; Perspectives in Melanoma XVIII, Dublin, Ireland, 2014; I, II, III, IV, V, VI, VII Российском онкологическом форуме с международным участием «Белые ночи», Санкт-Петербург, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021; BIT's Annual World Cancer Congress, Shanghai, China, 2016; The second international conference «Cell technologies at the edge: from research to practice "Translational research in cell therapy"», Moscow, 2018; V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 2019; на Конференции Ассоциации специалистов по проблемам меланомы «Меланома и опухоли кожи», 2021.

### **Внедрение результатов исследования**

Работа проведена в соответствии с планом основных научно-исследовательских направлений отдела онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Результаты работы были внедрены в научно-



практическую деятельность научного отдела онкоиммунологии и в клиническую практику ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (акт внедрения от 22.03.2023); в научно-практическую деятельность лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера ФГБНУ «ФИЦ КНЦ СО РАН», КНЦ СО РАН (акт внедрения от 05.03.2023).

### **Личный вклад автора**

Автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, проведено планирование исследования и разработан его дизайн, выполнены работы по выделению, получению и культивированию клеток солидных опухолей, их характеристике, идентификации ОАА, выявлению ИСФ. Автор также самостоятельно разработала 2D- и 3D-клеточные модели, позволяющие изучать миграционные и инвазивные свойства опухолевых клеток, подвижность антигенпрезентирующих клеток, цитолитические свойства специфически активированных ЦТЛ. При непосредственном участии автора проводилось исследование с помощью мультиплексного анализа и проточной цитофлуорометрии, был осуществлен статистический анализ результатов исследований. Все полученные результаты были самостоятельно подготовлены для публикаций и представления на различных научно-практических мероприятиях.

### **Соответствие диссертации паспорту научных специальностей**

Основные результаты работы, научные положения и выводы, описанные в диссертационной работе, соответствуют п. 2 (исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.) паспорта специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки) и п. 3 (изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты) паспорта специальности 3.2.7. Иммунология (биологические науки)

### **Публикации**

Основное содержание работы изложено в 75 печатных работах, из них 29 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук, из которых 27 — в изданиях международной реферативной базы данных и системы цитирования. Получено 13 патентов на изобретение РФ, два свидетельства о регистрации баз данных. Подготовлено одно учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа имеет традиционное построение, изложена на 368 листах машинописного текста, состоит из введения, глав литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, раздела «Перспективы разработки темы», списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 832 источника, из которых 818 — на английском языке. Текст иллюстрирован 45 таблицами и 84 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Исследование было выполнено на биологическом материале 826 больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2001–2019 гг. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НМИЦ, все пациенты подписали информированное согласие. Образцы опухолевой ткани хранили в соответствии с принципами Хельсинской декларации и использовали согласно Закону о тканях человека от 2004 г. В качестве материала для экспериментального исследования были использованы образцы опухолевой ткани (465 – МК, 161 – РП, 121 – СМТ/ОС, 46 – рак молочной железы (РМЖ), 15 – рак предстательной железы (РПЖ), 55 – рак мочевого пузыря (РМП), 17 – колоректальный рак (КРР), 13 – рак яичников (РЯ), распределение образцов по локализациям представлено в табл. 1; супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток; образцы периферической крови пациентов; компоненты периферической крови после лейкофереза.

Таблица 1 – Распределение образцов опухолей по локализациям

Тип образца	МК, n	РП, n	СМТ, n	РМЖ, n	РПЖ, n	РМП, n	КРР, n	РЯ, n
Первичная опухоль	57	140	25	35	14	2	0	1
Рецидив	19	5	28	1	0	53	0	4
Метастаз, в т. ч.	389	16	68	10	1	0	17	8
Лимфатические узлы	260	–	12	7	–	–	6	2
Мягкие ткани	98	4	20	2	–	–	–	–
Легкое	14	11	25	–	–	–	1	–
Печень	6	1	–	1	1	–	1	–
Селезенка	2	–	–	–	–	–	–	–
Головной мозг	5	–	1	–	–	–	1	–
Средостение	2	–	–	–	–	–	–	–
Сердце	–	–	–	–	–	–	–	1
Молочная железа	3	–	1	–	–	–	–	1
Плевра	–	–	1	–	–	–	–	–
Брюшная стенка	–	–	–	–	–	–	7	1
Асцитная форма	–	–	1	–	–	–	1	1
Брыжейка	–	–	–	–	–	–	–	2
Неорганные забрюшинные метастазы	–	–	7	–	–	–	–	–

Для оценки клинической значимости продукции ИСФ опухолевыми клетками был осуществлен дополнительный анализ исследований, проводившихся с 2001 по 2014 год в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, в рамках которых было пролечено 204 пациента с местно-распространенными и диссеминированными формами МК, РП, СМТ. Исследования проводились при поддержке гранта Правительства Москвы с участием Института биологии гена РАН под руководством академика РАН Г.П. Георгиева.

Критерии включения больных: участие в одной из программ исследований: «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний» на 2001–2003 гг., «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2004–2009 гг., «Клиническое исследование противоопухолевых вакцин» на 2010–2012 гг., «Autologous Dendritic Cell Vaccine in Patients With Soft Tissue Sarcoma (ADCVCTAST)» ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01883518 2013–2014 гг., наличие культуры аутологичных опухолевых клеток, морфологически верифицированного

диагноза МК, РП, СМТ, проведение вакциотерапии (ДКВ или ГМВ), получение письменного информированного согласия.

Всего в исследование включено 99 пациентов, из них 77 больных МК, 10 пациентов с РП, 12 – с СМТ/ОС, при этом 56 (56,6%) больных получило ДКВ, 43 пациента (43,4%) – ГМВ. Характеристика больных представлена в табл. 2. Средний возраст пациентов составил 52 г. (12–77). Большинство пациентов (76/86%) имели отдаленные метастазы.

Таблица 2 – Характеристика больных, включенных в исследование прогностической роли продукции ИСФ опухолевыми клетками

Характеристика пациентов	ДЭ	НДЭ	Всего	p
Всего больных, n	40	59	99	
Пол, n (%):				
Женский	28 (70,0)	35 (59,3)	63 (63,6)	0,278
Мужской	12 (30,0)	24 (40,7)	36 (36,4)	
Возраст, лет				
Медиана	52	52	52	0,401
Диапазон	16–73	21–77	12–77	
Стадия, n (%):				
1	2 (5,0)	3 (5,1)	5 (5,1)	0,171
2	11 (27,5)	20 (33,9)	31 (31,3)	
3	17 (42,5)	13 (22,0)	30 (30,3)	
4	10 (25,0)	23 (38,0)	33 (33,3)	
Тип опухоли, n (%):				
рак почки	7 (17,5)	3 (5,1)	10 (10,1)	0,124
меланома кожи	28 (70,0)	49 (83,1)	77 (77,8)	
саркома	5 (12,5)	7 (11,9)	12 (12,1)	
Лечение, n (%):				
ДКВ	18 (45,0)	38 (64,4)	56 (56,6)	0,056
ГМВ	22 (55,0)	21 (35,6)	43 (43,4)	
Характер терапии, n (%):				
Адьювантная	22 (55,0)	25 (42,4)	47 (47,5)	0,217
Самостоятельная	18 (45,0)	34 (57,6)	52 (52,5)	

*Примечание:* ДЭ – достаточный эффект терапии; НДЭ – недостаточный эффект терапии; ГМВ – вакцина на основе аутологических опухолевых клеток, модифицированных геном *tag7/PGRP-S*; ДКВ – вакцина на основе аутологических активированных дендритных клеток.

Для анализа различий по изучаемым ИСФ больные были классифицированы как имеющие достаточный (ДЭ) или недостаточный (НДЭ) эффект терапии. Под достаточным эффектом понимали отсутствие прогрессирования в течение 6 мес. – при проведении самостоятельной (паллиативной) терапии и 12 мес. – при проведении адьювантной иммунотерапии.

При сравнении основных характеристик пациентов в группах ДЭ и НДЭ статистически значимых различий распределения больных по полу, возрасту, типу опухоли, стадии заболевания, разновидности клеточной иммунотерапии и характеру лечения не выявлено согласно критерию согласия Пирсона,  $p > 0,05$ .

Корректность разделения групп на ДЭ и НДЭ с использованием выбранных параметров была подтверждена анализом времени до прогрессирования (ВДП) и общей выживаемости (ОВ) больных, где пациенты с ДЭ представляли группу с увеличенными показателями выживаемости: для пациентов с ДЭ медиана ( $M_e$ ) составила 120 мес., с НДЭ – 12 мес.,  $p = 3,4 \cdot 10^{-8}$ , ВДП – 39,2 мес. и 2,6 мес.,  $p = 6,8 \cdot 10^{-9}$ .

Культивирование опухолевых клеток осуществляли, руководствуясь методами Freshney R.I. с собственными модификациями [Данилов А.О. и соавт., 2003; Freshney R.I., 2010]. Для получения 3D-культур использовали метод «висячей капли» и технологию низкоадгезивных поверхностей. Каждые пять пассажей отбирали супернатанты клеточных культур, представляющие собой надосадочную жидкость, производили посев клеток на культуральные стекла (BD Bioscience, США), отбирали не менее  $3 \times 10^6$  клеток для анализа методом проточной цитометрии. После 5 пассажа отбирали образцы клеток для молекулярно-генетического анализа экспрессии РТГ. В качестве контроля использовали культуры фибробластов кожи взрослого человека и фибробластов легкого эмбриона человека (FLECH) (предоставлена КККП ЦИН РАН).

Для оценки популяционной морфологии, кинетики роста и миграции 2D- и 3D-клеточных культур использовали систему наблюдения за живыми клетками Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия). Для оценки пролиферации, жизнеспособности, миграции и инвазии опухолевых клеток применяли автоматический клеточный анализатор в режиме реального времени xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США). Оценку жизнеспособности опухолевых клеток при различных экспериментальных воздействиях проводили также с помощью МТТ-теста с использованием набора Cell Proliferation Kit (МТТ) (Roche, Швейцария). Цитогенетический анализ клеток солидных опухолей проводили согласно рекомендациям Орлова В.Н. и соавт. (1976).

Миелоидные предшественники ДК получали после процедуры лейкафереза или путем забора периферической крови пациентов. Для приготовления культур ДК использовали протокол, разработанный и оптимизированный ранее [Нехаева Т.Л., 2013, 2014]. При приготовлении культуры специфически активированных ЦТЛ руководствовались методом Märten A. et al. (2002). Сортировку клеток осуществляли методом негативной магнитной сепарации с использованием прибора EasySep™ Magnet и набора EasySep™ Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies Inc., Канада).

Для количественного определения содержания ИСФ (MICA, TGF- $\beta_1$ , IL-10, VEGF) использовали метод иммуноферментного анализа в «сэндвич»-варианте (ELISA) с применением наборов MICA Duoset ELISA Kit, R&D Systems, США; Bender MedSystems, Австрия; eBioscience, США. Проводили мультиплексный анализ, используя измерительную систему Bio-Plex® 200 с программным обеспечением Bio-Plex Manager™ v.6.1 (Bio-Rad, США) и панели реагентов, позволяющие определять в биологических жидкостях следующие аналиты:

Панель 1: sCD40L, EGF, endoglin, sFASL, HB-EGF, IGFBP-1, IL-6, IL-8, IL-18, PAI-1, PLGF, TGF- $\alpha$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uPA, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D.

Панель 2: sEGFR, FGF-basic, Follistatin, G-CSF, HGF, Leptin, Osteopontin (OSTP), PDGF-AB/BB, PECAM-1, Prolactin, SCF, sTIE-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2.

Панель 3: хемокины 6Ckine/CCL21, CTACK/CCL27, Eotaxin/CCL11, Eotaxin-2/CCL24, Eotaxin-3 CCL26, I-309 CCL1, MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, MDC/CCL22, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\delta$ /CCL15, MIP-3 $\alpha$ /CCL20, MIP-3 $\beta$ /CCL19, MPIF-1/CCL23, TARC/CCL17, TECK/CCL25, хемокины BCA-1/CXCL13, ENA-78/CXCL5, Fractalkine/CX3CL1, GCP-2/CXCL6, Gro- $\alpha$ /CXCL1, Gro- $\beta$ /CXCL2, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11, MIG/CXCL9, SCYB16/CXCL16, SDF-1 $\alpha$ + $\beta$ /CXCL12, факторы MIF, GM-CSF, интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), интерлейкины IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-16.

Для иммуногистохимических исследований изготавливали парафиновые срезы ткани солидных опухолей, для иммуноцитохимических исследований культивируемые опухолевые клетки высаживали на 8-, 4- и 2-луночные культуральные стекла (BD Falcon, США) и фиксировали ацетоном. Использовали моно- и поликлональные антитела производства Novocastra (ФРГ), Dako Aglient, Abcam, DBS, Santa Cruz Biotechnology, Thermo Fisher Scientific (США).

Определение иммунофенотипа опухолевых клеток, ДК, ЦТЛ производили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США) с программным обеспечением BD FACSDiva v8.0.1.

Производили генотипирование по HLA I класса для подбора комплементарных образцов при экспериментальном моделировании иммунологических взаимодействий и анализировали транскрипционную активность РТГ в культивируемых клетках солидных опухолей.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени генов *GAGE*, *HAGE*, *NY-ESO1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SLLP1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* проводили с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, подобранных на места слияния экзонов исследуемых генов. Синтез праймеров был произведен компанией «Евроген» (Россия). Синтез флуоресцентных зондов – компанией «ДНК-синтез» (Россия). В качестве референсного использовали контрольный ген *ABL*. Анализ РТГ осуществляли на базе лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Производили трехмерное клеточное моделирование для изучения секреторных свойств опухолевых клеток, создавали клеточные модели для изучения подвижности ДК под влиянием опухолеассоциированных ИСФ и для изучения цитотоксических функций ЦТЛ при взаимодействии с малигнизированными клетками.

Статистическая обработка выполнена с использованием IBM SPSS 23, R v.3.5.2. Применяли основные описательные статистики, критерий Шапиро–Уилка, таблицы сопряженности с использованием критерия хи-квадрат и точного теста Фишера. В случае количественных признаков применяли коэффициент ранговой корреляции rho Спирмана.

Определение различий в группах по значениям количественной переменной проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни, критерия Вилкоксона, критерия Краскела–Уоллиса (для межгрупповых сравнений применялся апостериорный тест Данна). Проводили иерархический кластерный анализ, результаты которого визуализировали в формате тепловой карты при помощи пакета «gplots» (v. 3.0.1.1). Были использованы метод пропорциональных рисков Кокса и метод Каплана–Майера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Культивирование клеток солидных опухолей для создания клеточных моделей *in vitro*.

В культуру были переведены клетки из опухолевых образцов от 465 больных МК, 161 – РП, 121 – СМТ, 46 – РМЖ, 15 – РПЖ, 55 – РМП, 17 – КРР, 13 – РЯ. Из них адаптировались к адгезионному или суспензионному росту *in vitro* первичные культуры 431 больного МК, 147 пациентов с РП, 114 – СМТ, 45 – РМЖ, 12 – РПЖ, 37 – РМП, 14 – КРР, 7 – РЯ. Выход жизнеспособных опухолевых клеточных культур, полученных путем автоматической механической дезагрегации, был максимальным для образцов МК и составил 78,3%, минимальным – для образцов КРР и РМЖ (41,2% и 34,8% соответственно) (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты культивирования клеток солидных опухолей

Характеристики	МК	СМТ/ОС	РП	РМЖ	КРР	РМП	РЯ	РПЖ
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Адаптация к росту <i>in vitro</i> , n (% по отношению к числу образцов опухоли)	364 (78,3)	75 (61,9)	102 (63,4)	16 (34,8)	7 (41,2)	23 (41,9)	7 (53,8)	8 (53,3)
<5 пассажей	99	75	63	15	3	23	6	8
5–10 пассажей	157	68	29	7	4	10	4	4
<40 пассажей	154	61	15	2	3	9	1	2
≥ 40 пассажей	69	24	4	1	1	9	1	0
Неудачи в культивировании, n (% по отношению к числу образцов опухоли)	101 (21,7)	46 (38,1)	45 (36,6)	30 (65,2)	10 (58,8)	32 (58,1)	6 (46,2)	7 (46,6)
1. Малое кол-во опухолевого материала, n	18	12	12	20	2	7	0	7

1	2	3	4	5	6	7	8	9
2. Малая жизнеспособность или низкая пролиферативная активность опухолевых клеток, n	60	13	25	8	3	15	5	0
3. Контаминация стромальными элементами, n	9	18	5	2	0	10	1	4
4. Бактериальная контаминация, n	14	3	3	0	5	0	0	3
Выход клеточных культур после 5 пассажа, % (по отношению к числу первичных культур)	43,1	90,6	28,4	43,8	57,1	43,5	57,1	50,0

Из образцов РП было получено 63,4% культур с хорошими пролиферативными характеристиками и высокой жизнеспособностью, из образцов СМТ – 61,9%, РЯ – 53,8%, РПЖ – 53,3%, РМП – 41,9%. Культивирование злокачественных клеток позволило получить опухолевые клеточные субкультуры, обладающие стабильными пролиферативными характеристиками в 157 из 364 (43,1%) случаев для МК, 29 из 102 (28,4%) – РП, 68 из 75 (90,6%) – СМТ/ОС, 7 из 16 (43,8%) – РМЖ, 10 из 23 (43,5%) – РМП, 4 из 7 (57,1%) – КРР, 4 из 7 (57,1%) – РЯ, 4 из 8 (50,0%) – РПЖ.

Морфологически все полученные культуры опухолевых клеток отличались высокой гетерогенностью, в том числе в пределах одного гистологического типа (рис. 1). Из всех образцов опухолей только клетки МК проявляли субстрат-независимый характер роста и обладали адгезионным, полусуспензионным и суспензионным типами роста культуры. Адгезионные культуры МК демонстрировали выраженное разнообразие морфологических типов, культуры, полученные из ЭО, имели полигональные, округлые и/или фибробластоподобные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, клоногенным типом роста и формированием симпластов. Морфология культур клеток СМТ/ОС характеризовалась особенной вариабельностью, что коррелировало с разнообразием гистологических типов.

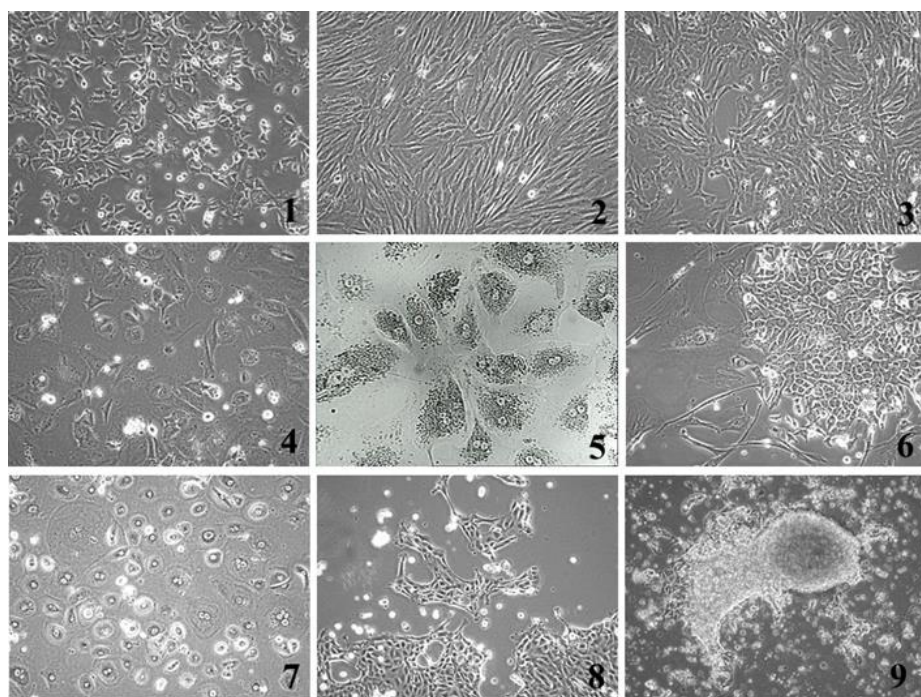


Рисунок 1 – Гетерогенность морфологии культур клеток солидных опухолей. Инвертированный микроскоп Cell-IQ, фазовый контраст, ув.  $\times 100$ :  
 1 – культура МК, #226, 25 пассаж;  
 2 – рабдомиосаркомы #862, 13 пассаж;  
 3 – синовиальной саркомы, #716, 25 пассаж;  
 4 – остеогенной саркомы, #921, 2 пассаж;  
 5 – РП, #266, 10 пассаж;  
 6 – КРР, #485, 12 пассаж;  
 7 – РЯ, #533, 6 пассаж;  
 8 – РМП, #879, 2 пассаж;  
 9 – РМЖ, #973, 25 пассаж

В настоящее время созданию клеточных моделей *in vitro* из фрагментов опухолей больных придается большое значение, так как использование клеточных линий злокачественных новообразований позволяет изучать механизмы, лежащие в основе канцерогенеза и событий на клиническом уровне, таких как терапевтический эффект, резистентность к тому или иному лечебному воздействию, рецидивирование, метастазирование [Arrigoni C. et al., 2016; Krbal L. et al., 2017; Kito F. et al., 2018; Sakumoto M. et al., 2018; Rebecca V.W. et al., 2020; Souto E.P. et al., 2022].

В нашем исследовании количество первичных культур опухолевых клеток составило 807 (90,36%) от общего количества образцов солидных опухолей, подвергнутых автоматической механической дезагрегации (893 образца). В результате их субкультивирования было получено 283 (35,06%) культуры, которые были пассированы не менее 10 раз, количество клеточных линий, прошедших более 40 пассажей, составило 110 образцов (13,63%).

Задепонировано в коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН 26 клеточных линий, запатентовано 12 клеточных линий, представляющих интерес в качестве клеточных моделей для экспериментальных и клинических исследований. Была создана уникальная коллекция индивидуальных клеточных культур солидных опухолей, которая позволила изучать свойства клеток злокачественных новообразований *in vitro* в процессе длительного культивирования.

**Экспрессия ОАА и антигенов HLA I и II класса культивируемыми клетками МК.** Препараты культивируемых клеток МК, выделенных из образцов опухолей больных и длительно пассируемых вне организма (n=364), были изучены на предмет присутствия дифференцировочных антигенов Melan A, Tyros, TRP-1, S100, MITF, gp100, адгезивных молекул CD64, CD146, ассоциированных с процессами метастазирования, раково-тестикулярных антигенов семейства MAGE1, антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса (HLA A/B/C, HLA DQ/DP/DR) и маркера пролиферации Ki-67. Образцы, негативные при определении изучаемых ОАА и/или положительные при применении антител, выявляющих фибробласты, были исключены из анализа (n=17). Тридцать четыре клеточные культуры было получено из образцов первичной опухоли, 14 – из рецидива опухоли и 299 – из метастатических образцов. На начальных этапах культивирования ( $\leq 10$  пассаж) культуры метастатического происхождения характеризовались более выраженной презентацией антигенов HLA DP/DQ/DR, большим количеством Ki-67<sup>+</sup>-клеток и меньшим количеством S100<sup>+</sup>-клеток по сравнению с клетками, полученными из первичных опухолей и рецидивов (p<0,05).

Длительное культивирование клеток МК *in vitro* приводило к значительному снижению присутствия исследуемых антигенов. В результате культивирования к 100 пассажиру только 16 клеточных линий МК сохранило экспрессию всех исследуемых ОАА (4,61%), и 11 – молекул HLA I класса (3,17%) (рис. 2).

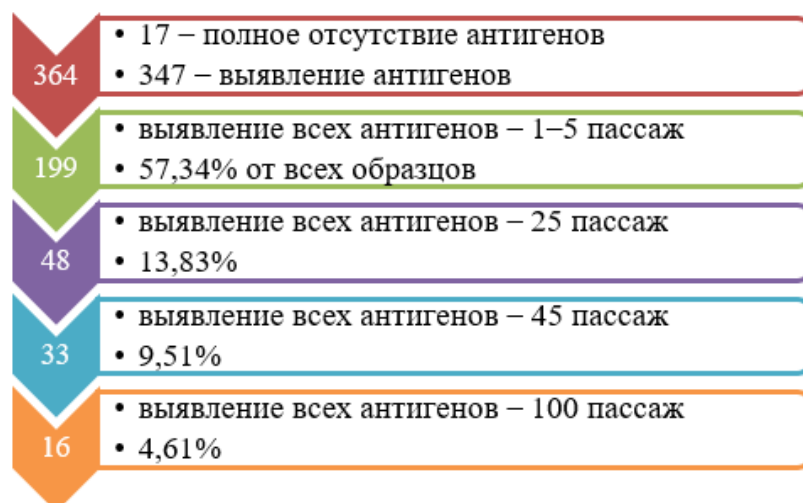


Рисунок 2 – Сохранение презентации опухолеассоциированных антигенов в процессе длительного культивирования *in vitro* клеток МК

МК, особенно ее метастатические формы, характеризуется гистологическим разнообразием и способностью злокачественных меланоцитов менять уровень экспрессии ОАА [Pitcovski J. et al.,

2017; Teixeira C. et al., 2021]. В результате генетической нестабильности в процессе опухолевой прогрессии клеточная популяция приобретает гетерогенность, в том числе и по экспрессии специфических антигенов. Естественная селекция, приводящая к модуляции антигенных свойств, является, скорее всего, одним из механизмов, который позволяет опухолевым клоном «избегать» воздействия иммунной системы. Подобные изменения свойств развивающейся в организме большой опухоли ставят определенные трудности при создании противоопухолевых вакцин и, возможно, является одной из причин недостаточной их эффективности [Finn O.J., 2017; Maurer D.M. et al., 2019].

При анализе данных по непрерывному культивированию ( $\leq 100$  пассаж) клеток МК (n=100) были обнаружено, что происходил процесс потери антигенов CD63, Melan A, Tyros, TRP1, gp100, S100, MITF, HLA I, который не зависел от интенсивности выявления этих антигенов в начальной точке анализа (рис. 3).

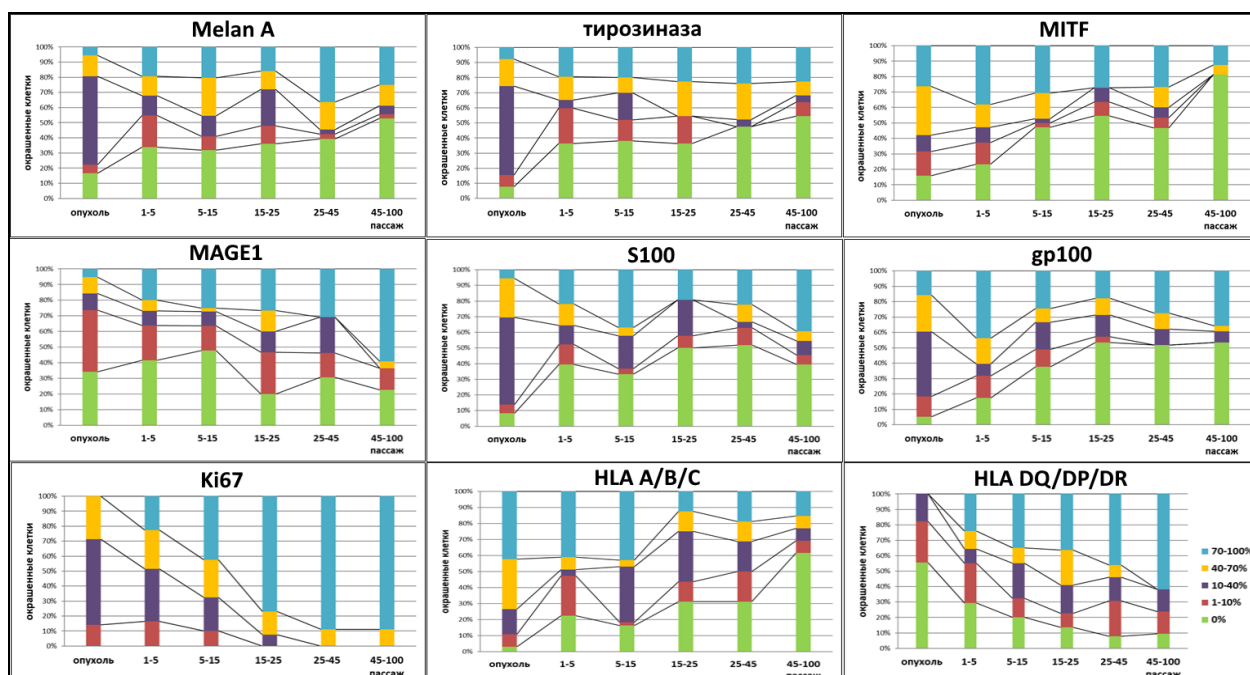


Рисунок 3 – Динамика экспрессии ОАА и HLA I и II класса культурами клеток МК при непрерывном культивировании (0–100 пассаж)

В то же время экспрессия антигенов CD146, MAGE1, HLA II класса нарастала с увеличением числа пассажей. Сравнительное изучение динамики экспрессии ОАА в клетках МК в процессе прогрессии злокачественного новообразования продемонстрировало во всех случаях клональную дивергенцию антигенных свойств опухоли, заключающуюся в различной интенсивности антигенной презентации опухолевыми клетками, выделенными из первичных, рецидивирующих и метастатических новообразований одного и того же больного. Примером может служить клинический случай пациента СНМ, 27 л., МК левого предплечья с метастазами в периферических лимфоузлах, мягких тканях, внутригрудных и абдоминальных лимфоузлах, органах малого таза (рис. 4).

В процессе прогрессии опухоли трижды после оперативного вмешательства забирали материал для получения культур и изучения антигенного профиля культивируемых малигнизированных клеток: неполной/субоптимальной циторедукции от 26.11.2007, 17.09.2008 и 27.02.2009. Все изученные образцы (n=12) практически не экспрессировали TRP-1, слабо экспрессировали тирозиназу и gp100. В процессе эволюции опухоли уменьшалась экспрессия Melan A, S100, HLA A/B/C. Сохранялась экспрессия CD63, CD146, MAGE1, MITF, HLA DP/DQ/DR и VEGF. Возросло количество пролиферирующих клеток, в которых выявлялся антиген Ki-67. Клетки всех образцов слабо экспрессировали E-кадгерин, в то время как увеличивался пул малигнизированных клеток, экспрессирующих молекулы N-кадгерина.



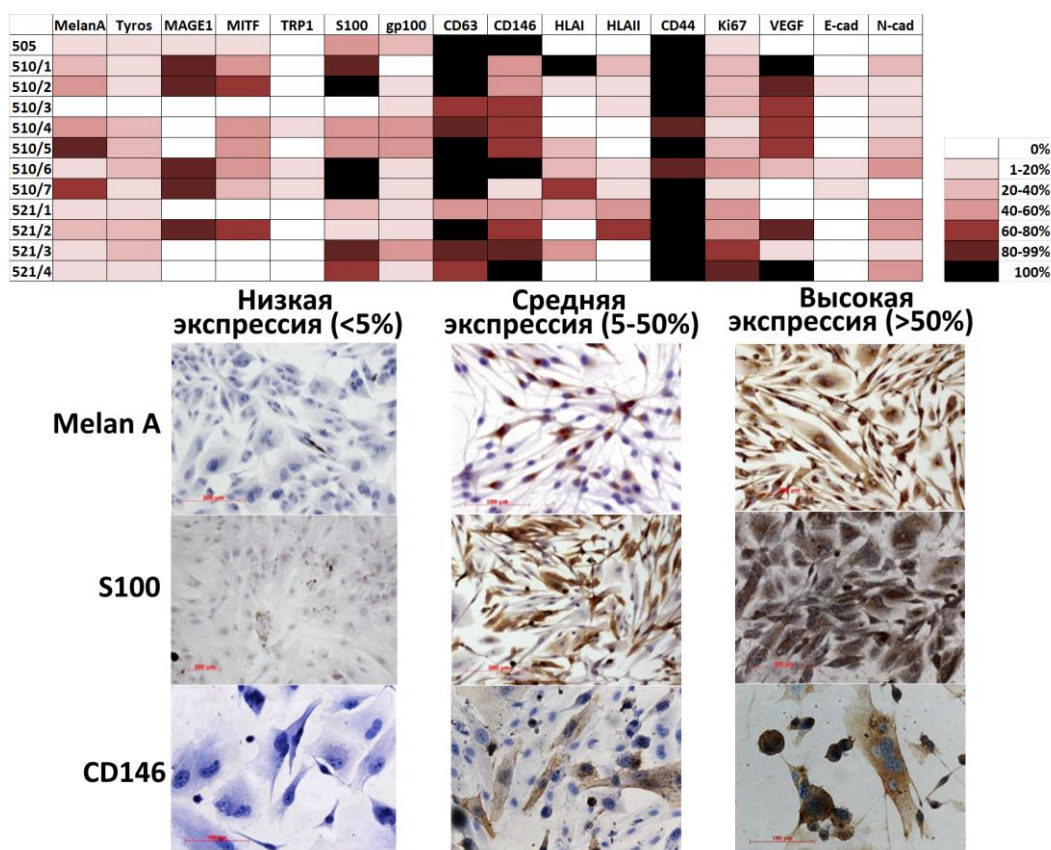


Рисунок 4 – Гетерогенность экспрессии ОАА в культивируемых клетках МК, выделенных из разных образцов метастатических очагов в процессе опухолевой прогрессии у больной СНМ, 27 л. Метод иммуноцитохимии, докрашивание гемалауном Майера. Масштабная линейка 200 мкм

Полученные данные согласуются с результатами других исследований, когда из клеток опухоли одного пациента выделяют два-три субклона с различными антигенными характеристиками [Haridas P. et al., 2016; Pitcovski J. et al., 2017].

**Экспрессия ОАА и антигенов HLA I и II класса культивируемыми клетками ЭО и СМТ/ОС.** Клетки ЭО (РП, РПЖ, КРР, РМЖ, РЯ), выделенные из образцов злокачественных новообразований больных, были изучены на присутствие цитокератинов (СК), которые являются специфическими компонентами цитоскелета нормальных и злокачественных эпителиальных клеток [Moll R. et al., 2008]. Было установлено, что во всех культурах клеток ЭО на ранних пассажах (<10), независимо от нозологии, выявляются СК, что совпадает с количественной идентификацией этих антигенов в исходных тканях злокачественных новообразований (рис. 5).

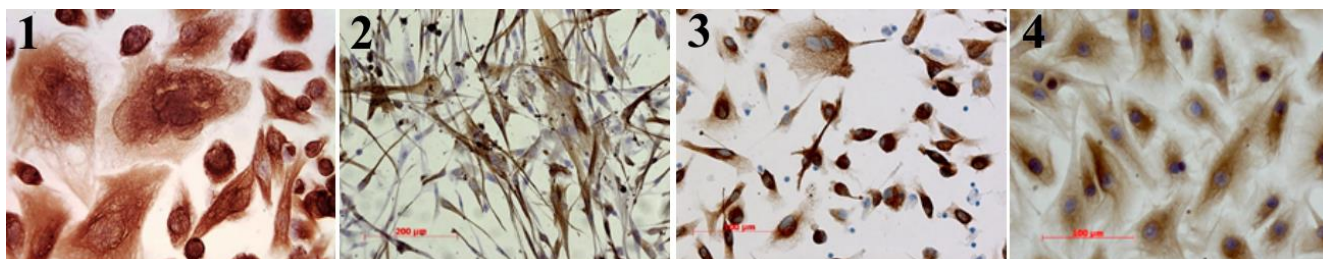


Рисунок 5 – Выявление цитокератинов в культивируемых клетках опухолей эпителиального происхождения: 1 – РП #276, 5 пассаж; 2 – РПЖ #413, 5 пассаж; 3 – РМЖ #576, 10 пассаж; 4 – КРР #731, 5 пассаж. Метод иммуноцитохимии, докрашивание гемалауном Майера. Масштабная линейка 200 мкм

После адаптации к условиям *in vitro* большинство культур клеток КРР, РЯ продолжали экспрессировать специфические ОАА, такие как антигены CDX2 и СА-125. Было проанализировано 72 культуры РП на ранних пассажах на предмет выявления семейств СК, эпителиального мембранного антигена (ЕМА), виментина, раково-тестикулярных антигенов семейства MAGE1, антигена RCC, маркера пролиферации Ki-67 и антигенов HLA A/B/C, HLA DQ/DP/DR. Все культуры РП на начальном этапе культивирования экспрессировали СК и виментин, что совпадало с результатами, полученными при иммуногистохимическом анализе ткани опухоли. При этом продукция СК18 и СК19 несколько снижалась при переводе клеток в культуру: данные СК выявляли *in vitro* в среднем в 40,4% и 16,6% клеток – в культуре, в 45,02% и 18,9% – в ткани опухоли соответственно. По исследованным маркерам в культивируемых клетках РП на ранних пассажах и в образцах опухоли, из которых эти клетки были получены, не было выявлено статистически значимых различий. Это позволяет сделать вывод о том, что культивируемые клетки РП до 10 пассажа сохраняют гистотипические признаки исходной ткани и могут служить клеточной моделью РП *in vitro*.

Длительное культивирование клеток ЭО сопровождалось изменениями экспрессии СК, детектируемых с помощью антител к МСК; СК7, СК8, СК20. Происходило уменьшение экспрессии ЕМА, специфических ОАА. Индивидуальный анализ клеточных культур РП, КРР, РМЖ, РЯ указывает на то, что в процессе пассирования в культурах увеличивалось количество клеток, позитивных по Ki-67. В большинстве случаев на поздних этапах культивирования (45–100 пассаж) наблюдали сильно уменьшенную презентацию молекул HLA A/B/C и увеличение количества клеток, синтезирующих молекулы HLA DQ/DP/DR.

В нашем исследовании при выполнении иммуноцитохимического анализа клеток СМТ/ОС на ранних этапах культивирования мы ориентировались на гистологический диагноз и иммуногистохимическое исследование образцов опухолевой ткани, полученных интраоперационно. Практически все культуры СМТ/ОС на ранних пассажах экспрессировали антигены установленной дифференцировки. Все исследованные культуры (n=21) синтезировали виментин. Антигены HLA A/B/C были представлены в клетках всех культур, за исключением клеток двух синовиальных сарком, антигены HLA DQ/DP/DR отсутствовали в 8 культурах (38,09%).

Таким образом, изучение антигенного профиля клеток МК, СМТ/ОС и ЭО, культивируемых *in vitro*, продемонстрировало на ранних пассажах ( $\leq 10$ ) преимущественное сохранение иммунофенотипического профиля экспрессии исходной опухолевой ткани, что позволяет использовать культивируемые малигнизированные клетки до 10 пассажа в качестве клеточных моделей для решения задач доклинических исследований.

В процессе длительного культивирования наблюдается обеднение специфического антигенного профиля и HLA I класса, появление молекул HLA II класса, усиление презентации антигенов, ассоциированных с процессами пролиферации, инвазии и метастазирования.

**Сравнительный анализ экспрессии раково-тестикулярных антигенов клетками солидных опухолей.** Было проведено сравнительное изучение профилей экспрессии представителей генов 11 семейств РТА культивируемыми клетками МК, СМТ/ОС, РП, РМП, КРР, РМЖ, РЯ. В процессе молекулярно-генетического анализа в 91 из 100 (91,0%) образцов клеточных линий злокачественных новообразований была зафиксирована активность РТГ, при этом все клеточные культуры имели высокогетерогенный профиль их экспрессии. Мы не обнаружили активности гена *SPANXA1* в культивируемых клетках КРР, РМП, РМЖ и РЯ, среди культур МК активность этого гена была зарегистрирована только в двух случаях. Ген *SEMG1* был активен только в клетках некоторых культур МК (4/32) и РМП (1/6), редкой была экспрессия гена *SCPI* – она выявлена в клетках СМТ/ОС (1/59), РМП (1/6) и РЯ (3/4) (табл. 4).

Гиперэкспрессию гена *PRAME* выявили в клетках всех типов опухолей. Это наблюдение совпадает с данными, что ген *PRAME* является наиболее часто экспрессируемым РТГ при злокачественных новообразованиях [Yao J. et al., 2014; Lezcano C. et al., 2021].

Таблица 4 – Частота встречаемости экспрессии РТГ в культивируемых клетках солидных опухолей

Ген	МК	СМТ/ОС	РП	РМЖ	КРР	РМП	РЯ
	% ( $N_{\text{pos}}/N_{\text{total}}$ )*						
<i>GAGE</i>	93,8 (30/32)	49,2 (29/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>HAGE</i>	9,4 (3/32)	6,8 (4/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>NY-ESOI</i>	84,4 (27/32)	16,9 (10/59)	0 (0/2)	50 (1/2)	33,3 (1/3)	83,3 (5/6)	100 (4/4)
<i>MAGEA1</i>	75 (24/32)	18,6 (11/59)	0 (0/2)	50 (1/2)	0 (0/3)	100 (6/6)	0 (0/4)
<i>PASDI</i>	71,9 (23/32)	32,2 (19/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	16,7 (1/6)	75 (3/4)
<i>SCPI</i>	0 (0/32)	1,7 (1/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	16,7 (1/6)	75 (3/4)
<i>SEMG1</i>	12,5 (4/32)	0 (0/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	16,7 (1/6)	0 (0/4)
<i>SLLP1</i>	46,9 (15/32)	32,2 (19/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	33,3 (1/3)	0 (0/6)	25 (1/4)
<i>SPANXA1</i>	6,3 (2/32)	11,9 (7/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>SSX1</i>	34,4 (11/32)	23,7 (14/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>PRAME</i>	93,8 (30/32)	55,9 (33/59)	100 (2/2)	100 (2/2)	66,6 (2/3)	83,3 (5/6)	100 (4/4)

Примечание: \* – частота встречаемости выражена в процентах; в скобках указано соотношение количества позитивных случаев к количеству наблюдений.

С точки зрения выбора молекулярных мишеней для иммунотерапии злокачественных новообразований РТА представляют наибольший интерес, так как во взрослом организме практически здорового человека они экспрессируются в основном только в тканях яичек и плаценты, но могут быть гиперэкспрессированы в опухоли, следовательно, они являются высокоиммуногенными, потому что иммунная система взрослого организма распознает их как чужеродные [Salmaninejad A. et al., 2016; Nin D.S., Deng L.W., 2023].

Транскрипционная активность некоторых РТГ в культурах клеток солидных опухолей на первых пассажах имела гендерные различия: обнаружили статистически значимое увеличение экспрессии генов *GAGE* ( $p=0,037$ ) и *PASDI* ( $p=0,0024$ ) в образцах клеток опухолей больных женского пола. Были обнаружены статистически значимые различия в экспрессии *MAGEA1* между метастатическими культурами и культурами из первичных опухолей ( $p=0,019$ ), а также в экспрессии *SLLP1* между метастатическими культурами и культурами, полученными из рецидивных опухолей ( $p=0,043$ ). В литературе практически не обсуждается экспрессия *SLLP1* в солидных опухолях, однако мы выявили 46,87% культур МК, 32,2% культур СМТ/ОС, 33,3% КРР и 25% РЯ, где наблюдалась экспрессия этого РТГ.

Клетки МК характеризовались более выраженным профилем экспрессии РТГ по сравнению с культивируемыми клетками других злокачественных новообразований. Наибольшую частоту транскрипционной активности в клетках МК продемонстрировали гены *GAGE*, *PRAME*, экспрессия которых была обнаружена в 93,75% случаев (30/32); *NY-ESOI* – 84,37% (27/32) и *MAGEA1* – 75% (24/32) (см. табл. 4).

В группе культур СМТ/ОС наиболее часто встречали экспрессию генов *PRAME* – 55,93% (33/59), *GAGE* – 49,15% (29/59), *PASDI* и *SLLP1* – 32,2% (19/59), *SSX1* – 23,73% (14/59). Наибольшую экспрессию РТГ обнаружили в клетках синовиальных сарком и остеосарком – 9 генов из 11, лейомиосарком – 8/11 и миксофибросарком – 7/11. В клеточных образцах рабдомиосарком и шванномы экспрессия генов была минимальной – 2/11 и 1/11 соответственно.

В клетках РМП было выявлено 6 активных генов из 11, при этом экспрессия гена *MAGEA1* была представлена во всех культурах, часто встречалась экспрессия генов *PRAME* и *NY-ESOI* – 83,33% (5/6). Все культуры РЯ экспрессировали гены *NY-ESOI* и *PRAME*, 3 образца из четырех проявляли активность в отношении генов *PASDI* и *SCPI*, в одном образце была детектирована активность гена *SLLP1*. В культурах РМЖ и КРР только 3 гена из 11 проявляло транскрипционную активность, в двух культурах РП имела место активность только одного гена *PRAME*. Согласно критерию Краскела–Уоллиса, в культивируемых клетках МК, СМТ/ОС и ЭО наблюдали статистически значимые различия в интенсивности экспрессии РТГ, кроме *HAGE* ( $p=0,25$ ), *SEMG1* ( $p=0,082$ ), *SPANXA1* ( $p=0,18$ ).

Кластеризация данных при культивировании до 10 пассажа позволила выделить три основных кластера: в первый кластер вошли культуры МК и СМТ/ОС, характеризующиеся гиперэкспрессией *GAGE*, *PASD1*, *PRAME*; во втором кластере оказались культуры МК и ЭО (КРР, РМЖ, РМП) с гиперэкспрессией генов *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PRAME*; большая часть образцов культивируемых клеток оказалась в третьем кластере: культуры СМТ/ОС, МК и ЭО с низкой активностью большинства генов, но экспрессирующие *GAGE*, *NY-ESO-1*, *SLLP1* и *PRAME* (рис. 6).

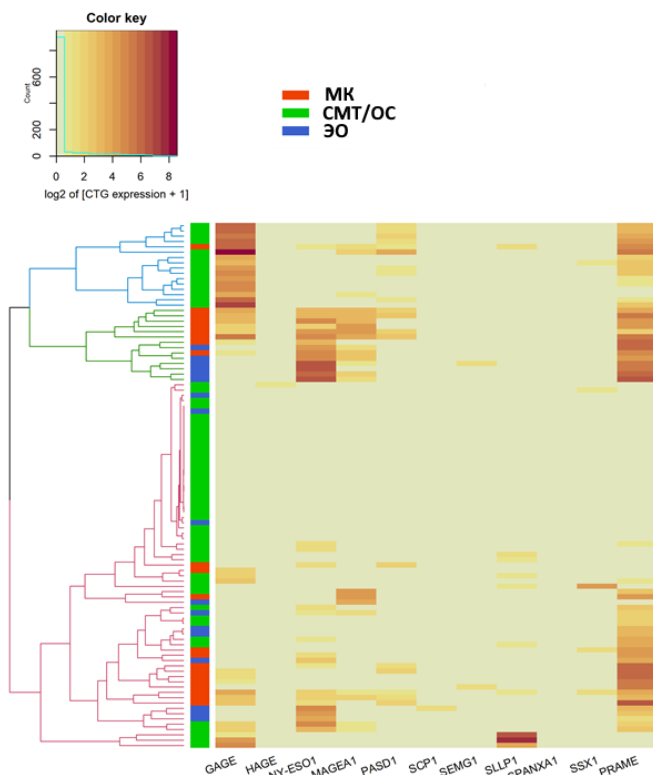


Рисунок 6 – Графическое изображение кластеризации образцов культивируемых клеток солидных опухолей по экспрессии РТГ на начальных этапах культивирования ( $\leq 5$  пассаж)

Полученные данные позволяют сделать вывод: существует сходство профилей экспрессии РТА в клетках МК, СМТ/ОС и ЭО (рис. 7), что дает возможность использовать клетки МК как источник РТА в клеточной иммунотерапии на основе активированных ДК в процессе создания противоопухолевых вакцин для лечения больных другими злокачественными новообразованиями.

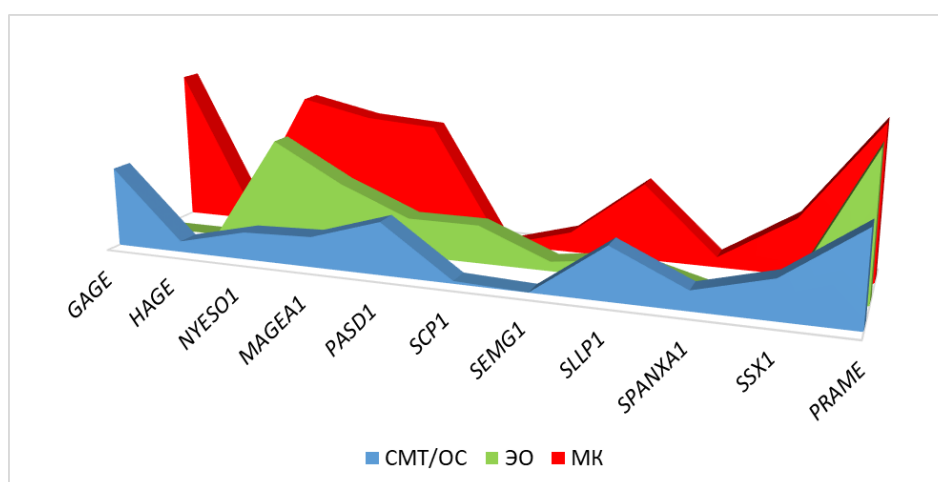


Рисунок 7 – Графическое сопоставление профилей экспрессии РТГ культивируемыми клетками МК, СМТ/ОС и опухолей эпителиального происхождения

Был разработан новый клеточный продукт IRTAN-2018 для нагрузки и активации ДК, состоящий из равновесной смеси лизатов 9 клеточных линий МК, характеризующихся высокой транскрипционной активностью 10 РТГ (патент № 2714208 от 13.02.2020).

**Продукция иммуносупрессивных факторов MICA, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, IL-10 культивируемыми клетками солидных опухолей.** Было изучено количественное содержание MICA, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, IL-10 в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей в процессе пассирования.

На ранних пассажах культуры солидных опухолей синтезировали в микроокружение большее количество этих факторов, по сравнению с контрольной культурой нормальных фибробластов, при этом различия были статистически значимы ( $p < 0,05$ ). Для культур МК ( $n=107$ ) разброс значений содержания лиганда активационного рецептора цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток MICA был самым значительным: min–max 9,96–1897,71 пг/мл.

Для культур РП ( $n=18$ ) показатели min–max составили 9,61–966,27 пг/мл; для культур СМТ/ОС ( $n=38$ ): min–max 13,58–535,95 пг/мл. Наименьшее количество MICA обнаружили в супернатантах клеток РПЖ:  $M_e$  56,33 (min 21,62 – max 159,97 пг/мл) и РЯ:  $M_e$  41,30 (min 18,93 – max 231,38 пг/мл). Наибольшую гетерогенность в продукции TGF- $\beta$ <sub>1</sub> демонстрировали клетки МК ( $n=82$ ):  $M_e$  2,763 (min 0,282 – max 33,56 нг/мл); СМТ/ОС ( $n=53$ ):  $M_e$  1,037 (min 0,207 – max 10,888 нг/мл); РП ( $n=13$ ):  $M_e$  5,04 (min 1,23 – max 19,338 нг/мл). Наименьшим значением продукции TGF- $\beta$ <sub>1</sub> характеризовались клетки РПЖ ( $n=10$ ):  $M_e$  1,506 (min 0,3 – max 4,73 нг/мл).

При изучении концентрации IL-10 наибольшая варибельность показателей была характерна для культур МК:  $M_e$  1,753 (min 0 – max 72,089 пг/мл), при этом 8 образцов было негативно по присутствию в супернатантах IL-10. Все культуры СМТ/ОС продуцировали IL-10, наблюдали отсутствие продукции IL-10 в одной культуре РП и одной культуре РПЖ. Из культур клеток ЭО высокими показателями характеризовались клетки КРР:  $M_e$  12,85 (min 2,368 – max 24,61 пг/мл) и РЯ:  $M_e$  2,015 (min 0,354 – max 83,881 пг/мл). Длительное культивирование опухолевых клеток приводило к увеличению продукции изучаемых факторов во всех случаях, различия содержания MICA, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, IL-10 в супернатантах клеточных культур на ранних ( $\leq 10$ ) и поздних ( $\geq 30$ ) пассажах были статистически значимыми,  $p < 0,01$  (рис. 8).

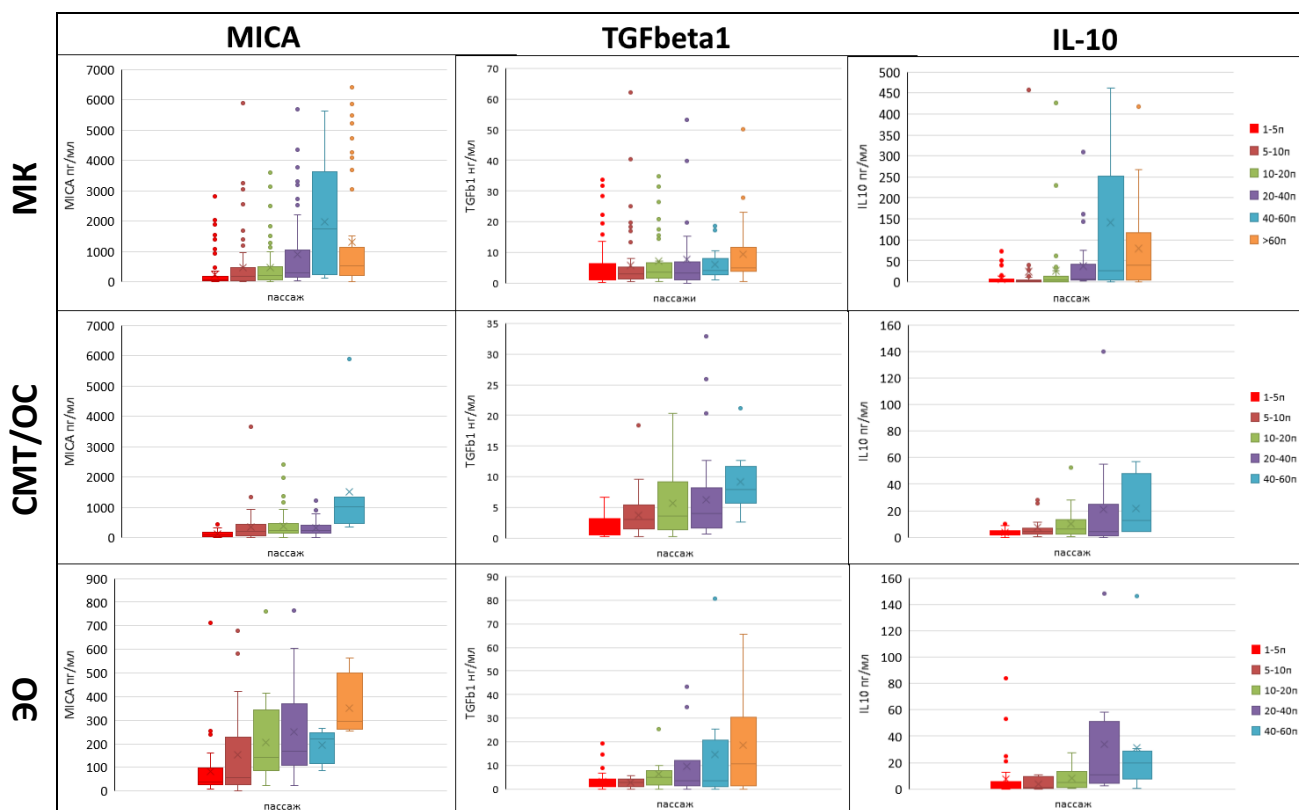


Рисунок 8 – Динамика продукции ИСФ клетками солидных опухолей в процессе длительного культивирования

Исследования последних лет демонстрируют, что в результате опухолевой прогрессии у злокачественных клеток появляется способность продуцировать растворимые факторы, создающие в собственном микроокружении условия локальной иммунодепрессии, а также

способные оказывать иммуносупрессорное воздействие на системном уровне [Russo V., Protti M.P., 2017; Ugel S. et al., 2021]. Опухолевые клетки экспрессируют и секретируют в окружающую среду компоненты экстрацеллюлярного матрикса, факторы роста, цитокины, хемокины, протеазы, другие ферменты и метаболиты.

Имеющиеся данные по изучению лиганда рецептора НК-клеток и ЦТЛ NKG2D свидетельствуют, что циркуляция молекул MICA может оказывать ингибирующий системный эффект на функции иммунных клеток [Zhao Y. et al., 2017; Ferrari de Andrade L. et al., 2020; Fuertes M.B. et al., 2021]. У больных раком легкого, печени, желудка, РМЖ, РЯ, РМП, КРР концентрация TGF- $\beta_1$  в плазме крови повышена и коррелирует со степенью прогрессии опухоли [Pachnia D. et al., 2017; Derynck R., et al., 2021; Goulet C.R., Pouliot F., 2021].

**Продукция культивируемыми клетками солидных опухолей VEGF и других факторов, ассоциированных с ангиогенезом, инвазией, метастазированием и иммуносупрессией.** Как известно, среди множества ангиогенных факторов сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и его рецепторы являются одними из главных индукторов опухолевого ангиогенеза [Dakowicz D., 2022]. В супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей было изучено содержание VEGF, количество которого статистически значимо превышало показатели, обнаруженные в надосадочной жидкости культур нормальных фибробластов. Были выявлены статистически значимые различия в продукции этого фактора культурами клеток разных опухолей ( $p < 2,2 \times 10^{-16}$ ). Наиболее активными продуцентами оказались клетки МК:  $M_e$  3,35 (min 0,01 – max 7,90 нг/мл). Наименьшее количество VEGF продуцировали культуры РП:  $M_e$  1,64 (min 0,01 – max 4,53 нг/мл) и РПЖ:  $M_e$  1,17 (min 0,07 – max 3,02 нг/мл).

При длительном культивировании на протяжении всего периода наблюдения культуры МК и СМТ/ОС продуцировали высокие уровни VEGF, которые не различались статистически значимо между собой. Культуры клеток ЭО после 60 пассажа приобретали способность к увеличению продукции VEGF, различия были статистически значимы в сравнении с начальным этапом культивирования (1–5 пассаж),  $p = 0,01334$ .

Мультиплексный анализ продемонстрировал, что наибольшей экспрессией характеризовалась изоформа VEGF-A, причем содержание этих молекул было самым значительным в супернатантах культур клеток РМЖ:  $M_e$  5,19 (min 2,63 – max 8,01 нг/мл), по сравнению с клетками МК:  $M_e$  1,67 (min 0,12 – max 10,05 нг/мл) и клетками СМТ/ОС:  $M_e$  3,90 (min 1,65 – max 10,06 нг/мл). VEGF-C преимущественно экспрессировали клетки РП и РМЖ:  $M_e$  1,86 (min 1,55 – max 2,09 нг/мл) и  $M_e$  0,79 (min 0,31 – max 1,55 нг/мл) соответственно, по сравнению с клетками МК:  $M_e$  0,09 (min 0,004 – max 0,92 нг/мл). Практически все опухолевые клеточные культуры продуцировали VEGF-D в незначительном количестве. Белки VEGF-C и -D оказывают регуляторное влияние на эндотелиальные клетки лимфатических сосудов при опухолевом лимфоангиогенезе [Stacker S.A., Achen M.G., 2018]).

Ангиопоэтины (ANG) также принимают участие в регуляции созревания сосудов и формировании сосудистой сети [Akwił R.G. et al., 2019]. Мы установили, что культивируемые опухолевые клетки секретируют сопоставимое количество ANG-2: содержание в кондиционированных средах клеток МК колебалось от 30,5 до 12606,5 пг/мл; СМТ/ОС – от 72,5 до 1873,5 пг/мл; РМЖ – от 81,3 до 622,8 пг/мл; РП – от 389,5 до 613,5 пг/мл. Была обнаружена обратная корреляция между продукцией VEGF-A и ANG-2 ( $\rho = -0,319$ ,  $p = 0,025$ ) (рис. 9 А).

Одним из важных моментов инвазии и метастазирования опухолей является процесс протеолитической деградации экстрацеллюлярного матрикса, осуществляемой в результате каскада реакций с участием множества ферментов, в том числе с участием системы активации плазминогена, которая функционирует универсально для большинства типов опухолей и вовлечена в процессы туморогенеза, клеточной адгезии, пролиферации, миграции и ангиогенеза [Madunić J., 2018].

В нашем исследовании uPA и PAI-1 экспрессировались всеми типами культивируемых опухолевых клеток, при этом наибольшее количество uPA продуцировали клетки РП:  $M_e$  23,682 (min 18,705 – max 27,831 нг/мл), максимальное количество этого фактора для клеток СМТ/ОС составило 13,793 нг/мл, для клеток РМЖ – 3,886 нг/мл. Культивируемые клетки солидных

опухолей демонстрировали большую вариабельность в продукции PAI-1 (для клеток МК: 41,8–9222,3 пг/мл; СМТ/ОС: 2936,0–9494,0 пг/мл; РМЖ: 3543,8–8829,3 пг/мл). Для продукции uPA и PAI-1 была характерна обратная корреляция слабой силы ( $\rho=-0,275$ ,  $p=0,049$ ) (рис. 9 Б).

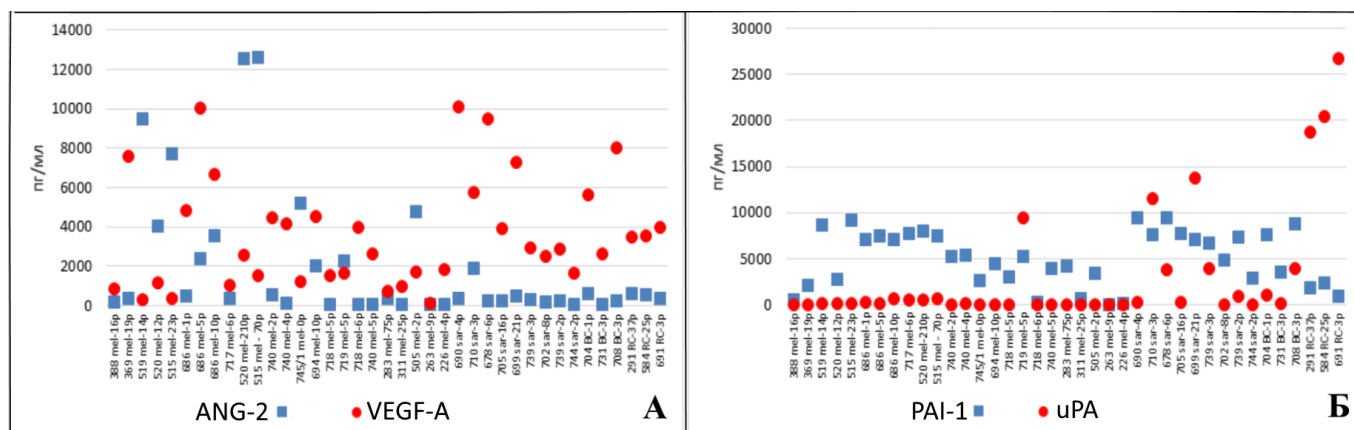


Рисунок 9 – Характер продукции в культурах клеток солидных опухолей:  
**А** – ангиопоэтина-2 (ANG-2) и сосудистого эндотелиального фактора роста А (VEGF-A);  
**Б** – урокиназного активатора плазминогена (uPA) и его ингибитора PAI-1.

*По оси ординат – концентрация фактора,*

*по оси абсцисс – наименование клеточной культуры и номер пассажа*

При прогрессии злокачественных новообразований может наблюдаться сверхэкспрессия или сверхактивация рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), возникающая в результате мутаций, блокирующих рецептор в состоянии непрерывной передачи сигналов, или аномально высоких уровней лигандов EGFR, высвобождаемых из опухолевых или неопухолевых клеток микроокружения опухоли [Subbiah V. et al., 2022]. Мутации EGFR и/или его сверхэкспрессия вносят вклад в агрессивный фенотип опухолей, плохой прогноз и являются мишенью для множества методов лечения, применяемых в настоящее время в клинической практике.

Изучение содержания рецепторов EGFR и их лигандов EGF, HB-EGF в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей позволило установить, что продукция EGF присуща всем типам изучаемых малигнизированных клеток, при этом клетки СМТ/ОС характеризовались более выраженной экспрессией и секрецией растворимой формы рецепторов EGFR:  $M_e$  258,54 (min 16,3 – max 1681,76 пг/мл), по сравнению с МК:  $M_e$  123,0 (min 0 – max 959,88 пг/мл),  $p=0,015$ .

Среди клеток ЭО культуры РМЖ характеризовались более выраженной секрецией EGF:  $M_e$  864,5 (min 412,0 – max 4183,3 пг/мл) по сравнению с клетками РП:  $M_e$  260,5 (min 157,2 – max 339,0 пг/мл),  $p=0,005$ , но продукция EGFRs клетками ЭО была сопоставима,  $p=0,501$ . Согласно критерию Краскела–Уоллиса, все исследованные группы культивируемых клеток солидных опухолей различались по продукции компонентов системы EGF: культивируемые клетки РМЖ были самыми активными продуцентами EGF, клетки СМТ/ОС наиболее активно секретировали в окружающую среду растворимую форму EGFR и HB-EGF. Есть данные, что экспрессия HB-EGF в саркомах связана с определенными стадиями онкогенеза [Musumeci G. et al., 2013].

Присутствие высоких концентраций ряда цитокинов в крови онкологических больных, таких как IL-6 и IL-8, является прогностическим индикатором прогрессирования заболевания при раке желудка, поджелудочной железы, молочной железы, легкого, меланоме, колоректальном раке, миеломе [Ma Y. et al., 2017; Tobin R.P. et al., 2019]. Установлено, что опухолевые клетки более десяти типов злокачественных новообразований способны продуцировать эти цитокины [Tobin R.P. et al., 2019; Yu S. et al., 2022]. В нашем исследовании, начиная с первых пассажей культивирования, все клетки солидных опухолей секретировали в окружающую среду большие количества IL-6 и IL-8, по сравнению с культурой фибробластов, при этом различия были статистически значимы ( $p=0,00001$  и  $p=0,00591$  соответственно).

Нами также был осуществлен скрининг культур клеток солидных опухолей на предмет продукции спектра активных молекул, играющих роль во многих процессах, обеспечивающих жизнедеятельность и пролиферацию клеток в норме и патологии. Мы обнаружили значительную секреторную активность опухолевых клеток *in vitro*, при этом наблюдали статистически значимые различия в продукции малигнизированными клетками, полученными из образцов опухолей различного гистогенеза фоллистатина (FST), фактора роста гепатоцитов (HGF), остеопонтина (OSTP) и пролактина.

Культивируемые клетки МК и СМТ/ОС характеризовались ярко выраженной и вместе с тем гетерогенной продукцией FST:  $M_e$  1,75 (min 45,88 – max 36,39 нг/мл) – для культур МК и для культур СМТ/ОС –  $M_e$  2,39 (min 0 – max 123,71 нг/мл),  $p=0,025$ . Культуры клеток ЭО статистически значимо различались между собой по продукции FST ( $p=0,0112$ ): наиболее активной продукцией характеризовались культуры РЯ:  $M_e$  920,2 (min 270,7 – max 1858,3 пг/мл); наименьшей продукцией FST – культуры РМЖ;  $M_e$  61,3 (min 24,2 – max 158,0 пг/мл). Для культур РП:  $M_e$  355,0 (min 157,6 – max 1547,4 пг/мл). В настоящее время известно, что FST является антагонистом активина, входящего в суперсемейство TGF- $\beta$ , и FST с активинном действуют как система плеiotропных факторов роста, которая участвует в пролиферации, дифференцировке и апоптозе ряда клеток, в том числе опухолевых [Shi L. et al., 2016]. HGF участвует в регуляции клеточной миграции, жизнеспособности и трехмерного морфогенеза, процессов, лежащих в основе опухолевой инвазии и метастазирования [Moosavi F. et al., 2019]. Мы обнаружили, что практически все культивируемые клетки солидных опухолей продуцировали HGF: только в 6,89% случаев (2/29) клеток МК не был выявлен этот фактор. В случае культур МК:  $M_e$  80,98 (min 0 – max 4761,32 пг/мл), что статистически значимо отличалось от культур СМТ/ОС:  $M_e$  565,38 (min 12,0 – max 10741,33 пг/мл),  $p=0,039$ . Культуры клеток ЭО также экскретировали разное количество HGF – РМЖ:  $M_e$  48,3 (min 36,4 – max 601,4 пг/мл), РП:  $M_e$  349,2 (min 4,9 – max 1219,2 пг/мл), РЯ:  $M_e$  872,8 (min 130,2 – max 1045,5 пг/мл),  $p=0,037$ . Таким образом, в нашем исследовании наиболее активными продуцентами HGF оказались культивируемые клетки РЯ и СМТ/ОС.

Была выявлена гиперпродукция OSTP культурами клеток МК:  $M_e$  13,257 (min 0,067 – max 3257,4 нг/мл), что было достоверно выше, чем для культур СМТ/ОС:  $M_e$  0,361 (min 0,018 – max 17,179 нг/мл),  $p=1,2e-05$ . OSTP в высокой концентрации был обнаружен в супернатантах культур РМЖ:  $M_e$  17,590 (min 6,311 – max 414,066 нг/мл), что статистически значимо отличалось от культур РП:  $M_e$  0,758 (min 0,207 – max 17,084 нг/мл) и РЯ:  $M_e$  0,502 (min 0,152 – max 1,714 нг/мл),  $p=0,0211$ . Известно, что OSTP играет ключевую роль в прогрессировании злокачественных новообразований, таких как РМЖ, рак печени, РПЖ, КРР, рак легкого и МК, увеличивая пролиферацию, выживаемость, подвижность и инвазию опухолевых клеток [Klement J.D. et al., 2018; Lamort A.S. et al., 2019].

Выявили в группе культур клеток ЭО статистически значимые различия в продукции пролактина: наибольшее количество пролактина обнаружили в супернатантах культур РЯ:  $M_e$  82,85 (min 1,66 – max 108,66 пг/мл), что совпадает с мнением ряда авторов: Song H.J. и соавт. (2018) изучили 16 биомаркеров, обнаруживаемых в сыворотке крови пациентов с раком яичников, с целью выбрать оптимальный алгоритм, позволяющий минимизировать ошибки в постановке диагноза, и пришли к выводу, что пролактин является важной составляющей комбинации биомаркеров для выявления рака яичников [Song H.J. et al., 2018].

Таким образом, опухолевые клетки способны сами синтезировать факторы, стимулирующие ангиогенез, пролиферацию, миграцию, инвазию, привлекающие клетки иммунной системы в ложе опухоли и ингибирующие их противоопухолевую активность.

Многообразие выявленных механизмов объясняет ограниченную эффективность воздействия на каждый из них в отдельности и демонстрирует необходимость комплексного таргетного воздействия, направленность которого может привести к изменениям процесса развития опухоли. Онкоспецифическая продукция ряда ИСФ может быть проявлением патогенетического механизма, связывающего стадию онкологического процесса и прогноз заболевания с функциональным состоянием иммунной системы.



**Изменение секреторного профиля клеток солидных опухолей в трехмерной системе культивирования.** Сольдные опухоли имеют сложную трехмерную пространственную организацию, включающую множество неопухолевых клеток и внеклеточный матрикс, которые в совокупности составляют микроокружение злокачественного новообразования [Ishiguro T. et al., 2017]. Мы изучили, как меняются секреторные и инвазивные свойства клеток солидных опухолей при их культивировании в трехмерной клеточной системе, используя в качестве модели первичного опухолевого очага тумороиды (сфероиды). Был проведен сравнительный анализ секреторного спектра опухолевых клеток МК, СМТ/ОС, КРР, РМЖ, культивируемых в 2D- и 3D-системах, путем изучения супернатантов малигнизированных клеток на присутствие основных хемокинов, цитокинов, факторов пролиферации, инвазии, иммуносупрессии, который показал, что секреторная активность злокачественных клеток увеличивается при культивировании в 3D-формате независимо от гистогенеза опухоли.

Статистически значимые различия в секреторной активности клеток солидных опухолей в 2D- и 3D-системах наблюдали при исследовании уровня хемокина CCL2 (фактор хемотаксиса моноцитов в организме млекопитающих): в кондиционированной среде сфероидов его средняя концентрация составила 2090,49 пг/мл (min 150,74 – max 6316,8 пг/мл), в то время как в супернатанте монослойных культур – 775,59 пг/мл (min 4,91 – max 1864,59 пг/мл),  $p=0,014$  (рис. 10 А).

Также имели место статистически значимые различия в продукции CCL3 (макрофагальный воспалительный белок 1-альфа, участвующий при остром воспалении в рекрутинге и активации полиморфно-ядерных лейкоцитов посредством связывания с рецепторами CCR1, CCR4 и CCR5):  $M_e$  3,31 пг/мл (min 0,11 – max 20,24 пг/мл) по сравнению с  $M_e$  93,65 пг/мл (min 1,10 – max 1230,28 пг/мл) в монослое и тумороидах соответственно ( $p=0,029$ ) (рис. 10 Б).

Статистически значимые закономерности были выявлены в отношении хемокина CCL15, который в норме оказывает хемотаксическое действие на нейтрофилы, моноциты, лимфоциты, эозинофилы и эндотелиальные клетки: в супернатантах монослойных культур его средняя концентрация составила 31,03 пг/мл (min 1,6 – max 139,57 пг/мл), в супернатантах сфероидов – 86,71 пг/мл (min 11,45 – max 580,73 пг/мл),  $p=0,031$  (рис. 10 В). Для хемокина CXCL11 (интерферон-гамма-индуцируемый белок 9, хемоаттрактант для активированных Т-лимфоцитов) среднее содержание в супернатантах монослойных культур составило: 33,62 пг/мл (min 1,5 – max 163,04 пг/мл), тогда как для сфероидов эти показатели были значительно выше: 306,22 пг/мл (min 10,16 – max 3327,24 пг/мл),  $p=0,011$  (рис. 10 Г).

Растворимый CX3CL1 является сильным хемоаттрактантом для Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов, в то время как связанный с клетками хемокин способствует прочной адгезии лейкоцитов к активированным эндотелиальным клеткам, где он в первую очередь экспрессируется. Увеличение продукции CX3CL1 было выявлено преимущественно для сфероидов МК: 1799,82 пг/мл (min 529,37 – max 4952,4 пг/мл) против 639,53 пг/мл (min 140,31 – max 1240,49 пг/мл) в монослойной культуре,  $p=0,021$ .

Опухолевые клетки, растущие в 2D-формате, продуцировали статистически значимо меньше CXCL16 (хемокин, привлекающий НКТ-клетки, участвующие в возникновении периферической толерантности): 4,59 пг/мл (min 0,14 – max 21,54 пг/мл) по сравнению с клетками в составе тумороидов: 26,06 пг/мл (min 2,0 – max 177,51 пг/мл),  $p=0,006$  (рис. 10 Д). Секреция MIF (фактор ингибирования миграции макрофагов, эволюционно древний цитокин, регулирующий многие процессы в организме, в том числе процессы воспаления), также изменялась в зависимости от условий культивирования: 37,19 нг/мл (min 3,08 – max 82,66 нг/мл) – в 2D-культурах до 82,02 нг/мл (min 37,69 – max 175,31 нг/мл) – в сфероидах ( $p=0,007$ ) (рис. 10 Е).

Наблюдали статистически значимое увеличение продукции IL-10, играющего роль в процессах опухолииндуцированной иммуносупрессии, в 3D-культуре по сравнению с монослоем: 237,24 пг/мл (min 7 – max 649,19 пг/мл) и 27,92 пг/мл (min 1,42 – max 107,39 пг/мл),  $p=0,00001$  соответственно (рис. 10 Ж). Обнаружили статистически значимое увеличение продукции лиганда активационного рецептора цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток MICA в 3D-культурах:

514,13 пг/мл (min 57,68– max 3537,5 пг/мл) по сравнению с монослоем: 250,16 пг/мл (min 15,63 – max 1818,5 пг/мл),  $p=0,024$  (рис. 10 З).

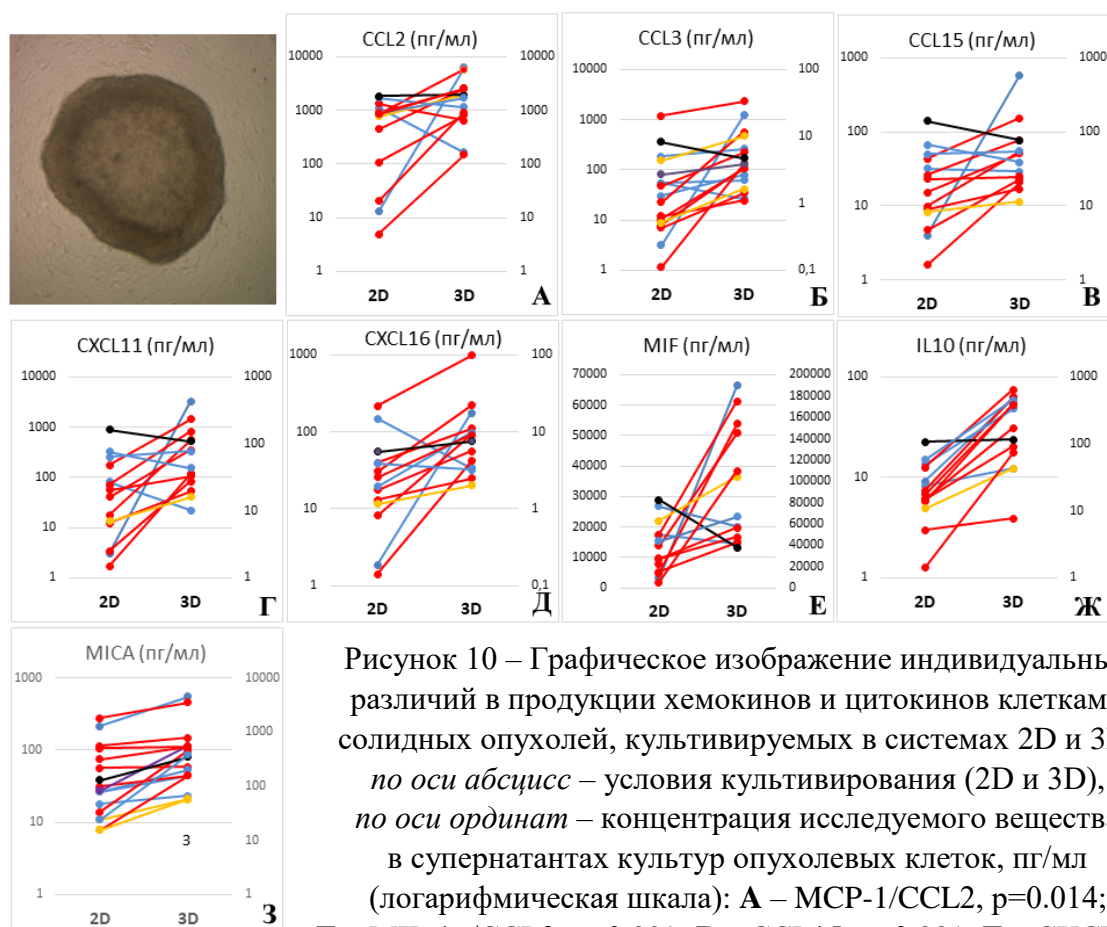


Рисунок 10 – Графическое изображение индивидуальных различий в продукции хемокинов и цитокинов клетками солидных опухолей, культивируемых в системах 2D и 3D: по оси абсцисс – условия культивирования (2D и 3D), по оси ординат – концентрация исследуемого вещества в супернатантах культур опухолевых клеток, пг/мл (логарифмическая шкала): **А** – MCP-1/CCL2,  $p=0.014$ ; **Б** – MIP-1 $\alpha$ /CCL3,  $p=0,029$ ; **В** – CCL15,  $p=0,031$ ; **Г** – CXCL11,  $p=0,011$ ; **Д** – SCYB16/CXCL16,  $p=0,006$ ; **Е** – MIF,  $p=0,007$ ; **Ж** – IL-10,  $p=0,00001$ ; **З** – MICA,  $p=0,024$

Гиперсекрецию ряда хемокинов в опухолях можно расценивать как активацию злокачественного процесса в трехмерном пространстве. Таким образом, пространственная организация клеточной модели *in vitro* оказывает влияние на метаболические и секреторные функции культивируемых клеток солидных опухолей, вызывая активацию процессов, связанных с формированием микроокружения, благоприятного для пролиферации и метастазирования, что указывает на необходимость воспроизводить среду обитания малигнизированных клеток, максимально приближая ее к естественной, для изучения регуляции туморогенеза.

Для имитации стромального компонента опухолевого очага была использована культура фибробластов FLECH вследствие установленного сходства ее секреторного профиля с таковым опухолеассоциированных фибробластов (CAF), способных продуцировать значительные количества IL-6, IL-8, MIF, HGF, FGF, SCF и ряд хемокинов [Fisher D.T. et al., 2014; Ling Z. et al., 2019; Mao X. et al., 2021]. Было проведено изучение инвазивных свойств клеток опухолей различного гистогенеза в составе гетеросфероидов в трехмерной среде матригеля.

Гетеросфероиды, полученные из клеток KPP #485, были более стабильны, чем гомосфероиды: через 24 ч гомосфероиды KPP #485 увеличивали занимаемую ими площадь в матригеле с  $79 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$  до  $580 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ , тогда как гетеросфероиды увеличивали первоначально занимаемую ими площадь до  $199 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$  (рис. 11 А). Такую же тенденцию наблюдали для сфероидов РП #291. Введение в клеточную конструкцию фибробластов влияло различным образом на скорость распространения клеток МК в матригеле: для трех культур из пяти скорость практически не менялась (рис. 11 Б, В). Усиление инвазивных характеристик гетеросфероидов было продемонстрировано для культур СМТ/ОС: изменение площади, занимаемой

гомосфероидом остеогенной саркомы #793, составило за 24 ч с  $31 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $289 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>, и к 48 ч –  $321 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> (рис. 11 Д). Присутствие фибробластов в гетеросфероиде через 24 ч способствовало увеличению занимаемой площади за тот же период времени  $25 \cdot 10^3$ – $521 \cdot 10^3$ – $663 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>. Подобный эффект усиления инвазивных характеристик наблюдали для клеток культуры синовиальной саркомы #716 (рис. 11 Г). В то же время скорость распространения в матрикеле гомо- и гетеросфероидов миксофибросаркомы #982 оставалась практически неизменной (рис. 11 Е).

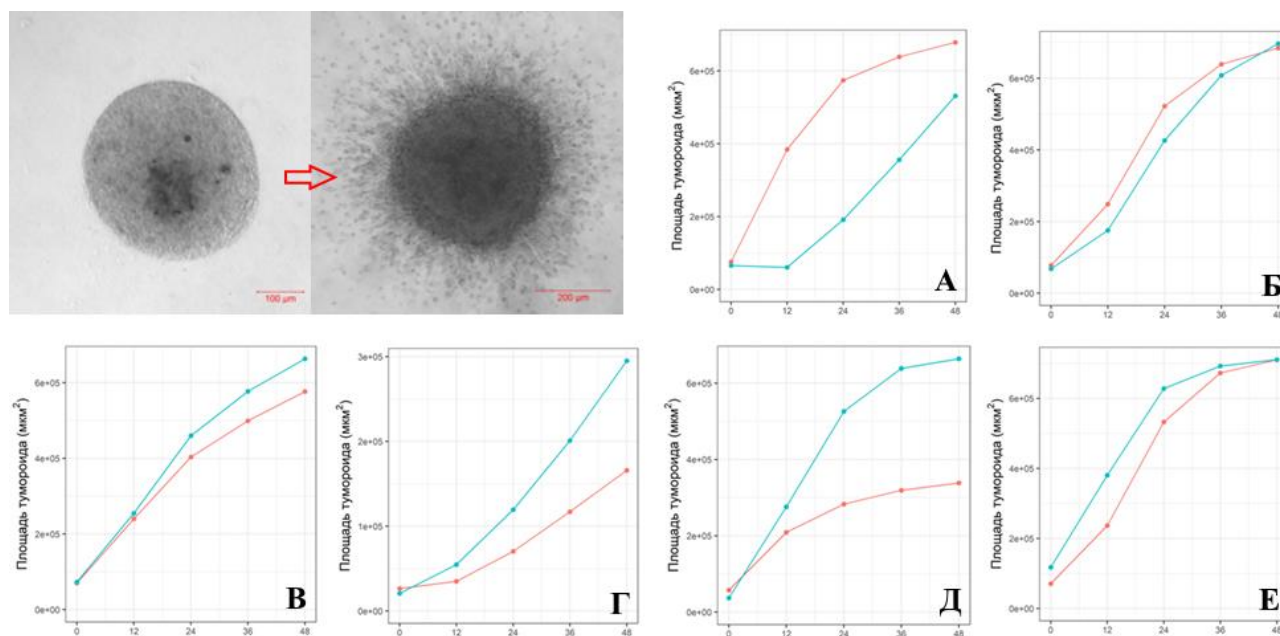


Рисунок 11 – Графическое изображение индивидуальных различий в динамике распространения в матрикеле гомо- и гетеросфероидов, полученных из опухолей различного гистогенеза:

А – #485 КРР; Б – #519 МК; В – #916 МК; Г – #716 синовиальная саркома;

Д – #793 остеогенная саркома; Е – #982 миксофибросаркома. Красной линией обозначена кривая изменения площади гомосфероидов, синей линией – гетеросфероидов. Время наблюдения – 48 ч

Скорость распространения гомосфероидов в трехмерной среде и коэффициент скорости инвазии (KS) опухолевых клеток, представляющий собой соотношение скорости движения опухолевых клеток в гомосфероиде и гетеросфероиде, выраженное в процентах, коррелировали с продукцией IL-8 ( $\rho=0,636$ ,  $p=0,035$ ), HGF ( $\rho=0,850$ ,  $p=0,004$ ), SCF ( $\rho=0,857$ ,  $p=0,014$ ), FST ( $\rho=0,685$ ,  $p=0,029$ ), Prolactin ( $\rho=0,810$ ,  $p=0,015$ ), PECAM-1 ( $\rho=0,788$ ,  $p=0,004$ ).

Опухолевые клетки, составляющие гетеросфероиды, которые характеризовались высокими значениями KS, секретировали большое количество цитокинов и факторов инвазии, что позволяет предполагать наличие аутокринного типа регуляции процессов миграции и инвазии, поэтому присутствие FLECN не оказывало существенного воздействия на подвижность злокачественных клеток, в то время как в гетеросфероиде, включающих опухолевые клетки с низкой секреторной активностью, регуляция могла осуществляться по паракринному пути, поэтому присутствие фибробластов индуцировало миграцию клеток опухолей. Факт тесного взаимодействия и реципрокного влияния CAF и малигнизированных клеток хорошо известен [Fiori M.E. et al., 2019]. Механизмы, лежащие в основе CAF-опосредованного контроля прогрессирования опухоли и устойчивости к терапии, включают индукцию эпителиально-мезенхимального перехода, активацию сигнальных путей, связанных с выживанием злокачественных клеток, обеспечивающих их пластичность и метаболическое перепрограммирование [Denton A.E. et al., 2018].

**Сравнительная характеристика пролиферативного и метастатического потенциала культивируемых клеток солидных опухолей.** Были изучены в условиях *in vitro* параметры миграции и инвазии культивируемых клеток солидных опухолей человека в связи с продукцией этими клетками спектра молекул, ассоциированных с инвазией, метастазированием,

иммуносупрессией. При этом использованы четыре параметра миграции и инвазии: инвазивный потенциал (IP) – соотношение количества инвазивных клеток к мигрирующим клеткам, выраженное в процентах; скорость миграции опухолевых клеток (MS), соответствующая скорости застывания «экспериментальной раны», определяемая с помощью системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ; Slope миграции (Slope<sub>Migr</sub>) и инвазии (Slope<sub>Inv</sub>) – параметры, характеризующие скорость миграции и инвазии малигнизированных клеток, вычисляемую с помощью клеточного анализатора xCelligence в режиме реального времени.

Все исследованные клеточные культуры солидных опухолей, полученные от разных больных, проявляли инвазивные свойства и демонстрировали различный IP (табл. 5).

Таблица 5 – Характеристики миграционных и инвазивных свойств культивируемых клеток солидных опухолей

Тип клеточной культуры/ кол-во образцов	Скорость миграции, мкм/ч M (min–max)	Инвазивный потенциал, % M (min–max)	Slope в процессе миграции $e^{-3}$ , 48 ч M (min–max)	Slope в процессе инвазии $e^{-3}$ , 48 ч M (min–max)
МК/29	25,30* 3,00–64,50	53,16 8,92–88,90	128,38 10,80–335,00	59,82* 3,20–197,70
СМТ/ОС/39	39,33* 9,60–68,90	43,96 1,96–99,50	125,84 17,40–369,20	95,32* 5,80–314,60
РП/2	39,00 28,80; 49,20	73,79 72,92; 74,67	249,75 159,50; 340,00	107,65 93,50; 120,00
КРР/1	20,40	5,16	79,00	132,00

*Примечание:* \* – различия по скорости миграции и инвазии (Slope) культивируемых клеток МК и СМТ/ОС статистически значимы,  $p < 0,05$  (согласно критерию Манна–Уитни). M – среднее значение.

Культивируемые клетки СМТ/ОС обладали большей подвижностью, чем клетки МК ( $p < 0,05$ ). Известно, что инвазия и метастазирование сарком ассоциированы с разнообразными стимулами опухолевого микроокружения, связанными с ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса, модуляцией жесткости клеточного цитоскелета, взаимодействием клеток с матриксом, влиянием многих сигнальных факторов и пространственных молекулярных градиентов [Kühnelt-Leddihn L. et al., 2012; Ehnman M. et al., 2019; Cidre-Aranaz F., 2021].

Статистически значимых различий скорости миграции и инвазии от длительности культивирования клеток (числа пассажей) выявлено не было. При использовании метода Краскела–Уоллиса обнаружены различия в величине IP: клетки СМТ/ОС метастатического происхождения имели более выраженный инвазивный потенциал, чем клетки, полученные из первичной опухоли или рецидива: IP  $18,11 \pm 3,05\%$ ,  $25,75 \pm 5,57\%$ ,  $52,97 \pm 5,64\%$ ,  $p < 0,05$ .

Известно, что хемокины и факторы роста являются ключевыми факторами опухолевой инвазии и облегчают интра- и экстравазацию малигнизированных клеток, инициируя образование метастазов. Опухолевые клетки продуцируют множество хемоаттрактантов для макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток, которые, в свою очередь, продуцируют вещества, стимулирующие миграцию злокачественных клеток [Mierke С.Т., 2019; Shi Y. et al., 2020]. Мы провели анализ корреляционных связей между параметрами миграции и инвазии клеток солидных опухолей человека и продукцией ими факторов, ассоциированных иммуносупрессией, метастазированием, а также экспрессией хемокиновых рецепторов, который позволил установить прямую корреляцию высокой силы между MS и относительным содержанием CCR10<sup>+</sup>-клеток МК ( $\rho = 0,682$ ,  $p = 0,007$ ), а также с продукцией PLGF ( $\rho = 0,772$ ,  $p = 0,009$ ). Скорость инвазии клеток МК, определяемая Slope<sub>Inv</sub>, коррелировала с MS ( $\rho = 0,541$ ,  $p = 0,002$ ), концентрацией IGF1P ( $\rho = 0,717$ ,  $p = 0,03$ ). Обратная корреляция средней силы наблюдалась для Slope<sub>Inv</sub> и продукции хемокина CCL2 ( $\rho = -0,550$ ,  $p = 0,018$ ). Кроме того, процентное содержание CCR10<sup>+</sup>-клеток было ассоциировано с продукцией PECAM-1 ( $\rho = 0,782$ ,

$p=0,004$ ), а уровень PLGF был связан с количеством CD133<sup>+</sup>-клеток ( $\rho=0,705$ ,  $p=0,023$ ). Количественное содержание CCL2, определяемое в супернатантах клеточных культур МК, коррелировало с продукцией клетками МК иммуносупрессивного фактора IL-10 ( $\rho=0,665$ ,  $p=0,029$ ).

Для клеток СМТ/ОС наблюдали корреляцию IP и MS ( $\rho=0,600$ ,  $p=0,000$ ),  $Slope_{Inv}$  и  $Slope_{Migr}$  ( $\rho=0,588$ ,  $p=0,000$ ). Обнаружили также положительную корреляцию высокой силы между IP и продукцией факторов HB-EGF ( $\rho=0,643$ ,  $p=0,010$ ), IGFBP-I ( $\rho=0,857$ ,  $p=0,014$ ), PLGF ( $\rho=0,786$ ,  $p=0,036$ ), PECAM-1 ( $\rho=0,882$ ,  $p=0,000$ ), FST ( $\rho=0,685$ ,  $p=0,014$ ), IL-8 ( $\rho=0,733$ ,  $p=0,025$ ) и SCF ( $\rho=0,883$ ,  $p=0,002$ ). В супернатантах культур СМТ/СО  $Slope_{Inv}$  коррелировал с количественным содержанием FST ( $\rho=0,678$ ,  $p=0,015$ ) и SCF ( $\rho=0,767$ ,  $p=0,016$ ). Выявленные статистические закономерности указывают на наличие сложных реципрокных коррелятивных взаимодействий, позволяющих опухолевым клеткам реализовывать свой инвазивный и метастатический потенциал. В случае МК была обнаружена положительная корреляция средней силы между количественным выражением интенсивности экспрессии гена *PRAME* и величиной  $Slope_{Migr}$  ( $r=0,485$ ,  $p=0,048$ ), а также обратная корреляция средней силы между экспрессией гена *PASDI* и  $Slope_{Inv}$  ( $r=-0,486$ ,  $p=0,048$ ). Для клеток СМТ/ОС была обнаружена взаимосвязь между интенсивностью экспрессии *SSX1* и  $Slope_{Inv}$  ( $r=0,469$ ,  $p=0,043$ ). Эти данные согласуются с имеющим место представлением о способности малигнизированных клеток реализовать программы функционирования аномально экспрессируемых генов для формирования инвазивного фенотипа [Maine E.A. et al., 2016; Wang D. et al., 2016; Al-Khadairi G. et al., 2019].

Согласно данным измерения электрического импеданса на приборе xCelligence, в большинстве случаев наблюдали «скачкообразный переход» малигнизированных клеток через поры мембраны (миграция) и через матрикель (инвазия) (рис. 12-1).

В диапазоне времени 20–40 ч большая часть клеток перемещалась через пористую мембрану и расплаывалась на ее обратной поверхности, покрытой электродами, что нашло выражение в резком, скачкообразном изменении клеточного индекса (CI), который в дальнейшем практически не менялся с течением времени. Использование специальных мембран с порами 8 мкм позволяло визуализировать процесс миграции и инвазии (рис. 12-2, 3).

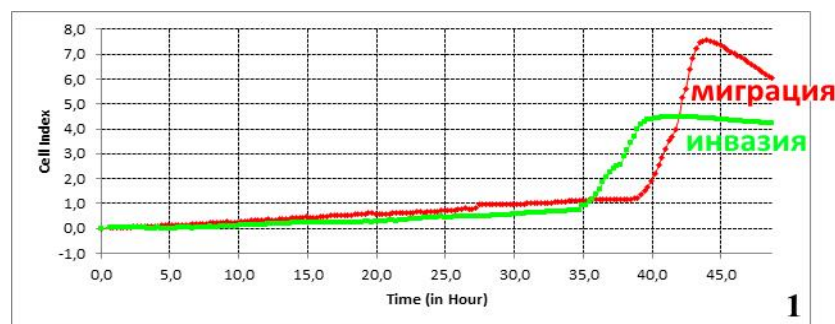
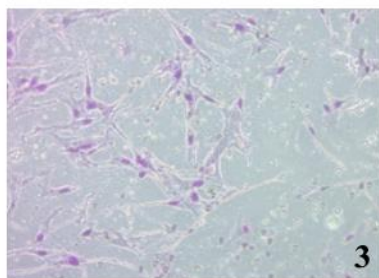
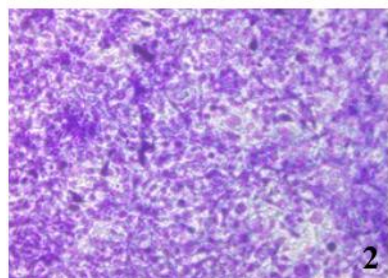


Рисунок 12 – Динамика движения в процессе миграции и инвазии культивируемых клеток солидных опухолей:

- 1 – динамика CI в процессе миграции и инвазии клеток МК #520, 75 пассаж, оцениваемая в режиме реального времени xCELLigence;
  - 2 – визуализация мигрировавших клеток РП #584, 35 пассаж;
  - 3 – визуализация клеток РП #584, 35 пассаж, способных к инвазии.
- Окраска по Гимзе, инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$



При изучении состава популяции культивируемых клеток солидных опухолей, для которых были определены параметры миграции и инвазии, было обнаружено, что 65,3% (17 из 26) клеточных культур МК и 72,7% (8 из 11) СМТ/ОС распались по размеру клеток и их гранулярности на две субпопуляции, которые статистически значимо различались по содержанию Ki-67<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, CCR10<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>-клеток ( $p<0,05$ ). В 11 из 17 клеточных культур МК популяция, которая преобладала численно, имела большее количество CD133-позитивных клеток, в то время как менее численная популяция характеризовалась повышенным пролиферативным потенциалом

и имела большее количество клеток, несущих хемокиновые рецепторы CCR10, CCR7, CCR4, а также молекул Nrp-1. В случае СМТ/ОС выявленные субпопуляции количественно были одинаковыми, но различались по относительному содержанию CD133<sup>+</sup>-клеток (13,63±2,63% и 4,66±1,73% соответственно) и CCR10<sup>+</sup>-клеток (11,95±1,44% и 48,52±9,50% соответственно,  $p < 0,05$  (согласно методу Манна–Уитни).

Таким образом, в нашем исследовании был выявлен целый спектр корреляционных связей между параметрами миграции и инвазии клеток солидных опухолей в системе *in vitro* и опухолеассоциированными факторами, способствующими иммуносупрессии, метастазированию, пролиферации малигнизированных клеток. Можно предполагать, что биологически «агрессивный» фенотип культивируемых клеток МК и СМТ/ОС связан с экспрессией раково-тестикулярных генов *PRAME*, *PASD1*, *SSX1*, продукцией HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8. Эти факторы возможно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

**Моделирование *in vitro* влияния супрессивного опухолевого микроокружения на функции дендритных клеток.** Для изучения особенностей подвижности созревающих ДК под влиянием продуктов, синтезируемых опухолевыми клетками, нами была создана система кокультивирования *in vitro* с клетками МК, полученными от разных больных, позволяющая оценивать скорость, траекторию и направление движения ДК. В каждом поле зрения фиксировали не менее 10 ДК, за которыми вели наблюдение с помощью автоматической системы контроля живых клеток Cell-IQ. Характер движения ДК определяли по пройденной ими дистанции за период наблюдения, длине траектории, скорости прохождения траектории в выбранный период времени и углу движения клеточной популяции, определяющему общее направление движения ДК (табл. 6).

Таблица 6 – Параметры траекторий движения незрелых ДК, кокультивируемых с клетками МК, полученными от разных больных

Культура МК / пассаж	Время наблюдения, ч	Кол-во полей зрения, п	Среднее кол-во ДК в поле зрения, п	Пройденная дистанция, мкм	Длина траектории, мкм	Средняя скорость прохождения траектории, мкм/ч	Угол движения клеточной популяции, °
#226/15	24	10	13	213,5±6,67	2094,2±15,43	88,3±1,79	51,6±3,45
#283/15	22	8	10	102,5±4,32	398,4±12,33	17,4±1,98	340,2±9,41
#311/35	24	9	15	94,9±9,49	374,9±19,20	16,1±1,05	343,6±3,35
#643/30	24	10	15	132,9±5,43	1121,2±74,73	41,4±1,69	130,6±10,72
#685/25	34	10	12	155,0±8,92	1481,0±24,78	48,6±4,70	144,0±5,23
#686/15	34	8	20	241,0±14,34	2556,0±56,11	75,26±1,65	135,7±2,25
#694/15	26	8	15	168,0±18,0	1345,2±39,59	52,4±1,63	333,6±8,54
#894/25	22	10	12	291,8±31,07	1423,3±105,21	30,1±2,23	324,5±18,30

Наблюдали большую вариабельность всех параметров: средняя скорость прохождения траектории была минимальной при кокультивировании с культурой #311 (16,1±1,05 мкм/ч) и максимальной в присутствии культуры #226 (88,3±1,79 мкм/ч). Угол движения популяции ДК, кокультивируемых с клетками меланомы #226 был наименьшим и составил 51,6±3,45 °, в то время как в присутствии клеток меланомы #311 этот показатель определялся как 343,6±3,35 °.

Для того чтобы выявить факторы, имеющие наибольшее воздействие на миграцию ДК, был проведен анализ зависимости средней скорости движения ДК от ИСФ, обнаруживаемых в супернатантах культур малигнизированных клеток. Было выявлено наличие обратной корреляции высокой силы с содержанием ИСФ: TGF-β<sub>1</sub>, IL-10, VEGF-A, EGF, FGF, HGF ( $p < 0,01$ ). Под влиянием ИСФ менялась не только скорость движения ДК, но и характер движения, которое становилось более хаотичным и разнонаправленным. Чтобы проверить гипотезу возможной зависимости направленности движения ДК от выраженности экспрессии дифференцировочных

ОАА и РТА на опухолевых клетках, был проведен корреляционный анализ, который выявил наличие обратной зависимости высокой силы угла движения популяции ДК от количества клеток, несущих антигены Melan A, тирозиназа, MAGE, BAGE, NY-ESO-1 ( $p > 0,01$ ). Для уточнения характера воздействия отдельных опухолеассоциированных ИСФ на подвижность ДК в изучаемую систему вводили IL-10 в концентрации 1 нг/мл, TGF- $\beta_1$  – 10 нг/мл, VEGF-A – 50 нг/мл. Результаты анализа движения ДК в различных условиях в системе кокультивирования с клетками МК #894 представлены в табл. 7.

Таблица 7 – Параметры траекторий движения незрелых ДК, кокультивируемых с клетками МК #894, оцениваемых в различных условиях

Клеточная система	Время наблюдения, ч	Кол-во полей зрения, п	Кол-во тестируемых клеток (min-max)	Пройденная дистанция, мкм	Длина траектории, мкм	Средняя скорость прохождения траектории, мкм/ч	Угол движения клеточной популяции, °
Контроль, без воздействия	47	8	12–15	291,6±31,07	1423,3±105,21	30,1±2,23	324,5±18,30
TGF- $\beta_1$	47	8	15–18	136,0±7,32	676,0±20,46	14,3±0,42	234,0±3,85
p				0,042	0,009	0,009	0,051
IL-10	47	8	11–15	44,5±1,84	224,3±10,76	10,5±0,52	254,3±11,01
p				0,004	0,001	0,002	0,066
VEGF	47	6	10–17	176,5±32,54	881,4±88,90	18,7±1,89	289,1±35,55
p				0,068	0,005	0,006	0,067

Наибольшим воздействием обладал IL-10, в присутствии которого средняя скорость движения ДК снизилась почти в три раза (с 30,10±2,23 до 10,45±0,52 мкм/ч). Метод центрирования траекторий ДК позволил определить направленность движения популяций ДК: в контрольных образцах ДК мигрировали преимущественно в сторону популяции клеток МК, в присутствии TGF- $\beta_1$  и VEGF-A траектории ДК сокращались, но общее направление движения сохранялось.

Под воздействием IL-10 дистанция, пройденная ДК, была минимальной, и процентное распределение клеток по протяженности траектории показало нарастание хаотичности движения. Таким образом, изученные ИСФ блокировали миграционные способности ДК в экспериментальной системе.

ДК представляют собой сложную многообразную клеточную популяцию, задача которой распознавать, захватывать и доставлять антигены Т-лимфоцитам. Это предопределяет способность ДК к активной миграции в сложной трехмерной среде, населенной другими клеточными элементами. Клеточная организация опухолевого микроокружения представляет собой сложную живую систему с комплексом различных стимулов, которые влияют на все аспекты биологии ДК и, таким образом, управляют их функционированием и жизнеспособностью [Hargadon K.M. et al., 2016; Fu C., Jiang A., 2018; Gupta Y.H. et al., 2022].

Проведенное исследование дает возможность объяснить факт малого количества (<1%) активированных ДК, меченных радиоактивным йодом, которые смогли достигнуть лимфатических узлов после внутрикожной инъекции пациентам с диссеминированными формами МК [De Vries I.J.M. et al., 2003].

**Оценка влияния свойств клеток солидных опухолей на взаимодействия с активированными цитотоксическими Т-лимфоцитами *in vitro*.** При применении противоопухолевых вакцин на основе активированных ДК критическим моментом является формирование иммунных синапсов: взаимодействие вакцинных ДК с Т-лимфоцитами и

формирование клонов специфически активированных ЦТЛ, способных, в свою очередь, атаковать опухолевые клетки-мишени. Использование эффективной клеточной модели, позволяющей оценить качество функционирования иммунных синапсов, представляется важным этапом разработки и совершенствования новых средств клеточной противоопухолевой иммунотерапии. Этапы создания клеточной модели отражены на рис. 13.

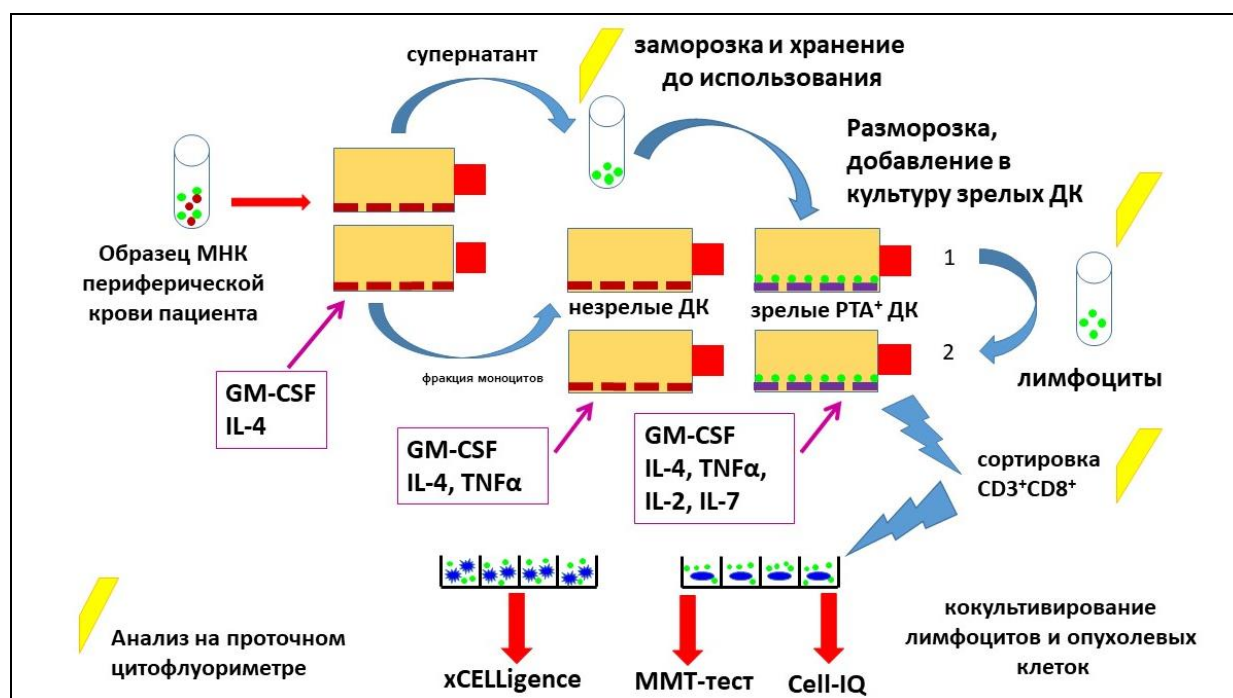


Рисунок 13 – Схема экспериментального моделирования взаимодействия специфически активированных ЦТЛ и опухолевых клеток для оценки эффективности иммунологического синапса

Для получения ДК и ЦТЛ были использованы мононуклеарные клетки, выделенные методом центрифугирования в градиенте плотности (Boyum A., 1968). После выделения моноцитов для направленной дифференцировки ДК был проведен анализ лимфоцитарной фракции, где до 99,6% клеток представляли собой субпопуляции лимфоцитов, при этом  $CD3^+CD8^+$ -лимфоциты составляли не менее 27% от  $CD14$ -негативной субпопуляции. Далее кокультивировали лимфоциты и ДК, активированные после нагрузки клеточным препаратом IRTAN-2018. Прижизненное наблюдение в системе Cell-IQ продемонстрировало в смешанных культурах ДК и лимфоцитов формирование контактов активированных ДК с лимфоцитами, которые концентрировались вокруг ДК в виде «грозди». После кокультивирования лимфоцитарной фракции с активированными ДК клеточная суспензия, содержащаяся в надсадке, была представлена ЦТЛ ( $CD3^+CD8^+$ ) от 12,8 до 30,2%, где большая часть клеток имела фенотип  $HLADR^+CD38^+CD95^+perforin^+granzymeB^+$ , причем 20% клеток было позитивно в отношении  $INF-\gamma$ . Далее проводили обогащение активированными ЦТЛ полученной клеточной популяции с помощью негативного магнитного клеточного сортирования и использовали в системе кокультивирования с опухолевыми клетками, которую мониторировали путем наблюдения на приборе Cell-IQ. Подбирали клеточные компоненты (опухолевые клетки и ЦТЛ), экспрессирующие HLA A\*02. Для лучшей визуализации объектов использовали флуоресцентный краситель, которым окрашивали мембраны ЦТЛ (рис. 14). Анализ эффективности взаимодействия активированных ЦТЛ и опухолевых клеток осуществляли тремя способами: 1) путем создания библиотеки клеточных образцов в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ с последующим подсчетом количества адгезированных клеток; 2) с помощью МТТ-теста, позволяющего оценить цитотоксическое воздействие; 3) с использованием технологии xCelligence, дающей возможность оценить клеточную пролиферацию в режиме реального времени.



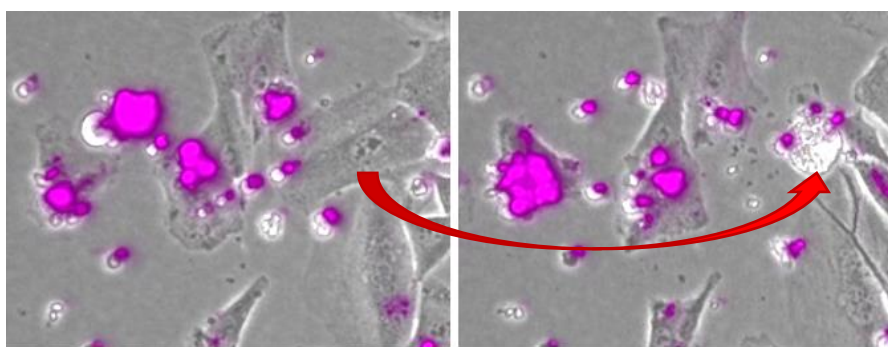


Рисунок 14 – Идентификация активированных ЦТЛ с помощью окрашивания мембраны CellVue Claret FAR red (Sigma-Aldrich, США), совмещенное изображение: фазовый контраст и флуоресценция. Cell-IQ, прижизненное изображение, ув.  $\times 200$ .

Стрелка указывает на лизированную опухолевую клетку

С помощью прибора Cell-IQ в 2 (15,5%) случаях выявлено полное торможение роста культуры за 90 ч наблюдения; в 53,8% случаев (7/13) – частичное торможение роста культуры опухолевых клеток; в 4 из 13 (30,7%) опухолевые клетки оказались резистентными к воздействию активированных ЦТЛ, индекс жизнеспособности (ИЖ) в системе кокультивирования на 90 ч наблюдения оказался сопоставим с аналогичным показателем в контрольной культуре (рис. 15).

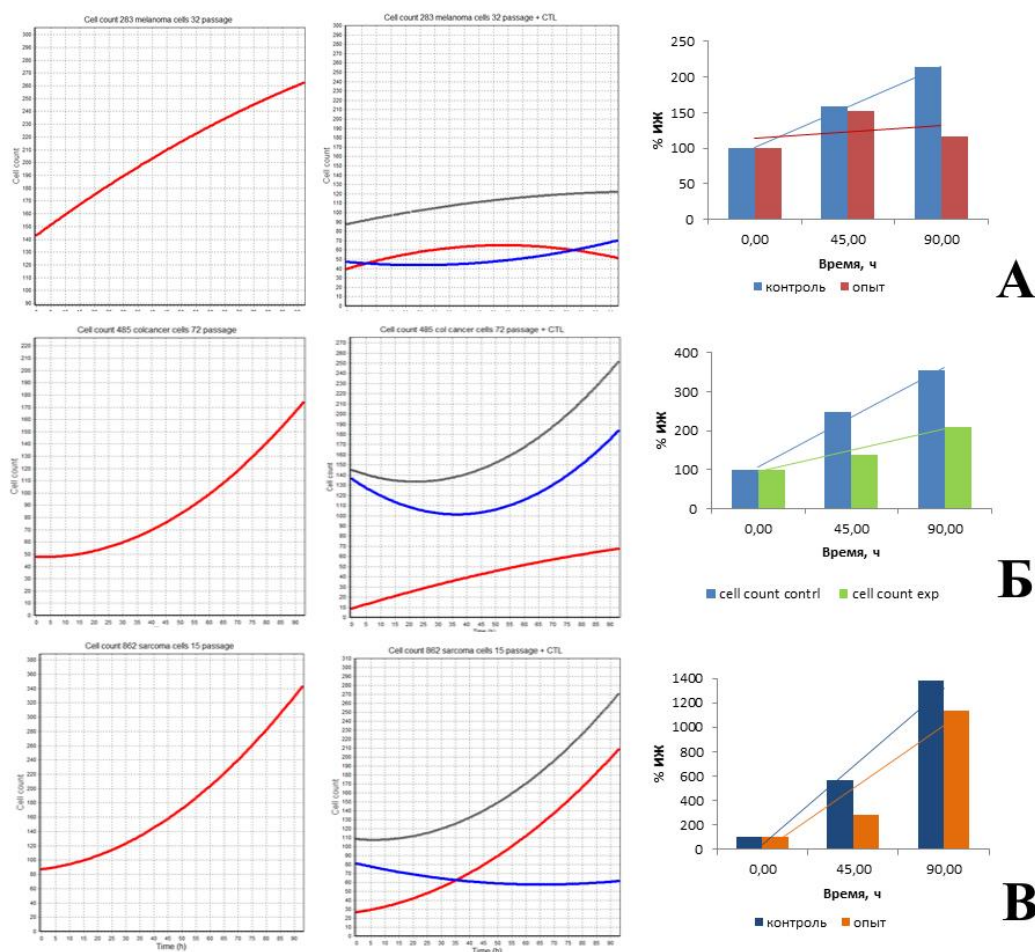


Рисунок 15 – Графическое изображение взаимодействия активированных ЦТЛ и опухолевых клеток в системе Cell-IQ: **А** – культура МК #283, 12 пассаж; **Б** – культура КРР #485, 72 пассаж; **В** – культура синовиальной саркомы #710, 16 пассаж. Общее время наблюдения 90 ч. Красная линия – количество живых адгезированных клеток в модельной системе, синяя линия – количество лимфоцитов. Гистограммы отражают динамику ИЖ опухолевых клеток, вычисляемого как процент живых опухолевых клеток в данный момент времени по отношению к стартовой концентрации, фиксируемой системой визуализации Cell-IQ

При определении жизнеспособности опухолевых клеток в ММТ-тесте ИЖ (отношение оптической плотности в опыте и контроле, выраженное в процентах) для наименее резистентных культур составил 2,71% и 8,56% соответственно. Для клеток СМТ/ОС статистически значимые различия между опытными и контрольными образцами наблюдали в 45,5% случаев (5/11),  $p < 0,05$ . Сравнение количественного содержания ИСФ в супернатантах культивируемых малигнизированных клеток и показателей ИЖ в ММТ-тесте продемонстрировало наличие положительной корреляции высокой силы между величиной ИЖ и концентрацией IL-6 ( $\rho = 0,745$ ,  $p < 0,001$ ), IL-8 ( $\rho = 0,665$ ,  $p < 0,001$ ), IL-10 ( $\rho = 0,607$ ,  $p < 0,001$ ), TGF- $\beta_1$  ( $\rho = 0,761$ ,  $p < 0,001$ ), MICA ( $\rho = 0,748$ ,  $p < 0,001$ ), VEGF ( $\rho = 0,662$ ,  $p < 0,001$ ). В группе культур клеток МК была обнаружена обратная корреляция высокой силы между ИЖ и количеством клеток, позитивных по антигенам CD63 ( $\rho = -0,637$ ,  $p = 0,019$ ), Melan A ( $\rho = -0,643$ ,  $p = 0,018$ ), Tyros ( $\rho = -0,783$ ,  $p = 0,002$ ), CD146 ( $\rho = -0,597$ ,  $p = 0,031$ ), MAGE1 ( $\rho = -0,605$ ,  $p = 0,028$ ), HLA I ( $\rho = -0,602$ ,  $p = 0,029$ ). Для всех культур солидных опухолей была выявлена взаимосвязь между ИЖ и транскрипционной активностью гена *PRAME* ( $\rho = -0,945$ ,  $p = 0,0001$ ). В клеточном анализаторе xCelligence цитотоксичность Т-клеток оценивали по интенсивности роста клеток-мишеней в/без присутствия клеток-эффекторов, при этом максимальная эффективность взаимодействия была зафиксирована при соотношении концентраций мишень/эффектор 1/50 (рис. 16-1-4).

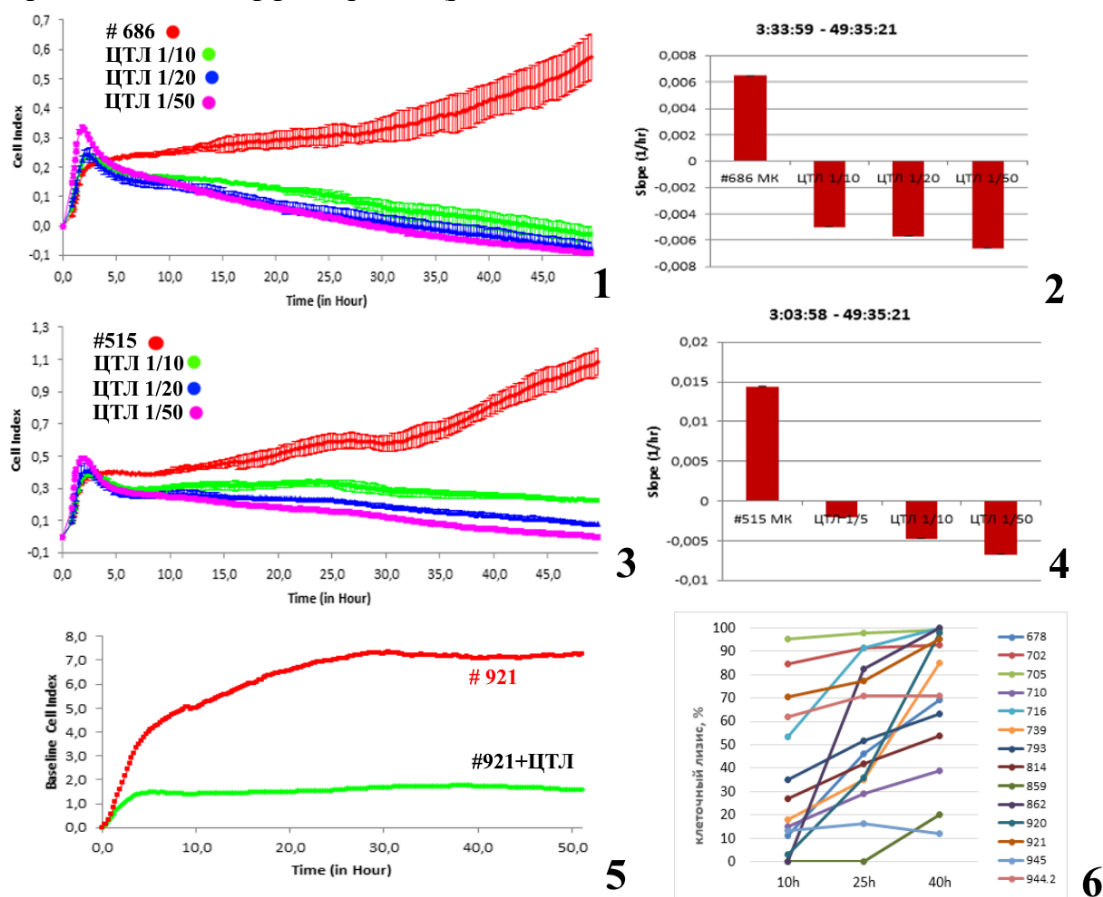


Рисунок 16 – Графическое изображение результата взаимодействия специфически активированных ЦТЛ клеток МК: регистрация клеточного индекса во времени и скорость роста культуры под воздействием разного количества ЦТЛ. 1, 2 – культура #686 МК; 3, 4 – культура #515 МК. ■ интактные клетки, ■ ЦТЛ 1/10, ■ ЦТЛ 1/20, ■ ЦТЛ 1/50; 5 – рост культуры остеогенной саркомы #921 при кокультивировании ЦТЛ в соотношении 1/50; 6 – динамика клеточного лизиса в процессе взаимодействия Т-лимфоцитов и клеток СМТ/ОС

Величины параметра Slope за 48 ч наблюдения были негативными в присутствии Т-лимфоцитов, что свидетельствовало о торможении роста культуры опухолевых клеток, в отличие от контрольной культуры без воздействия (см. рис. 16-2, 4). Так как ранее было выявлено сходство профилей экспрессии РТГ в культивируемых клетках МК и СМТ/ОС, для проверки гипотезы

о возможности генерации ЦТЛ, реактивных по отношению к опухолевым клеткам, имеющим разное гистотипическое происхождение, но экспрессирующим РТА, в качестве клеток-мишеней были выбраны культуры СМТ/ОС. Воздействие ЦТЛ оказалось наиболее эффективным в культурах СМТ/ОС, которые имели выраженную транскрипционную активность РТГ. Процент лизированных клеток увеличивался с течением времени и достигал максимума к 40 ч наблюдения, при этом показатели киллинга через 25 и 40 ч положительно коррелировали между собой ( $\rho=0,881$ ,  $p<0,001$ ). Минимальный лизис составил 12% для культуры липосаркомы #945, в клетках которой не экспрессировались изучаемые РТГ. В 5 случаях из 15 клеточный киллинг приближался к 100% (рис. 16-5, 6). Процентное количество лизированных клеток СМТ/ОС, определяемое по изменению CI, коррелировало с наличием экспрессии генов *PASD1* ( $\rho=0,522$ ,  $p=0,046$ ) и *PRAME* ( $\rho=0,686$ ,  $p=0,005$ ). Данные кластеризации по экспрессии РТГ в культивируемых клетках СМТ/ОС соответствовали эффективности лизиса, то есть гибель клеток культур СМТ/ОС, находящихся в кластере с минимальным уровнем экспрессии РТГ, составляла к 40 ч наблюдения менее 70%, в то время как для культур с высоким уровнем экспрессии этот параметр приближался к 100% уже через сутки от начала эксперимента.

Таким образом, использование экспериментальной модели взаимодействия специфически активированных Т-лимфоцитов с культивируемыми клетками солидных опухолей продемонстрировало, что индивидуальный антигенный профиль клеток опухоли и их способность нарабатывать ИСФ имеют значение для эффективности иммунных синапсов и цитолитических реакций. Предложенная клеточная модель продемонстрировала принципиальную возможность использования РТА<sup>+</sup>-лизатов клеток МК для активации ДК с целью генерации ЦТЛ, реактивных по отношению к клеткам других опухолей, имеющим сходный РТА-профиль.

**Исследование иммуносупрессивных факторов как биомаркеров эффективности клеточной иммунотерапии.** Базируясь на полученных нами экспериментальных данных, мы выдвинули гипотезу, что метаболические свойства клеток злокачественных новообразований, позволяющие создавать микроокружение, которое благоприятствует дальнейшей диссеминации опухоли в организме, являются универсальным механизмом, способным существенно ограничивать клиническую эффективность клеточной иммунотерапии. Целью данной части работы явилось подтверждение потенциальной прогностической и предиктивной значимости продукции опухолевыми клетками ИСФ МІСА, TGF- $\beta_1$ , IL-10 и VEGF у больных МК, РП, СМТ, получавших клеточную иммунотерапию аутологичными опухолевыми клетками, модифицированными геном *tag7/PGRP-S* (ГМВ), и аутологичными активированными дендритными клетками (ДКВ). Исследование количественного содержания ИСФ в супернатантах культур малигнизированных клеток пациентов показало, что концентрация всех исследуемых ИСФ в супернатантах клеток больных с недостаточным эффектом была статистически значимо выше, чем у больных с достаточным эффектом,  $p<0,05$  (табл. 8).

Таблица 8 – Количественное содержание ИСФ в супернатантах культур опухолевых клеток пациентов с ДЭ и НДЭ

ИСФ	MICA, пг/мл		TGF- $\beta_1$ , нг/мл		IL-10, пг/мл		VEGF, пг/мл	
	ДЭ	НДЭ	ДЭ	НДЭ	ДЭ	НДЭ	ДЭ	НДЭ
Эффект								
Перцентиль (25–75%)	35,56– 182,00	253,24– 1225,97	0,98– 2,93	5,64– 17,94	0,51– 2,28	4,26– 26,87	378,45– 1533,00	3314,25– 5525,28
Медиана	170,9	1074,91	1,6	9,64	0,95	9,30	882,5	4448,89

Была изучена прогностическая роль каждого ИСФ в отдельности при оценке клинической эффективности специфической клеточной иммунотерапии. ROC AUC (площадь под ROC-кривой) для IL-10 составила 64,3%, VEGF – 66,4%, MICA – 65,5%, TGF- $\beta_1$  – 69,5%. Для определения возможности прогнозирования достаточности эффекта нами был использован метод построения деревьев принятия решений. В модель были включены следующие критерии: тип опухоли (МК, СМТ, РП), метод лечения, наличие отдаленных метастазов и уровни ИСФ. Точность прогнозирования с использованием подобного подхода превышала точность использования отдельных факторов и составляла, по данным кросс-проверки, 74,4% (чувствительность – 76%,

специфичность – 72,2 %). Наиболее значимым фактором оказался TGF- $\beta_1$ , пациенты имели благоприятный прогноз при его концентрации от 1,4 до 3,0 нг/мл. Пороговым значением для MICA была концентрация 574,7 пг/мл, для IL-10 – 10,5 пг/мл. При этом указанные выше клинические параметры не имели решающего значения в модели.

Для определения прогностической роли ИСФ были построены многофакторные модели Кокса, оценивающие ОВ и ВДП пациентов МК как наибольшей из имеющихся групп. В качестве факторов в модель были включены: вид терапии (ДКВ или ГМВ), стадия заболевания, паллиативный или адъювантный характер лечения, концентрации ИСФ в супернатантах культур опухолевых клеток. Уровни TGF- $\beta_1$  и MICA оказались значимыми независимыми факторами прогноза ОВ пациентов с МК. Так, MICA повышал риск смерти больного на 0,04% за каждую единицу увеличения уровня фактора. С учетом высокого разброса значений данного фактора в нашем исследовании (min 7,5 пг/мл – max 5870,0 пг/мл), значимость влияния показателя на продолжительность жизни может быть весьма велика. TGF- $\beta_1$  повышал риск на 3,4% за единицу увеличения уровня фактора при диапазоне его измерений в исследовании от 0,125 до 62,15 нг/мл, что свидетельствует о более сильном влиянии TGF- $\beta_1$  по сравнению с MICA. При анализе ВДП уровень VEGF был значимым, повышая риск прогрессирования на 0,03% на каждую единицу увеличения концентрации фактора. Высокие значения уровня VEGF в нашем исследовании (от 12,59 до 12389,5 пг/мл) свидетельствуют о значительном вкладе данного показателя в прогностическую модель. IL-10 не добавлял дополнительной прогностической информации ни в одну модель прогнозирования ( $p > 0,1$ ).

Для валидации полученных данных оценивали больных с высокой вероятностью НДЭ, по результатам прогнозирования, как пациентов с высоким риском, остальных пациентов – как больных с низким риском. Полученный результат оценки рисков прогрессирования, на основании количественного содержания ИСФ, был применен в однофакторном и многофакторном анализе. При однофакторном анализе уровень риска определял ОВ как в общей популяции (медиана для больных с высоким риском составила 15 мес., с низким риском – 38,7 мес.,  $p = 2 \cdot 10^{-5}$ ), так и при адъювантной терапии МК (с высоким риском – 30,3 мес., с низким риском – не достигнута,  $p = 5 \cdot 10^{-5}$ ). Мощность исследования оказалась недостаточной для получения статистически значимых различий по ОВ у больных МК, получавших самостоятельное паллиативное лекарственное лечение ( $p = 0,101$ ), но никто из больных с высоким риском не пережил 3 года.

Как показали наши исследования, ИСФ, которые продуцируются клетками злокачественных новообразований, могут быть использованы в качестве дополнительного источника биомаркеров при прогнозировании эффективности лечения. Благодаря технологическим особенностям метода создания клеточных противоопухолевых вакцин на основе собственных опухолевых клеток пациентов или аутологичных клеток иммунной системы, мы можем использовать культуру малигнизированных клеток как источник этих биомаркеров. В иммунологически толерантном микроокружении опухоли может быть реализовано множество механизмов резистентности за счет повышения концентрации разнообразных биологически активных молекул в опухолевом очаге или на системном уровне, в кровотоке. Мы проанализировали секрецию четырех факторов (MICA, TGF- $\beta_1$ , IL-10 и VEGF), имеющих плеiotропные функции в организме и различные механизмы действия, но в высоких концентрациях способные блокировать специфическую активность антиген-презентирующих клеток и ЦТЛ. Анализ клинической эффективности клеточной иммунотерапии показал зависимость ОВ и ВДП больных МК от концентраций ИСФ, продуцируемых культурами малигнизированных клеток *in vitro*, что можно экстраполировать на ситуацию *in vivo*. При этом необходимо отметить, что иммуносупрессивное воздействие изученных факторов носит универсальный характер и не зависит от типа противоопухолевой вакцины (ГМВ или ДКВ), а также от типа злокачественного новообразования. Полученные экспериментальные результаты влияния ИСФ на подвижность ДК и активность ЦТЛ согласуются с анализом клинической эффективности клеточной иммунотерапии. Таким образом, экспериментальные данные убедительно демонстрируют важность этих критериев для изучения на клиническом уровне и представляют возможное биологическое объяснение выявленному нами феномену.

На сегодняшний день известно, что различные методы иммунотерапии обладают разным воздействием на ключевые иммунопатогенетические синдромы, сопровождающие развитие злокачественной опухоли [Новик А.В. и соавт., 2021; Chen D.S., Mellman I., 2017]. Негативные результаты, полученные в широкомасштабных исследованиях клеточных противоопухолевых вакцин, таких как CancerVax [Faries M.V. et al., 2017] и DERMA [Dreno B. et al., 2018], указали на необходимость создания новых, более сложных стратегий противоопухолевой вакцинотерапии, основанных на достижениях изучения опухолевого микроокружения и антигенных, метаболических, секреторных свойств малигнизированных клеток. Так называемые «ДК-вакцины второго поколения» рассматриваются как более перспективные [Bryant C.E. et al., 2019]. При разработке подобных технологий качественные и количественные характеристики антигенов, а также ИСФ, нарабатываемых опухолевыми клетками, которые оказывает решающее влияние на терапевтическую эффективность, должны стать одним из основных этапов процесса создания иммунотерапевтического клеточного продукта. Клеточные модели, позволяющие оценить качество возникающих иммунологических синапсов на стадии взаимодействия активированных ДК с Т-лимфоцитами и специфически активированных ЦТЛ с клетками опухолей *in vitro*, могут быть использованы для предварительной оценки оправданности применения тех или иных подходов при создании новых противоопухолевых вакцин. Полученные нами результаты демонстрируют важность создания жестких критериев отбора пациентов для клеточной иммунотерапии с учетом биологических характеристик злокачественных опухолей. Уникальным источником такой информации для клеточной иммунотерапии могут стать культуры аутологичных опухолевых клеток. Наше исследование показало высокую предиктивную и прогностическую ценность продукции опухолевыми клетками ИСФ для клеточной иммунотерапии. Данная информация может быть использована на уровне пациента при планировании дальнейших исследований клеточных методов иммунотерапии, направленных на оптимизацию презентации ОАА клеткам иммунной системы.

## ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция охарактеризованных клеточных культур солидных опухолей, насчитывающая 575 образцов. В результате длительного культивирования получено 110 (13,63%) клеточных линий солидных опухолей, обладающих стабильными пролиферативными характеристиками. Запатентовано 12 клеточных линий, представляющих интерес в качестве клеточных моделей для экспериментальных и клинических исследований.

2. Продемонстрировано, что на ранних пассажах ( $\leq 10$ ) клетки солидных опухолей сохраняют антигенные свойства исходной ткани. При длительном культивировании происходят изменения, связанные с обеднением специфического антигенного профиля и антигенов HLA I класса, появления молекул HLA II класса, усиления презентации антигенов, ассоциированных с процессами пролиферации, инвазии и метастазирования. После 100 пассажа только 4,61% клеточных линий меланомы кожи (МК) сохраняют стабильно воспроизводимый специфический антигенный профиль.

3. Выявлены различия в антигенном профиле культивируемых клеток, полученных из первичных опухолей, рецидивов и метастазов: метастатические клетки МК характеризуются более выраженной презентацией антигенов HLA DP/DQ/DR, меньшим количеством S100<sup>+</sup>-клеток ( $p < 0,05$ ), усилением пролиферативной активности, а также повышенной транскрипционной активностью раково-тестикулярных генов (РТГ) *MAGEA1* и *SLLP1* ( $p = 0,019$  и  $p = 0,043$  соответственно). Экспрессия РТГ *GAGE* и *PASDI* в клетках солидных опухолей имеет гендерные различия и повышена в клеточных образцах больных женского пола ( $p = 0,037$  и  $p = 0,0024$  соответственно).

4. Обнаружен факт сходства профилей экспрессии 10 РТГ клетками МК, сарком мягких тканей и остеогенных сарком (СМТ/ОС) и злокачественных новообразований эпителиального происхождения (ЭО), что позволяет использовать лизаты культивируемых клеток МК как источник раково-тестикулярных антигенов в клеточной иммунотерапии на основе активированных дедритных клеток (ДК). Создан новый клеточный препарат для нагрузки и

активации ДК на основе равных долей лизатов 9 клеточных линий МК, обладающих гиперэкспрессией 10 РТГ.

5. Установлен факт повышенной продукции культивируемыми клетками солидных опухолей факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, ангиогенезом, инвазией, метастазированием, при этом количественные характеристики секреторного профиля ассоциированы с типом опухоли: клетки СМТ/ОС синтезировали в большем количестве VEGF-A, -C, -D, uPA, PAI-1, IGFBP-1, HGF, sEGFR и эндоглин, но в меньшем количестве – остеокальцин, чем клетки МК ( $p < 0,05$ ). Процесс длительного культивирования (>20 пассажа) сопряжен с усилением секреторной активности опухолевых клеток в отношении лиганда MICA, TGF- $\beta_1$ , цитокина IL-10, независимо от типа злокачественного новообразования.

6. Пространственная организация клеточной модели *in vitro* оказывает влияние на секреторные функции культивируемых клеток солидных опухолей, связанных с формированием микроокружения, благоприятного для пролиферации и метастазирования: наблюдается увеличение продукции хемокинов CCL2, CCL3, CCL15, CX3CL1, CXCL11, CXCL16, цитокинов IL-10, MIF, лиганда MICA при переходе от 2D- к 3D-формату культивирования ( $p < 0,05$ ).

7. Инвазивный потенциал 2D-культивируемых клеток МК и СМТ/ОС коррелирует с экспрессией РТГ PRAME, PASD1, SSX1, продукцией HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8. Существует зависимость изменения скорости инвазии опухолевых клеток в 3D-модельной системе, включающей стромальный компонент, от продукции факторов IL-8, HGF, SCF, FST, Prolactin, PECAM-1. Данные факторы возможно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

8. Продукция клетками МК TGF- $\beta_1$ , IL-10, VEGF-A, EGF, FGF, HGF, sFASL ингибирует скорость движения ДК в аналитической системе *in vitro* Cell-IQ ( $p < 0,01$ ), что указывает на изменение миграционных свойств ДК под влиянием ИСФ, синтезируемых клетками опухоли.

9. Дендритные клетки, активированные РТА<sup>+</sup>-лизатами клеток МК, способны генерировать цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), реактивные по отношению к РТА<sup>+</sup>-клеткам других опухолей, при этом эффективность взаимодействия ЦТЛ и клеток-мишеней связана с транскрипционной активностью генов PRAME ( $\rho = 0,676$ ,  $p = 0,005$ ) и PASD1 ( $\rho = 0,522$ ,  $p = 0,046$ ), а также продукцией клетками солидных опухолей IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta_1$ , MICA, VEGF ( $p < 0,01$ ).

10. Установлен факт высокой предиктивной и прогностической ценности продукции опухолевыми клетками иммуносупрессивных факторов (ИСФ) для специфической клеточной иммунотерапии. Выявлен диапазон концентраций TGF- $\beta_1$  от 1,4 до 3,0 нг/мл, пороговые концентрации MICA 574,7 пг/мл и IL-10 10,5 пг/мл в супернатантах опухолевых клеток пациентов, определяющие благоприятный прогноз. Уровни TGF- $\beta_1$  и MICA оказались значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости пациентов с МК. При анализе времени до прогрессирования значимым фактором являлся VEGF.

11. Подтверждена принципиальная возможность использования свойств культивируемых опухолевых клеток пациента в качестве прогностических и предиктивных факторов, которые могут применяться для планирования лекарственного лечения.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные охарактеризованные клеточные линии опухолей различного гистогенеза человека могут быть использованы в биомедицинских исследованиях как релевантные клеточные модели для разработки диагностических систем и биомедицинских клеточных препаратов различного назначения.

2. При создании противоопухолевых ДК-вакцин будет использован новый клеточный продукт IRTAN-2018, предназначенный для нагрузки и активации ДК согласно регламенту производства лекарственного препарата на основе соматических клеток человека – вакцины «CaTeVac», предназначенной для лечения солидных злокачественных новообразований, экспрессирующих раково-тестикулярные антигены.

3. Уровень продукции ИСФ культивируемыми клетками солидных опухолей пациентов может применяться как критерий показаний или противопоказаний при назначении клеточной иммунотерапии и оценки риска прогрессирования заболевания.

### ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Обнаруженные закономерности эволюции антигенного профиля и метаболических особенностей клеток солидных опухолей при длительном культивировании в 2D- и 3D-системах *in vitro* расширяют фундаментальные представления о процессах опухолевого роста и формируют предпосылки для разработки подходов к созданию индивидуальных клеточных моделей, адекватно отражающих реальную клиническую ситуацию. Полученные данные о принципиальном сходстве профилей экспрессии представителей 10 семейств РТГ в клетках солидных опухолей разных локализаций дает обоснование возможности поиска универсальных иммунотерапевтических мишеней и позволяет унифицировать подход к созданию ДКВ, что приведет к экономической оптимизации их производства. Выявление в экспериментальных условиях способности опухолевых клеток продуцировать широкий спектр ИСФ, ассоциированных с инвазией и метастазированием, негативно воздействующих на свойства ДК и ЦТЛ, а также обнаруженная связь продукции злокачественными клетками ИСФ и продолжительности жизни больных, получавших клеточную иммунотерапию, указывает на необходимость верификации содержания ИСФ в крови онкологических больных как одного из критериев показаний или противопоказаний к проведению иммунотерапии. Культура малигнизированных клеток пациента может быть использована как новый источник биомаркеров, позволяющих предсказать исход заболевания. Использование этих данных в клинической практике будет возможно после проведения проспективной оценки и валидации полученных результатов.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВДП – время до прогрессирования  
 ГМВ – вакцина на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном *tag7/PGRP-S*  
 ДК – дендритные клетки  
 ДКВ – вакцина на основе аутологичных активированных дендритных клеток  
 ИСФ – факторы, ассоциированные с иммуносупрессией  
 КРР – колоректальный рак  
 М<sub>e</sub> – медиана  
 МК – меланома кожи  
 ОАА – опухолиассоциированные антигены  
 ОВ – общая выживаемость  
 РМЖ – рак молочной железы  
 РП – рак почки  
 РПЖ – рак предстательной железы  
 РТА – раково-тестикулярные антигены  
 РТГ – раково-тестикулярные гены  
 РЯ – рак яичников  
 СМТ/ОС – саркомы мягких тканей и остеогенные саркомы  
 ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты  
 ЭО – опухоли эпителиального происхождения  
 ANG – ангиопоэтин  
 САФ – опухолиассоциированные фибробласты  
 СК – цитокератин  
 EGF – эпидермальный фактор роста  
 EGFR – рецепторы к эпидермальному фактору роста  
 ЕМА – эпителиальный мембранный антиген  
 FLESH – культура фибробластов легкого эмбриона человека

FST – фоллистатин  
 gp100 – гликопротеин 100 или белок меланоцитов PMEL  
 HB-EGF – heparin-binding EGF-like growth factor, гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста  
 HGF – фактор роста гепатоцитов  
 IGFBP – Insulin-like growth factor-binding protein, связывающий инсулиноподобный фактор роста белок-1  
 MCK – мультицитокератины  
 Melan A – трансмембранный 18 кД белок, состоящий из 118 аминокислот, который находится на поверхности меланоцитов  
 MITF – microphthalmia-associated transcription factor, транскрипционный фактор, играющий роль в меланогенезе  
 OSTP – остеопонтин  
 PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена, тип 1  
 PECAM-1 – platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, гликопротеин, мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов, относится к классу молекул клеточной адгезии  
 PLGF – плацентарный фактор роста  
 S100 – мультигенное семейство низкомолекулярных гомо- и гетеродимерных Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков, маркер меланомы  
 TRP-1 – тирозиназоподобный белок-1  
 Tyros – тирозиназа  
 uPA – урокиназный активатор плазминогена

#### СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оптимизация метода приготовления вакцин на основе аутологичных генетически модифицированных опухолевых клеток для лечения больных диссеминированной меланомой кожи / А.О. Данилов, С.С. Ларин, А.Б. Данилова, В.М. Моисеенко, И.А. Балдуева, С.Л. Киселев, А.С. Барчук, В.В. Анисимов, Г.И. Гафтон, В.А. Кочнев, К.П. Хансон // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 47–52.

2. Усовершенствование метода приготовления аутологичных модифицированных противоопухолевых вакцин для активной специфической иммунотерапии больных с диссеминированными солидными опухолями / А.О. Данилов, С.С. Ларин, А.Б. Данилова, В.М. Моисеенко, И.А. Балдуева, С.Л. Киселёв, Е.А. Туркевич, А.С. Барчук, В.В. Анисимов, Г.И. Гафтон, В.А. Кочнев, К.П. Хансон // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50 (2). – С. 219–227.

3. I-II фаза клинической оценки эффективности генотерапии на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном tag7 у больных с диссеминированными солидными опухолями / В.М. Моисеенко, А.О. Данилов, И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Н.В. Тюкавина, С.С. Ларин, С.Л. Киселев, Р.В. Орлова, А.И. Семенова, Е.А. Туркевич, Л.А. Щекина, В.В. Анисимов, Г.И. Гафтон, В.А. Кочнев, А.С. Барчук, С.В. Канаев, К.П. Хансон, Г.П. Георгиев // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 293–303.

4. Генотерапия больных диссеминированной меланомой кожи и метастатическим раком почки с помощью аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном tag7 / В.М. Моисеенко, И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, А.О. Данилов, Н.В. Тюкавина, С.С. Ларин, С.Л. Киселёв С.Л., Р.В. Орлова, В.В. Анисимов, А.И. Семенова, Л.А. Щекина, Г.И. Гафтон, В.А. Кочнев, А.С. Барчук, С.В. Канаев, К.П. Хансон, Г.П. Георгиев // Сибирский онкологический журнал. – 2004. – Т. 2–3, № 10–11. – С. 55–65.

5. Phase I/II Trial of Gene Therapy with the Autologous Tumor Cells Modified with the tag7/PGRP-S Gene in Patients with the Disseminated Solid Tumors / V.M. Moiseyenko, A.O. Danilov, A.B. Danilova, I.A. Baldueva, N.V. Tyukavina, S.S. Larin, S.L. Kiselev, R.V. Orlova, V.V. Anisimov, A.I. Semenova, L.A. Shchekina, G.L. Gafton, V.A. Kochnev, A.S. Barchuk, S.V. Kanaev, K.P. Hanson, G.P. Georgiev // Ann. Oncol. – 2005. – Vol. 16, № 1. – P. 162–168.



6. Изучение антигенных и пролиферативных свойств опухолевых клеток в культуре для приготовления аллогенной вакцины меланомы кожи / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, Е.А. Туркевич, Н.В. Бычкова, И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко // Материалы конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения – 2005», 15 апреля 2005, Санкт-Петербург // Вопросы онкологии. – 2005. – Т. 51, № 1. – С. 8–9.

7. Данилова, А.Б. Возможности активной специфической иммунотерапии на основе аллогенных вакцин для лечения злокачественных новообразований / А.Б. Данилова, В.М. Моисеенко, Н.В. Тюкавина // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, № 3. – С. 258–266.

8. Cell technologies in immunotherapy of cancer / V. Moiseyenko, E. Imyanitov, A. Danilova, A. Danilov, I. Baldueva // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 601. – P. 387–393. – doi: 10.1093/annonc/mdi028.

9. Иммуноцитохимический анализ антигенного состава клеток меланомы кожи, культивируемых для приготовления вакцин / А.Б. Данилова, В.М. Моисеенко, А.О. Данилов, И.А. Балдуева // Материалы XI Всероссийского научного форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 28–31 мая 2007 // Медицинская иммунология. – Т. 9, № 2–3. – С. 281.

10. Вакциноterapia аутологичными цельными опухолевыми клетками, модифицированными геном *tag7*, больных солидными опухолями / В.М. Моисеенко, А.О. Данилов, А.Б. Данилова, С.С. Ларин, И.А. Балдуева, Н.В. Тюкавина, О.Л. Фахрутдинова, Р.В. Орлова, Е.А. Туркевич, В.В. Анисимов, Г.И. Гафтон, В.А. Кочнев, А.С. Барчук, С.В. Канаев, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев // Материалы XI Всероссийского научного форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 28–31 мая 2007 // Медицинская иммунология. – Т. 9, № 2–3. – С. 280–281.

11. Данилова, А.Б. Изучение механизмов «уклонения» клеток солидных опухолей от иммунного контроля в контексте разработки противоопухолевых вакцин / В.М. Моисеенко, А.Б. Данилова, А.О. Данилов, И.А. Балдуева // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2 (11), № 2–3. – С. 306.

12. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей / И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко, А.О. Данилов, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Г.П. Георгиев, Н.В. Гнучев, С.С. Ларин, С.Л. Киселёв // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2 (11), № 2–3. – С. 303–304.

13. Иммуноцитохимическое изучение экспрессии антигенов клетками меланомы кожи, культивируемыми для приготовления вакцины / В.М. Моисеенко, А.Б. Данилова, А.О. Данилов, Е.А. Туркевич, И.А. Балдуева, Д.Е. Мацко // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, № 3. – С. 303–314.

14. Иммуносупрессирующие факторы в контексте приготовления противоопухолевых вакцин / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, И.А. Балдуева, А.В. Новик, В.М. Моисеенко // Сборник материалов VII съезда онкологов России. – М., 2009. – Т. 1. – С. 59.

15. Определение иммуносупрессирующих факторов в различных биологических жидкостях при создании и применении противоопухолевых вакцин / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, О.Л. Фахрутдинова, Т.Л. Нехаева, Е.В. Зуева, И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко // Материалы VI съезда онкологов и радиологов стран СНГ. – Душанбе, 2010. – С. 66.

16. Иммунохимический анализ продукции МІСА опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, О.Л. Фахрутдинова, И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56, № 5. – С. 576–582.

17. Клинико-лабораторная оценка иммуносупрессирующих факторов в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин. Протокол заседания общества онкологов № 476 / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, А.В. Новик, О.Л. Фахрутдинова, Т.Л. Нехаева, Е.В. Зуева, И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57, № 3. – С. 399–400.

18. Лабораторная оценка TGF- $\beta$ 1, интерлейкина-10, VEGF *in vitro* и *in vivo* у больных солидными опухолями / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, О.Л. Фахрутдинова, И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко // *Вопросы онкологии*. – 2011. – Т. 57, № 6. – С. 759–766.

19. Разработка диагностической панели раково-тестикулярных антигенов для оценки поствакцинального иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями / И.Л. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, А.В. Новик, А.О. Данилов, В.М. Моисеенко, Е.Н. Имянитов // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Организационные вопросы реализации Национальной онкологической программы в Российской Федерации»*, Казань, 2011 // *Поволжский онкологический вестник*. – 2011. – № 1. – С. 16–17.

20. Данилова, А.Б. Изменение свойств опухолевых клеток в процессе их культивирования при создании противоопухолевых вакцин / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, А.В. Новик, И.А. Балдуева // *Медицинская иммунология*. – 2011. – Т. 13. – С. 451.

21. Применение аутологичной раково-тестикулярной дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) у больных диссеминированной меланомой кожи: II фаза клинических исследований / А.В. Новик, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, А.О. Данилов, Т.Ю. Петрова, Е.Н. Имянитов, С.А. Проценко // *Петровские чтения – 2012: Сборник тезисов 8-й конференции по фундаментальной онкологии*. – 2012. – С. 105–107.

22. Разработка, обоснование и оценка современных методов биотерапии у больных с солидными опухолями / И.А. Балдуева, В.М. Моисеенко, А.Б. Данилова, А.О. Данилов, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, С.А. Проценко, Т.Д. Михайличенко, А.И. Семенова, Г.М. Телетаева, А.С. Жабина, Т.Ю. Петрова, Ю.И. Комаров // *Вопросы онкологии*. – 2012. – Т. 58 (5). – С. 708–709.

23. Autologous Dendritic Cell Vaccine (ADCV) in combination with plasmapheresis (PP) and Cyclophosphamide (Cy) in Patients with Disseminated Melanoma: A Phase II study / V.M. Moiseyenko, I.A. Baldueva, A.V. Novik, T.L. Nehaeva, A.B. Danilova, A.O. Danilov, T.Y. Petrova, S.A. Protsenko, T.D. Michailichenko, A.I. Semenova, G.V. Teletaeva // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, № 15. – Abstr. e.13059.

24. Прединдиктивное значение изменения экспрессии опухолеассоциированных антигенов (ОАА) и продукции иммуносупрессирующих факторов (ИФ) опухолевыми клетками в процессе культивирования и создания противоопухолевых вакцин / А.Б. Данилова, А.О. Данилов, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, Ю.И. Комаров // *Вопросы онкологии*. – 2013. – Т. 59, № 3, Прил. – С. 1160–1161.

25. Иммунологические исследования вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток (ДК) у больных меланомой кожи (поствакцинальный иммунитет и иммуносупрессирующие факторы) / Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, А.В. Новик, И.А. Балдуева, А.О. Данилов, Е.В. Воробейчиков, Ю.И. Комаров // *Вопросы онкологии*. – 2013. – Т. 59, № 3, Прил. – С. 1180–1181.

26. Tumor associated antigens expression and immunosuppressive factors production by tumor cells during cultivation as predictive factors for vaccinotherapy in melanoma / A.B. Danilova, A.O. Danilov, I.A. Baldueva, T.L. Nechaeva, A.V. Novik, J.I. Komarov // *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. – 2013. – Vol. 11, № I, Suppl. s7. – P. 70–71.

27. Tumor associated antigens expression and immunosuppressive factors production by tumor cells of the solid tumors during cultivation as predictive factors for vaccinotherapy of patients with malignant neoplasms / A. Danilova, I. Baldueva, T. Nehaeva, A. Novik, A. Vaal // *Annual Meeting of the French Society for Immunology*. – 2013, 4–7 Nov. – Paris, France. – P. 197.

28. Гетерогенность хромосомных аномалий в культивируемых клетках меланомы кожи человека / С.Н. Колюбаева, А.Б. Данилова, И.А. Балдуева, О.Р. Краснова, Н.А. Викторова, А.В. Киссель, А.А. Титова // *Вопросы онкологии*. – 2014. – Т. 60, № 5. – С. 596–601.

29. Оценка пролиферативной активности культивируемых клеток солидных опухолей на основе долговременной фазово-контрастной микроскопии Cell-IQ / А.Б. Данилова, Е.В. Воробейчиков, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева // *Вопросы онкологии*. – 2014. – Т. 60, № 5. – С. 590–595.

30. **Данилова, А.Б.** Исследование продукции факторов ангиогенеза клетками солидных опухолей человека, культивируемых для приготовления противоопухолевых вакцин / **А.Б. Данилова, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева** // *Вопросы онкологии*. – 2014 – Т. 60, № 6. – С. 728–735.

31. Создание коллекции биологических образцов однотипно пролеченных онкологических больных / Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, А.В. Новик, Г.И. Гафтон, И.В. Левченко, В.В. Анисимов, Ю.В. Семилетова, А.К. Носов, Т.А. Евдокимова, Ю.А. Комарова, Н.П. Пипиа, А.С. Артемьева, С.А. Кулева, А.М. Беляев // II Петербургский онкологический форум «Белые ночи – 2016»: сборник тезисов. – М.: Конференс Медиа Групп, 2016. – С. 233–234.

32. Персонализированное лечение больных саркомами мягких тканей путем определения индивидуальной химиочувствительности опухолевых клеток к различным цитостатикам *in vitro*: анализ взаимосвязи ретроспективных и экспериментальных исследований / И.А. Балдуева, Г.И. Гафтон, **А.Б. Данилова**, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, С.А. Проценко, Т.А. Евдокимова, Ю.А. Комарова, А.И. Семенова, Ю.И. Комаров, Н.П. Пипиа // II Петербургский онкологический форум «Белые ночи – 2016»: сборник тезисов. – М.: Конференс Медиа Групп, 2016. – С. 236–237.

33. Клеточные технологии в онкологии: прошлое, настоящее и будущее / И.А. Балдуева, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, **А.Б. Данилова**, Н.П. Пипиа, С.А. Проценко, А.М. Беляев // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению». – Екатеринбург: изд-во «Вестник уральской медицинской академической науки», 2016. – С. 94–97.

34. Моделирование воздействия химиотерапевтических агентов на первичные культуры метастатических сарком мягких тканей в автоматизированной аналитической системе CELL-IQ / И.А. Балдуева, А.В. Новик, Г.И. Гафтон, **А.Б. Данилова**, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, Ю.И. Комаров, Т.А. Евдокимова // *Вопросы онкологии*. – 2016. – Т. 62, № 2. – С. 340–350.

35. **Данилова, А.Б.** Нейтрофилы как компонент опухолевого микроокружения / **А.Б. Данилова, И.А. Балдуева** // *Вопросы онкологии*. – 2016. – Т. 62, № 1. – С. 35–44.

36. **Primary cultures of human colon cancer as a model to study cancer stem cells** / S. Koshkin, **A. Danilova**, G. Raskin, N. Petrov, O. Bajenova, S.J. O'Brien, A. Tomilin, E. Tolkunova // *Tumor Biol.* – 2016. – Vol. 37, № 9. – P. 12833–12842. – doi: 10.1007/s13277-016-5214-8.

37. Изучение экспрессии раково-тестикулярных антигенов клеточными культурами уротелиальной карциномы в контексте создания противоопухолевых вакцин / И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, А.К. Носов, Н.А. Авдонкина, О.А. Галиуллина, Н.В. Емельянова, Т.Л. Нехаева, Т.А. Славянская, С.В. Сальникова, И.Б. Джалилов // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 198. – № 1666.

38. Т-регуляторные лимфоциты как элемент иммуносупрессии в процессе опухолевой прогрессии у больных метастатическими саркомами мягких тканей / Н.П. Пипиа, **А.Б. Данилова**, И.А. Балдуева, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, О.А. Галиуллина, Т.А. Данилова // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 199–200. – № 1674.

39. Персонализированная оценка эффективности иммунологического синапса у больных меланомой кожи с помощью моделирования *in vitro* экспериментальных клеточных систем / **А.Б. Данилова**, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, Н.В. Емельянова, О.А. Галиуллина // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 193. – № 1651.

40. Сравнительный анализ инвазивного потенциала и экспрессии иммуносупрессивных факторов культивируемыми клетками меланомы кожи / **А.Б. Данилова**, И.А. Балдуева, А.И. Кузнецова, Н.А. Авдонкина, А.В. Новик // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 194. – № 1654.

41. Прединдиктивное значение экспрессии опухолеассоциированных антигенов и иммуносупрессивных факторов клетками солидных опухолей при проведении противоопухолевой вакцинотерапии / А.Б. Данилова, И.А. Балдуева, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, А.И. Кузнецова, Н.П. Пипиа, Н.В. Емельянова, О.А. Галиуллина // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 194. – № 1655.

42. Различия кариотипов опухолей мочевого пузыря при инвазивном и неинвазивном характере роста / И.А. Балдуева, С.Н. Колюбаева, А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 197-198. – № 1664.

43. Данилова, А.Б. Иммунотерапия на основе дендритных клеток в лечении рака мочевого пузыря / А.С. Ильницкая, А.Б. Данилова, И.А. Балдуева // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5, № 2. – С. 16–23. - doi: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-16-23.

44. Danilova, A.B. Study of dendritic cell migration using Cell-IQ analysis system / T.L. Nekhaeva, A.B. Danilova, I.A. Baldueva // Siberian Journal of Oncology. – 2018. – Vol. 17, № 4. – P. 14–23. – doi: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-14-23.

45. Прединдиктивное значение продукции иммуносупрессивных факторов клетками солидных опухолей в оценке эффективности противоопухолевой вакцинотерапии / А.Б. Данилова, И.А. Балдуева, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, А.И. Кузнецова, Н.А. Авдонкина, Н.В. Емельянова // Материалы IV Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2018». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии», 2018. – С. 341. – № 431.

46. Данилова, А.Б. Создание трёхмерных клеточных моделей для решения практических и теоретических проблем современной онкологии / Е.А. Просекина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева // Вопросы онкологии. – 2019. – Т. 65, № 5. – С. 629–637.

47. Long-term survival in patients (pts) with locally advanced or disseminated Malignant Melanoma (MM) or Renal cell carcinoma (RCC), treated with tag-7 gene-modified (GMV) tumor cells: a Phase II trial / A.V. Novik, A.B. Danilova, I.A. Baldueva, M.I. Sluzhev, T.L. Nehaeva, S.S. Larin, S.A. Protsenko, A.I. Semenova, A.O. Danilov, V.M. Moiseyenko, G.G. Georgiev // J. Clin. Oncol. – 2019. – Vol. 3, Suppl. – Abstr. e14022.

48. Прогностическая роль продукции опухолевыми клетками иммуносупрессивных факторов в оценке эффективности генотерапии диссеминированных солидных опухолей / А.Б. Данилова, А.В. Новик, М.И. Служев, И.А. Балдуева, С.С. Ларин, С.А. Проценко, А.И. Семенова, Д.В. Гирдюк, А.О. Данилов, В.М. Моисеенко, Г.П. Георгиев // Сборник тезисов V Международного онкологического форума «Белые ночи-2019». – С. 142. – Text: electronic. – URL: [https://forum-onco.ru/upload/Docs/WNOF\\_PUBLICATIONS\\_2019.pdf](https://forum-onco.ru/upload/Docs/WNOF_PUBLICATIONS_2019.pdf).

49. Использование клеточных 3D-моделей для оценки инвазивного потенциала клеток солидных опухолей / А.Б. Данилова, Е.А. Просекина, А.Р. Муслимов, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, Г.И. Гафтон, В.Ф. Семиглазов, Е.В. Левченко, И.А. Балдуева // Сборник тезисов V Международного онкологического форума «Белые ночи – 2019». – С. 205. – Text: electronic. – URL: [https://forum-onco.ru/upload/Docs/WNOF\\_PUBLICATIONS\\_2019.pdf](https://forum-onco.ru/upload/Docs/WNOF_PUBLICATIONS_2019.pdf).

50. Пролиферативные, миграционные и инвазивные свойства культивируемых клеток сарком мягких тканей и костей / А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Н.П. Пипиа, И.А. Балдуева, Г.И. Гафтон // Сборник тезисов V Международного онкологического форума «Белые ночи-2019». – С. 212. – Text: electronic. – URL: [https://forum-onco.ru/upload/Docs/WNOF\\_PUBLICATIONS\\_2019.pdf](https://forum-onco.ru/upload/Docs/WNOF_PUBLICATIONS_2019.pdf).

51. Организация банка биологических образцов однотипно пролеченных онкологических больных: современный подход к проведению фундаментальных и прикладных исследований / Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, А.В. Новик, Н.П. Пипиа, Г.И. Гафтон, Ю.В. Семилетова, А.К. Носов, Н.А. Авдонкина, А.Ю. Зозуля, Н.В. Емельянова, М.Л. Блохина // Исследования и практика в медицине. – 2019. – Т. 6, № S. – С. 204.

52. Прогностическая роль экспрессии альдегиддегидрогеназы культивируемыми клетками сарком мягких тканей и остеогенных сарком в определении их агрессивного потенциала / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Е.А. Просекина, А.И. Кузнецова, Н.В. Емельянова, И.А. Балдуева // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2019. – Т. 6, № 4. – С. 61–62.
53. Продукция хемокина CXCL12 в опухолях, полученных из солидных опухолей / А.И. Кузнецова, А.Б. Данилова, Е.А. Просекина, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2019. – Т. 6, № 4. – С. 64.
54. Сравнительный анализ продукции провоспалительных хемокинов CCL2/CCL3 2D- и 3D-культурами клеток меланомы кожи / Е.А. Просекина, А.Б. Данилова, А.И. Кузнецова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Авдонкина, И.А. Балдуева // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2019. – Т. 6, № 4. – С. 86.
55. **Cancer/testis antigens expression during cultivation of melanoma and soft tissue sarcoma cells** / A. Danilova, V. Misyurin, A. Novik, D. Girdyuk, N. Avdonkina, T. Nekhaeva, N. Emelyanova, N. Pipia, A. Misyurin, I. Baldueva // *Clinical Sarcoma Research*. – 2020. – Vol. 10, № 3. – doi: 10.1186/s13569-020-0125-2.
56. Получение и характеристика новых клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком для трансляционных исследований / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, В.А. Мисюрин, Е.А. Просекина, Н.В. Емельянова, Т.Л. Нехаева, О.В. Скачкова, А.В. Новик, Н.П. Пипиа, Г.И. Гафтон, Е.В. Левченко, А.М. Беляев, И.А. Балдуева // *Гены & Клетки*. – 2020. – Т. XV, № 3. – С. 92–107. – doi: 10.23868/202011014.
57. Сравнительный анализ миграционной активности и инвазивного потенциала культивируемых клеток солидных опухолей человека / А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, В.А. Мисюрин, Н.А. Авдонкина, Н.В. Емельянова, И.А. Балдуева // *Сибирский онкологический журнал*. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 64–77. - doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-64-77.
58. **Biological features of tissue and bone sarcomas investigated using an in vitro model of clonal selection** / N.A. Avdonkina, A.B. Danilova, V.A. Misyurin, E.A. Prosekina, D.V. Girdyuk, N.V. Emelyanova, T.L. Nekhaeva, G.I. Gafton, I.A. Baldueva // *Pathology – Research and Practice*. – 2020. – doi: 10.1016/j.prp.2020.153214.
59. Банк клеточных линий солидных опухолей однотипно пролеченных пациентов как основа клеточного моделирования в онкологии / А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Авдонкина, Е.А. Просекина, М.Л. Блохина, Н.В. Емельянова, О.В. Скачкова, А.В. Новик, И.А. Балдуева // *Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020»*. – СПб.: АННОМО «Вопросы онкологии», 2020. – С. 136.
60. 3D-клеточное моделирование в оценке продукции иммуносупрессивных факторов МІСА и TGF- $\beta$  солидными злокачественными новообразованиями / Е.А. Просекина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Авдонкина, Н.П. Пипиа, Д.В. Гирдюк, И.А. Балдуева // *Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020»*. – СПб.: АННОМО «Вопросы онкологии», 2020. – С. 145.
61. 3D-models creation based on solid tumor cell lines for assessment of antitumor treatment / E.A. Prosekina, N.A. Avdonkina, A.B. Danilova, T.L. Nekhaeva, I.A. Baldueva // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference (06–10 July 2020, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University*. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2020. – P. 509–510. – doi: 10.18699/BGRS/SB-2020-311.
62. Clinical and immunological characteristics of patient's sarcomas with different clonogenic potential / E.A. Prosekina, T.L. Nekhaeva, I.A. Baldueva, A.B. Danilova, N.V. Emelyanova, N.A. Avdonkina // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference (06–10 July 2020, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University*. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2020. – P. 511. – doi: 10.18699/BGRS/SB-2020-242.

63. Биобанки и создание систематизированных коллекций биологического материала для фундаментальных и прикладных исследований / Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Е.А. Просекина, М.Л. Блохина, Н.В. Емельянова, И.А. Балдуева // Сборник тезисов международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине». – Сочи: ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», 2020. – С. 87–88.

64. Трехмерное клеточное моделирование в индивидуализации лечения агрессивных форм злокачественных новообразований / Е.А. Просекина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Авдонкина, Н.П. Пипиа, М.Л. Блохина, Н.В. Емельянова, И.А. Балдуева // Сборник тезисов международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине». – Сочи: ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», 2020. – С. 103–104.

65. Влияние циркадных ритмов на пролиферацию и химиорезистентность культивируемых клеток солидных опухолей / А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Е.А. Губарева, И.А. Балдуева, А.Ю. Зозуля, Г.С. Киреева // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66, № 5. – С. 563–571.

66. Разработка и характеристика трехмерных клеточных моделей солидных опухолей для индивидуализации лечения онкологических больных / А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Ефремова, М.А. Майдин, Е.И. Федорос, И.А. Балдуева // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 58–74. - doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-5-58-74.

67. Оценка эффективности использования тумороидов для индивидуального подбора лекарственной терапии солидных опухолей / А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Ефремова, А.В. Новик, А.Ю. Зозуля, Г.И. Гафтон, И.А. Балдуева // Вопросы онкологии – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 815–828. – doi: 10.37469/0507-3758-2021-67-6-815-828.

68. Clinical and immunological characteristics of sarcomas patients with clonogenic tumors / N.A. Avdonkina, A.B. Danilova, T.L. Nekhaeva, E.A. Prosekina, N.V. Emelyanova, A.V. Novik, D.V. Girduyk, G.L. Gafton, I.A. Baldueva // Immunobiology. – 2021. – Vol. 226, № 4. – Abstr. 152094. – doi: 10.1016/j.imbio.2021.152094.

69. Significant difference in response of malignant tumor cells of individual patients to photodynamic treatment as revealed by digital holographic microscopy / A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, A.B. Danilova, N.A. Avdonkina, I.A. Baldueva, M.L. Gelfond, T.L. Nekhaeva, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii // J. Photochem. Photobiol. B. – 2021. – Vol. 221. – P. 112235. – Text : electronic. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112235>.

70. Роль пространственной организации клеточных моделей в анализе секреторной активности клеток солидных опухолей / А.Б. Данилова, Н.А. Ефремова, Т.Л. Нехаева, М.Л. Блохина, Д.В. Гирдюк, И.А. Балдуева // Тезисы VII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2021». – СПб.: Вопросы онкологии, 2021. – С. 123.

71. Первичная опухоль и её метастазы: взаимоотношение с иммунной системой / И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, А.Ю. Зозуля, Н.А. Ефремова, А.В. Новик, А.М. Беляев // Тезисы VII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2021». – СПб.: АНМО «Вопросы онкологии», 2021. – С. 120.

72. Данилова, А.Б. Изучение механизма «immune escape» на моделях *in vitro* культивируемых клеток меланомы кожи / А.Б. Данилова // Материалы конференции с международным участием Ассоциации специалистов по проблемам меланомы «Меланома и опухоли кожи» – 2021, Санкт-Петербург // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. – Спецвыпуск «Меланома и опухоли кожи». – 2021. – Т. 17, № 11. – С. 12.

73. Evolution of the solid human tumor cells properties in various experimental systems in vitro / A.B. Danilova, N.A. Efremova, A.A. Murashkina, T.L. Nekhaeva, M.A. Maydin [et al.] // Journal of Hematology and Oncology Research. – 2022. – Vol. 4, № 2. – P. 9–29. – doi: 10.14302/issn.2372-6601.jhor-22-4061.

74. Данилова, А.Б. Роль факторов иммуносупрессии в прогнозе эффективности клеточной иммунотерапии у больных солидными опухолями / А.Б. Данилова, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т. 18, № 17. – С. 8–17. – doi: 10.33978/2307-3586-2022-18-17-8-17.

75. Данилова, А.Б. Прогностическое значение продукции клетками солидных опухолей факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, в оценке эффективности клеточной иммунотерапии / А.Б. Данилова, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева (Материалы VIII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2022») // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № 3, Прил. – С. 157-158.

### **ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ, СВИДЕТЕЛЬСТВА О РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ И ПРОГРАММ ДЛЯ ЭВМ**

1. Пат. № 2642265 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/00, 2017119304, 2017.06.01 / 2018.01.24. Бюл. № 3: Применение клеточной линии меланомы кожи человека 369 ADMEL / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

2. Пат. № 2650757 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/09, 2017126919, 2017.07.26 / 2018.04.17. Бюл. № 11: Клеточная линия колоректального рака человека 485 colo can / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

3. Пат. № 2650759 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/09, 2017126922, 2017.07.26 / 2018.04.17. Бюл. № 11: Клеточная линия рака яичника человека 533 OOS / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

4. Пат. № 2673729 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/00, 2018111913, 2018.04.02 / 2018.11.29. Бюл. № 34: Применение клеточной линии рака почки человека RC291C / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

5. Пат. № 2675541 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/00, 2018109807, 2018.03.20 / 2018.12.20. Бюл. № 35: Применение клеточной линии меланомы кожи человека 388mel / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

6. Пат. № 2714208 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/0784, С12N 5/09, А61К 35/15, А61Р 35/00, 2019106338, 2019.03.05 / 2020.02.13. Бюл. № 5: Клеточный продукт для нагрузки и активации дендритных клеток человека / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Авдонкина, Н.В. Емельянова, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

7. Пат. № 2722867 С1 Рос. Фед. МПК А61К 35/12, 2019142297, 2019.12.16 / 2020.06.04. Бюл. № 16: Клеточная линия остеогенной саркомы человека 793 OsSar RVV / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

8. Пат. № 2733230 С1 Рос. Фед. МПК А61К 35/00, С12N 5/09, 2019142296, 2019.12.16 / 2020.09.20. Бюл. № 28: Клеточная линия рака мочевого пузыря человека 198 BICan RLA / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

9. Пат. № 2737248 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/07, 2020116100, 2020.04.28 / 2020.11.26. Бюл. № 33: Клеточная линия эмбриональной рабдомиосаркомы человека 862 RMSar KDD /

И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, Г.И. Гафтон, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

10. Пат. № 2742245 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/00, С12N 5/09, 2020117939, 2020.05.20 / 2021.02.04. Бюл. № 4: Клеточная линия рака мочевого пузыря человека 398 В1Сap КАЕ / И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

11. Пат. № 2742244 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/00, С12N 5/09, 2020117938, 2020.05.20 / 2021.02.04. Бюл. № 4: Клеточная линия рака мочевого пузыря человека 587 В1Сap TVV / И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

12. Пат. № 2740800 С1 Рос. Фед. МПК С12N 15/07, 2020116101, 2020.04.28 / 2021.01.21. Бюл. № 3: Клеточная линия синовиальной саркомы человека 716 SS MNV / И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

13. Пат. № 2779948 С1 Рос. Фед. МПК С12N 5/09, 2021135759, 2021.12.03 / 2022.09.15. Бюл. № 26: Клеточная линия рака мочевого пузыря человека 190 В1Сap КАG / И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.М. Беляев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

14. Свидетельство о государственной регистрации баз данных № 2019622484 Российская Федерация. База данных больных, биологических образцов и научных данных (ББОНД): 2019622377: заявл. 10.12.2019: опубл. 26.12.2019 / А.В. Новик, И.А. Балдуева, **А.Б. Данилова**, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, Е.М. Анохина; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

15. Свидетельство о государственной регистрации баз данных № 2020621416 Российская Федерация. База данных больных, биологических образцов и научных данных (ББОНД) версия 2: 20200620914: заявл. 15.06.2020: опубл. 13.08.2020 / А.В. Новик, И.А. Балдуева, С.А. Проценко, А.И. Семенова, Г.М. Телетаева, Д.Х. Латипова, Е.М. Анохина, А.П. Оганесян, Д.О. Юрлов, М.И. Служев, Ю.В. Семилетова, Д.В. Гирдюк, Г.И. Гафтон, А.К. Носов, **А.Б. Данилова**, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, Н.А. Авдонкина, М.Л. Блохина, Е.Н. Имянитов, А.С. Артемьева, В.И. Новик, Т.Ю. Семиглазова; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### УЧЕБНЫЕ РАБОТЫ

Дендритноклеточные вакцины в иммунотерапии больных солидными опухолями: уч. пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и доп. проф. обр. / И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, С.А. Проценко, А.В. Новик, **А.Б. Данилова**, Н.А. Авдонкина, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, Н.В. Емельянова, А.И. Кузнецова, М.Л. Блохина, Е.А. Просекина, О.В. Скачкова, Д.В. Гирдюк, Е.М. Анохина, А.И. Семенова, Д.Х. Латипова, Г.М. Телетаева, С.А. Кулева, В.Ф. Семиглазов, С.Н. Новиков, М.В. Рогачев, А.М. Беляев. – СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. – 128 с.



## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор благодарит сотрудников научного отдела онкоиммунологии, отделения противоопухолевой лекарственной терапии, научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, принявших участие в исследовании.

Автор выражает огромную признательность своим учителям – профессору Окулову В.Б. и члену-корреспонденту РАН, профессору Моисеенко В.М. – за поддержку в инициации исследований.

Отдельная благодарность заведующей научным отделом онкоиммунологии д.м.н. Балдуевой И.А. за неоценимую помощь в проведении данной работы.