

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ  
ИМЕНИ Н.Н. ПЕТРОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**ЕФРЕМОВА**

**Наталья Александровна**

**ИЗУЧЕНИЕ СЕЛЕКЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТАСТАТИЧЕСКИХ САРКОМ  
МЯГКИХ ТКАНЕЙ И ОСТЕОГЕННЫХ САРКОМ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ  
ЗАБОЛЕВАНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ**

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

3.2.7 – аллергология и иммунология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

д.м.н. Балдуева Ирина Александровна

д.м.н. Гафтон Георгий Иванович

Санкт-Петербург – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛОНАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ САРКОМ И ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ ЛЕЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	14
1.1. Модели эволюции опухолевых клеток .....	14
1.2. Индуцированная клональная опухолевая селекция.....	19
1.3. Стволовые клетки опухоли и их значение для опухолевой селекции .....	23
1.4. Раково-тестикулярные антигены/гены и их роль в опухолевой прогрессии .....	25
1.5. Основные сведения о биологии сарком мягких тканей и остеогенных сарком.....	27
1.5.1. Особенности клональной эволюции сарком мягких тканей.....	27
1.5.2. Особенности клональной эволюции остеогенных сарком.....	29
1.6. Современные представления о терапии сарком в контексте .....	30
существующей теории клональной эволюции .....	30
1.7. Заключение .....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	35
2.1. Материалы исследования .....	35
2.2. Методы исследования.....	38
2.2.1. Культивирование опухолевых клеток.....	38
2.2.2. Изучение морфологии культивируемых клеток сарком .....	38
2.2.3. Криоконсервация и размораживание опухолевых клеток .....	39
2.2.4. HLA-типирование опухолевых клеток сарком мягких тканей.....	39
и остеогенных сарком .....	39
2.2.5. Трехмерное моделирование .....	40
2.2.6. Клонирование опухолевых клеток сарком мягких тканей.....	41
и остеогенных сарком .....	41
2.2.7. Определение параметров пролиферативной активности опухолевых клеток .....	41
2.2.8. Изучение миграции и инвазии опухолевых клеток .....	42
2.2.9. Идентификация маркеров стволовых клеток опухоли .....	43
2.2.9.1. Определение CD133 .....	43
2.2.9.2. Определение активности альдегиддегидрогеназы.....	43
2.2.10. Молекулярно-генетический анализ экспрессии.....	44
раково-тестикулярных генов.....	44

2.2.11. Определение химиочувствительности культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком .....	47
2.2.11.1. МТТ-тест .....	47
2.2.11.2. Детекция химиорезистентности культивируемых опухолевых клеток с помощью клеточного анализатора xCelligence .....	49
2.2.12. Приготовление аутологичной дендритноклеточной вакцины «CaTeVac» для иммунотерапии .....	49
2.2.13. Оценка иммунологических показателей периферической крови пациентов .....	51
2.2.14. Статистическая обработка результатов .....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
3.1. Получение и культивирование клеток метастатических.....	54
сарком мягких тканей и остеогенных сарком .....	54
3.1.1. Изучение морфологии культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком (фазово-контрастная микроскопия) .....	55
3.1.2. Изучение морфологии культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком (конфокальная микроскопия).....	63
3.1.3. Характеристика культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком. Результаты HLA-типирования .....	66
3.1.4. Сравнительный анализ пролиферативной активности культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком на разных пассажах в процессе длительного культивирования .....	68
3.1.5. Изучение миграции и инвазии культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком .....	71
3.1.6. Изучение свойств культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком в трехмерных структурах .....	73
3.2. Клонирование культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком.....	75
3.2.1. Сравнительный анализ пролиферативной активности.....	79
«родительских» культур сарком и их клонов.....	79
3.2.2. Изучение миграционной и инвазивной активности клоногенных и неклоногенных опухолевых культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком .....	79
3.2.3. Анализ маркеров стволовых клеток опухоли в культурах сарком мягких тканей и остеогенных сарком .....	80
3.2.4. Изучение экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях сарком.....	82
3.2.4.1. Частота встречаемости и уровень транскрипционной активности раково-тестикулярных генов в исходных клеточных линиях сарком мягких тканей и остеогенных сарком.....	82

3.2.4.2. Изменение экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях сарком в процессе длительного культивирования и при клонировании .....	85
3.2.5. Анализ химиорезистентности культур сарком и их клонов .....	88
3.3. Анализ взаимосвязи между клоногенностью клеточных культур и клиническими характеристиками пациентов .....	92
3.4. Оценка эффективности иммунотерапии аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» у больных с саркомами, в зависимости от клоногенных характеристик клеточных линий, полученных из опухолевого материала пациентов.....	93
3.5. Анализ субпопуляций иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных с саркомами, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в зависимости от клоногенных характеристик в группах 1 и 2 .....	95
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	99
4.1. Создание коллекции клеточных культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком .....	99
4.2. Обсуждение результатов клонирования опухолевых линий .....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	114
ВЫВОДЫ.....	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	117
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ.....	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Саркомы – крайне гетерогенная группа редких, но агрессивных злокачественных новообразований мягких тканей и костей мезенхимального происхождения. Они составляют всего 1% от всех злокачественных опухолей человека, но характеризуются высокой смертностью и эффективность стандартной терапии сарком по-прежнему остается ограниченной [1]. Частота сарком в мире составляет в среднем 7,1 случая на 100 тысяч человек в год [2]. В России этот показатель в 2020 году составлял около 3,15 на 100 тысяч населения (суммарно по локализациям: кости и мягкие ткани) [3]. Хотя современные терапевтические стратегии с использованием таргетных и иммунологических препаратов значительно улучшили выживаемость пациентов с саркомами, прогноз для больных с метастатическим характером заболевания по-прежнему остается неблагоприятным. Понимание процессов, происходящих в опухоли при метастатическом характере заболевания, имеет особенно важное значение для этой категории пациентов и может оказать значительное влияние на исход терапии.

Эволюционные процессы в опухоли представляют собой динамическую клональную экспансию с последующим отбором, что приводит к формированию гетерогенной популяции опухолевых клеток. Разнообразие клонов представляет субстрат для генетической, эпигенетической и фенотипической изменчивости, которая в свою очередь является основным препятствием для эффективного лечения. Помимо клональной эволюции, в основе которой лежит цепь случайных событий и естественный отбор, в случае метастатического процесса могут наблюдаться явления клональной селекции, вызванной терапевтическим воздействием. Под влиянием лечения происходит целенаправленный отбор наиболее резистентных опухолевых клонов, даже в том случае, если бы в отсутствие воздействия эти клоны оставались минорными и не получили возможности для доминирования.

В процессе опухолевой прогрессии малигнизированные клетки приобретают способность к неограниченному делению, не поддающемуся контролю со стороны иммунной системы организма человека. Эти изменения ассоциированы со значительными генетическими модификациями, которые представляют собой множественные геномные, хромосомные и точечные мутации, возникающие с течением времени. В результате злокачественные опухоли обычно представлены гетерогенным пулом клеток, которые отличаются по морфологии, фенотипу, экспрессии генов, метаболизму, иммуногенности, пролиферации и метастатическому потенциалу. Именно внутриопухолевая гетерогенность считается основной причиной множественной лекарственной устойчивости и неэффективности терапии, в том числе иммунотерапии. Понимание механизма формирования изменений на уровне опухолевой

клональности при прогрессировании заболевания может способствовать повышению эффективности противоопухолевой терапии.

### **Степень разработанности темы**

Изучение эволюции метастатических опухолей у человека затруднено, поскольку, руководствуясь гуманными принципами, невозможно непрерывно получать биоптаты прогрессирующей опухоли, и необходима разработка модельных систем, в том числе из клеточных линий метастатического происхождения. Несомненно, это имеет некоторые ограничения: двухмерное культивирование не вполне моделирует сложные межклеточные взаимоотношения многомерной опухолевой структуры, не учитывается влияние опухолевого микроокружения, воздействие иммунной системы, коммерческие клеточные линии за огромное число делений после их создания приобретают новые кариотипические изменения. Тем не менее клеточные линии по-прежнему остаются ценным материалом для изучения эволюции злокачественных новообразований, в том числе в доклинических исследованиях при разработке новых лекарственных форм. Культуры злокачественных клеток, прошедшие не более 10 пассажей от момента получения, представляют достойную альтернативу, поскольку не теряют молекулярные характеристики опухоли. Их можно использовать и для создания 3D моделей – многоклеточных опухолевых сфероидов, особенно если сокультивировать со стромальными и иммунными клетками для воспроизведения микроокружения опухоли. Актуальным становится знание, что для сарком при всей их гетерогенности получено сравнительно малое количество хорошо охарактеризованных коммерческих клеточных линий, что существенно тормозит развитие новых подходов к терапии этого заболевания.

Внутриопухолевая гетерогенность приводит не только к различиям в динамике роста, экспрессии генов, фенотипических маркеров, но и устойчивости к стандартным методам лечения [4]. Некоторые фенотипические маркеры, такие как высокоиммуногенные раково-тестикулярные антигены/гены (РТА/РТГ) в настоящее время рассматриваются как диагностические, а также в качестве терапевтических мишеней при целом ряде злокачественных новообразований, в том числе при саркомах. При этом удалось выявить корреляцию между высоким уровнем экспрессии некоторых иммуногенных РТА/РТГ и неблагоприятным прогнозом заболевания [5]. В то же время, вследствие значительной гетерогенности сарком и выявленного широкого спектра РТА/РТГ, на сегодняшний день существует недостаточно данных по частоте и значимости их экспрессии при этой форме злокачественного новообразования и участию в противоопухолевом иммунном ответе [6].

В процессе прогрессирования происходит ускользание опухоли из-под иммунологического надзора. Наиболее частая причина этого - потеря экспрессии молекул

главного комплекса гистосовместимости. Кроме того, различные гаплотипы HLA коррелируют как с риском заболевания, так и с его прогнозом. Поскольку гены, кодирующие молекулы HLA, отличаются значительным полиморфизмом, разнообразие HLA, возможно, определяет различную способность иммунного распознавания, что впоследствии создает различную восприимчивость как к неопластической прогрессии, так и к проводимой иммунотерапии. Так E. Rosenbaum с соавт. (2020) показали связь между гаплотипом HLA-A\*02 и низкой выживаемостью пациентов с синовиальной саркомой [7], а P. Correale с соавт. (2020) при немелкоклеточном раке легких на фоне иммунотерапии показали худший исход лечения в группе больных негативных по HLA-A\*02 [8]. Таким образом HLA-типирование пациентов может предоставить материал для дальнейших исследований, направленных на поиск прогностических и предиктивных маркеров иммунотерапии.

Универсальные маркеры стволовых клеток опухоли (СКО), такие как CD133 и ALDH1, демонстрируют повышенную активность в различных типах неоплазий и возможно связаны с их метастатическим потенциалом, лекарственной устойчивостью, а также неблагоприятным прогнозом для пациентов [9; 10]. При этом для сарком в отношении этих маркеров в подобных исследованиях получены противоречивые результаты [11].

Традиционно, способность к ответу на иммунотерапевтическое воздействие базируется на сочетании оценки параметров лимфоидной инфильтрации опухоли и экспрессии маркеров модуляторов иммунологического синапса. Эти показатели продемонстрировали значимость при саркомах мягких тканей (СМТ) и остеогенных саркомах (ОС) в ряде исследований последних лет [12–14]. Тем не менее оптимальный маркер эффективности иммунотерапии для сарком по-прежнему не определен, поскольку частота ответа на иммунотерапевтические композиции в исследованиях оказалась значительно ниже, чем определенная экспрессия PD-1/PD-L1 и уровень лимфоцитарной инфильтрации [15]. Кроме того, для количественного определения этих биомаркеров требуются образцы опухоли, которые не всегда доступны. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов может выявить потенциальные биомаркеры, способствующие точному прогнозу, мониторингу ответа на терапию и усовершенствованному подходу к лечению [16]. Идентификация биомаркеров периферической крови, которые коррелируют с ответом на иммунотерапию, обеспечит простой малоинвазивный способ отбора пациентов или может использоваться для мониторинга лечения. Поэтому настоящее исследование представляет несомненный интерес как трансляционное и направленное на поиск альтернативных иммунологических маркеров для разработки эффективного противоопухолевого лечения и прогноза течения метастатических форм сарком.

### **Цель исследования**

Поиск новых биомаркеров прогноза течения заболевания и эффективности терапии у больных метастатическими саркомами мягких тканей и остеогенными саркомами на основе изучения особенностей селекции опухолевых клеток *ex vivo*.

### **Задачи исследования**

1. Получить и охарактеризовать клеточные линии метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком.
2. Изучить особенности селекции культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком методом клонирования исходных клеточных линий.
3. Исследовать изменение пролиферативных, инвазивных, иммуногенных свойств клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком в процессе селекции.
4. Оценить влияние параметров клеточной селекции в модельной системе на прогноз течения сарком мягких тканей и остеогенных сарком и клиническую эффективность иммунотерапии.
5. Оценить иммунологические показатели периферической крови больных саркомами мягких тканей и остеогенными саркомами с учетом клоногенных характеристик опухоли.

### **Научная новизна исследования**

1. Впервые получены и охарактеризованы 56 клеточных линий метастатических СМТ и ОС 16 гистологических подтипов и 83 дочерних клона для клеточного моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Получено 3 патента («Клеточная линия остеогенной саркомы человека 793 OsSar RVV» – патент на изобретение № 2722867 от 04.06.2020; «Клеточная линия эмбриональной рабдомиосаркомы человека 862 RMSar KDD» – патент на изобретение № 2737248 от 26.11.2020; «Клеточная линия синовиальной саркомы человека 716 SS MNV» – патент на изобретение № 2740800 от 21.01.2021).
2. Установлена новая характеристика опухолевой клеточной линии СМТ и ОС – клоногенность, которая оказывает влияние на прогноз заболевания и эффективность иммунотерапии вакциной «CaTeVac».
3. Показана высокая частота встречаемости у больных СМТ и ОС по сравнению с популяцией высокоиммуногенного гаплотипа HLA-A\*02 и A\*32.
4. Обнаружена связь клоногенности культивируемых клеток СМТ и ОС с увеличением пролиферативной активности, усилением химиорезистентности, увеличением популяции ALDH1<sup>+</sup>клеток.



5. Выявлена экспрессия генов высокоиммуногенных РТА PASD1 и SLLP1, ранее неизвестная в миксофибросаркомах и остеогенных саркомах. Установлена связь между экспрессией раково-тестикулярных генов и клоногенностью культивируемых клеток СМТ и ОС: клетки клоногенных опухолей отличались выраженной транскрипционной активностью генов *GAGE1* и *SLLP1* ( $p < 0,05$ ).

6. Определена связь клоногенности и иммунологических параметров периферической крови (цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов, NK-клеток) у пациентов СМТ и ОС.

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

1. Создана коллекция охарактеризованных 56 клеточных линий СМТ и ОС и 83 дочерних клонов, пригодных для моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Клоногенные клеточные линии могут быть использованы как модели резистентности для разработки новых способов лечения сарком.

2. Получение клеточных культур сарком из операционных образцов пациентов и оценка их клоногенности могут быть использованы для выявления неблагоприятных факторов прогноза заболевания.

3. Клоногенность, определенная *in vitro*, характеризует клетки опухоли, обладающей высокой пролиферативной и миграционной способностью, экспрессией раково-тестикулярных генов *GAGE1* и *SLLP1*, высокой активностью фермента ALDH1 что может оказывать влияние на клинические характеристики СМТ и ОС, в том числе эффективность иммунотерапии вакциной «CaTeVac».

4. Изменения иммунологических показателей периферической крови (низкое содержание Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов и высокое содержание NK-клеток) у пациентов, опухолевые клетки которых клоногенны *in vitro*, могут объяснять низкую эффективность иммунотерапии «CaTeVac» у данной категории больных.

5. Выявленная высокая транскрипционная активность генов высокоиммуногенных РТА в метастатических саркомах позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов для проведения иммунотерапии, направленной на эти антигены, и может служить теоретическим обоснованием применения «CaTeVac» у пациентов СМТ и ОС.

6. Полученные данные о свойствах клеток СМТ и ОС *in vitro* способствуют расширению знаний о биологии сарком, что позволяет использовать эти новые знания для создания новых иммунотерапевтических подходов в лечении онкологических заболеваний.

### Методология и методы исследования

В исследовании было скринировано 95 интраоперационных образцов опухолевого материала пациентов с диагнозом СМТ или ОС, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с мая 2013 по май 2020 года.

Из 56 образцов, с гистологически подтвержденным метастатическим характером опухолевого процесса, были получены клеточные культуры, пригодные для дальнейших исследований. В результате клонирования методом предельных разведений было отобрано случайным образом 83 клон.

Изучали морфологию культивируемых клеток, получая изображения методом фазово-контрастной микроскопии в автоматическом клеточном анализаторе Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) и методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов, окрашивающих ядра, митохондрии, лизосомы и актиновый цитоскелет в конфокальном лазерном микроскопе Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония).

Анализировали пролиферативную активность культур малигнизированных клеток и их клонов на разных этапах в процессе длительного культивирования, миграционные и инвазивные свойства опухолевых клеточных культур с использованием автоматического клеточного анализатора xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США).

Проводили HLA-типирование опухолевых культур и образцов биологического материала пациентов с определением генов HLA I класса методом полимеразной цепной реакции с праймерами, специфичными к конкретным аллелям (ПЦР-SSP).

Идентифицировали маркеры стволовых клеток в опухолевых образцах методом проточной цитометрии (BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США)).

Анализировали транскрипционную активность генов РТА методом ПЦР (в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России на ПЦР-амплификаторе Light Cycler 96 (Roche, Швейцария)).

Оценивали химиочувствительность опухолевых клеток и их клонов с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-теста) и/или автоматического клеточного анализатора xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США).

Определяли субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток в образцах периферической крови пациентов методом проточной цитофлуориметрии (BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США)).

Осуществляли хранение, обработку, статистический анализ данных и визуализацию результатов с использованием Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, США), Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и R v.3.6.2. Применяли основные статистические показатели: среднее значение, медиана, минимум, максимум. В случае количественных признаков применяли

коэффициент ранговой корреляции Спирмена, для сравнения выборок использовали U-критерий Манна–Уитни и W-критерия Уилкоксона

Выживаемость анализировали методом Каплана–Мейера. Во всех случаях значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Получены и охарактеризованы 56 клеточных линий метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком 16 гистологических подтипов и 83 дочерних клон для клеточного моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью.

2. Выявлены 2 типа клеточных культур СМТ и ОС: клоногенные (39,3%; 22/56) и неклоногенные (60,7%; 34/56), которые имеют статистически значимые различия в миграционной способности, относительном содержании ALDH1+клеток, транскрипционной активности раково-тестикулярных генов.

3. В процессе длительного культивирования (>15 пассажей) и клонирования наблюдается увеличение пролиферативной активности и химиорезистентности клеток СМТ и ОС.

4. Клоногенность культур клеток СМТ и ОС может рассматриваться в качестве прогностического фактора, определяющего течение заболевания, и предиктивного маркера эффективности иммунотерапии.

5. У пациентов, из образцов опухоли которых были получены клоногенные клеточные линии, в периферической крови снижено количество цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов и повышено содержание NK-клеток, что свидетельствует об изменении поляризации иммунного ответа в процессе опухолевой селекции.

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

Достоверность результатов работы подтверждается репрезентативностью выборки (в исследовании скринировано 95 образцов опухоли пациентов, включено 56 клеточных линий и 83 клон), использованием современных методов исследований, обработкой полученных данных с применением методов статистического анализа, которые можно корректно применять для множественных попарных сравнений, а также дисперсионного анализа при множественной проверке гипотез.

Основные положения диссертации представлены на V Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2019» (Санкт-Петербург, 20.06–23.06.2019 г.); Втором международном

форуме онкологии и радиологии (Москва, 23.09–27.09.2019 г.); V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 16.12–18.12.2019 г.); VI Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2020» (Санкт-Петербург, 25.06–28.06.2020 г.); 12-й Международной мультikonференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома/Системная биология» (Новосибирск, 06.06–10.06.2020 г.); Международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» (Сочи, 25.11–27.11.2020 г.); VII Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2021» (Санкт-Петербург, 21.06–27.06.2021 г.).

### **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 подразделения (акт внедрения результатов от 30.11.2021 г.).

### **Личный вклад автора**

Автор принимала участие в скрининге пациентов, обследовании и лечении больных, получении клеточных культур и клеточных линий СМТ и ОС из образцов опухолевого материала пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Выполняла пассирование клеточных культур, клонирование, оценку их пролиферативной, инвазивной и миграционной активности, постановку и анализ МТТ-теста, отбор образцов для проведения генетических исследований, проточной цитометрии. Самостоятельно произвела сбор данных, принимала участие в создании и заполнении базы данных, провела статистическую обработку результатов исследований, проанализировала полученные результаты, на основании чего были сформулированы заключение и выводы по материалам исследования. Все полученные результаты самостоятельно подготовлены для публикаций и представления на различных научно-практических мероприятиях.

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

Научные положения настоящей диссертационной работы соответствует паспорту научной специальности «3.1.6. – онкология, лучевая терапия» («медицинские науки») по пункту 2 (исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.) и паспорту специальности «3.2.7. – аллергология и иммунология» («медицинские науки») по пункту 3 (изучение молекулярных и клеточных основ

противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты).

### **Публикации**

По результатам диссертационного исследования опубликовано 19 печатных работ соискателя. Всего 6 статей, из которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук, и 2 статьи в международных журналах, индексируемых в Scopus и WoS, и 13 тезисов. Получено три патента на изобретение РФ и одно свидетельство о регистрации базы данных. Подготовлено одно учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы, практические рекомендации, список литературы, который содержит 166 источников, из них 16 отечественных и 150 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 38 рисунками.

# **Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛОНАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ САРКОМ И ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ ЛЕЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

## **1.1. Модели эволюции опухолевых клеток**

Туморогенез является следствием генетической и эпигенетической диверсификации, за которой следует клональный отбор и последующая экспансия. Этот процесс, формируемый опухолевым микроокружением, приводит к внутриопухолевой гетерогенности по экспрессии генов, фенотипическим маркерам, динамике роста и резистентности к лечению. Первые наблюдения клеточной гетерогенности опухолей были сделаны R. Virchow (1858) с использованием светового микроскопа [17]. Впоследствии рассматривались различные теории, объясняющие процессы, предшествующие образованию опухоли, ее метастазированию и многочисленные модели клонального механизма опухолевой прогрессии.

Самая первая модель эволюции опухоли предложена P.C. Nowell (1976), который обобщил результат предшественников в теории клональной эволюции [18]. Согласно данной теории, все опухоли представляют собой потомство единичной клетки, которая в процессе последовательных генетических мутаций приобрела характерный набор признаков опухолевой принадлежности. При дальнейшем прогрессировании заболевания ключевая роль отводится процессам накопления генетических изменений в исходном клоне опухолевых клеток, что приводит к доминированию наиболее агрессивных субклонов. Генетическая нестабильность опухолевых клеток служит причиной их высокой фенотипической и биологической индивидуальности, приобретения лекарственной устойчивости и возникновения генетических мутаций в одном из субклонов, который приобретает, таким образом, конкурентное преимущество. Изменения, происходящие в опухолевых клетках под влиянием внешних воздействий, таких как химио- и лучевая терапия, определены не эволюционными процессами, в которые заложен случайный, непредсказуемый характер, а селекцией отдельных субклонов.

Таким образом, внутриопухолевая гетерогенность, обусловленная генетическими различиями между отдельными клетками в опухоли, обеспечивает субстрат для клональной селекции и дальнейшего неограниченного роста, в том числе под воздействием разнообразных экзогенных и эндогенных воздействий (микроокружения, иммунной системы, изменения pH, питательных веществ и др.).

A. Kreso и J.E Dick (2014) разработали концепцию, согласно которой среди опухолевых клеток только ограниченная популяция так называемых «стволовых клеток опухоли» (СКО) обладает способностью поддерживать самообновление и генерировать функциональную гетерогенность подобно нормальным стволовым клеткам в организме человека. СКО

представляют собой немногочисленные покоящиеся клетки с неограниченным потенциалом деления и способностью дифференцироваться в морфологически разнообразное потомство [19]. В процессе клеточного деления при возникновении хромосомных перестроек, делеций, транслокаций и точечных мутаций стволовые клетки приобретают новые свойства, которые позволяют им инициировать канцерогенез. Дальнейшее клональное разнообразие формирует все новые продолжающиеся генетические изменения. Согласно этой гипотезе именно СКО отвечают за основные аспекты биологии злокачественных новообразований, такие как онкогенез, метастазирование и лекарственная устойчивость [20]. Позднее было показано, что гипотезы А. Кreso и Р.С. Nowell – не взаимоисключающие, а дополняющие друг друга, поскольку СКО также могут представлять собой единицу отбора в процессе туморогенеза и опухолевой прогрессии [21].

В настоящее время в результате проведения глубокого секвенирования образцов первичных опухолей, таких как рак молочной железы [22], предстательной железы [23], меланома кожи [24], колоректальный рак [25], рак поджелудочной железы [26], рак мочевого пузыря [27], получены доказательства справедливости моноклональной теории происхождения злокачественных опухолей. В этой связи особенно интересными представляется изучение процессов, происходящих в индуцированных злокачественных опухолях, развившихся в результате агрессивного воздействия канцерогенов на соматические клетки. В этом случае логичным было бы предположить поликлональный характер последующей опухолевой прогрессии. Несмотря на это, J. Zang с соавт. (2014), на основании результатов секвенирования 48 опухолевых образцов, полученных от 11 пациентов с аденокарциномой легкого злоупотреблявших курением, показали, что все клоны имеют общее происхождение [28].

Предложенный F. Sanger (1975) метод секвенирования ДНК позволяет оценить генетические изменения только в ограниченном количестве генов в опухоли. Современная технология секвенирования следующего поколения (NGS) одновременно определяет миллионы геномных фрагментов, сравнивая генетические вариации множества клеток в опухоли, что продемонстрировало внутриопухолевую гетерогенность в целом ряде злокачественных новообразований. L.V. Alexandrov с соавт. (2013) проанализировали 4 938 362 мутации в 7 042 образцах различных опухолей и обнаружили наибольшее количество соматических мутаций в клетках меланом и плоскоклеточного рака легкого и наименьшее – в астроцитомах [29]. Позже, когда инструменты секвенирования ДНК стали более эффективными и чувствительными, появилась возможность реконструировать хронологию мутаций, происходящих в опухолевых клетках с течением времени. Эти исследования привели к появлению нескольких модифицированных теорий: 1) линейная, 2) разветвленная, 3) нейтральная и 4) прерывистая (точечная) [30] (рис. 1).

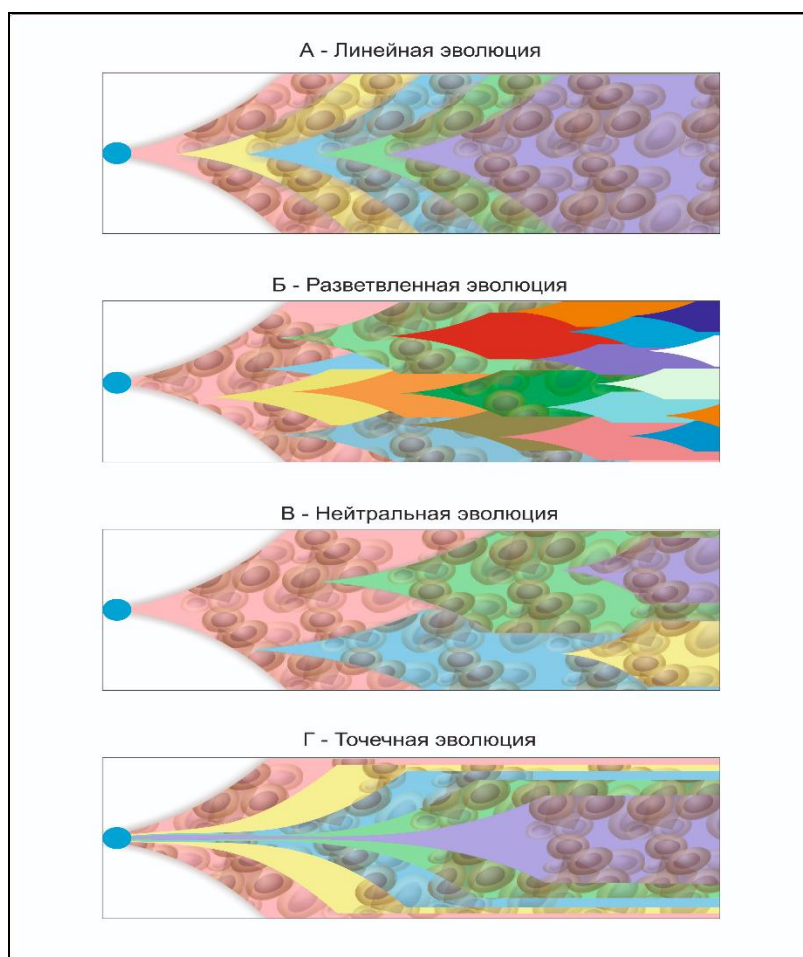


Рисунок 1 – Модели опухолевой эволюции:

А – линейная; Б – разветвленная; В – нейтральная; Г – точечная.

Цветом обозначены клоны с различным генотипом (по A. Davis с соавт., 2017 [30])

Десятки лет *линейная модель* эволюции опухоли считалась наиболее популярной среди исследователей онкогенеза. Согласно этой модели, к образованию опухоли ведет последовательная цепочка специфических мутаций, в результате которых клетки приобретают все более агрессивные свойства и способность к метастазированию.

В настоящее время все больше доказательств получает *ветвящаяся модель* эволюции, которая предполагает, что опухолевые клоны расходятся от общего предка и в дальнейшем развиваются параллельно, что приводит к появлению нескольких равнозначных субклонов. Впоследствии новые мутации продолжают накапливаться в опухолевых клетках, увеличивая внутриопухолевую гетерогенность. Правоту этой гипотезы иллюстрируют многочисленные исследования солидных опухолей человека эпителиального и мезенхимального происхождения, включая рак молочной железы [22], яичников [31], почки [32], остеогенные саркомы [33], липосаркомы [34]. Во всех случаях авторы отмечали выраженную вариабельность генома в



опухолях различных нозологий. В частности, наибольшие различия между субклонами продемонстрированы при трижды негативном раке молочной железы: в исследовании когорты из 104 пациенток с этим типом заболевания выявлено до 19 клональных субпопуляций на опухоль [35]. Несколько позже Н.С. Veird с соавт. (2018) провели геномное профилирование образцов 17 пациентов с недифференцированными и высокодифференцированными саркомами и обнаружили увеличение числа соматических мутаций с накоплением субклонов в процессе потери дифференцировки [36].

*Нейтральная модель* эволюции опухоли также предполагает постепенное изменение опухолевых клеток с течением времени, но, в отличие от ветвящейся модели, все основные изменения, представляющие собой драйверные мутации, которые отвечают за опухолевую трансформацию и дальнейшую диссеминацию, происходят в самой первой трансформированной клетке. Описано, что последующие мутации не приводят к какому-либо значимому эффекту. Случайные мутации, накапливаясь, индуцируют генетический дрейф и образование множества равнозначных субклонов. В этом случае внутриопухолевая гетерогенность является побочным продуктом такой эволюции и не приводит к доминированию какой-либо из образовавшихся ветвей, отрицая тем самым основные принципы дарвиновской эволюции. Возможность существования подобной модели была показана M.J. Williams с соавт. (2016) с помощью математического моделирования на основе результатов полногеномного секвенирования 819 образцов 14 типов солидных опухолей. Эффективность модели была подтверждена в 31,6% случаев (259 из 819) [37].

Таким образом, в случае отсутствия каких-либо значительных внешних изменений, позволяющих части опухолевых клонов приобрести конкурентное преимущество перед остальными, эволюция опухоли может идти по пути постепенного повышения внутриопухолевой гетерогенности [30]. Понимание того, что клональная динамика внутри опухоли может быть нейтральной, предполагает важность оценки таких показателей, как влияние частоты мутаций на митотическое деление и временной интервал мутации для прогнозирования и персонализации терапии [37].

Если описанные непрерывные модели эволюции опухолей предполагают постепенное приобретение опухолевыми клетками разнообразных мутаций в течение значительного периода времени, то *прерывистая (точечная) модель* принципиально отличается отсутствием промежуточных звеньев. Многочисленные клоны опухолевых клеток возникают на самых ранних этапах развития опухоли и несут геномные (анеуплоидии) и хромосомные (хромотрипсис) изменения, что позволяет называть эту модель моделью «большого взрыва» [25]. Подобные изменения коррелируют с высокоагрессивной формой заболевания и обнаружены, в частности, в 25% случаев остеогенных сарком [38].

В настоящее время многие исследователи склонны рассматривать *гибридные модели* клональной эволюции, так как появляются свидетельства того, что разные эволюционные механизмы могут функционировать одновременно или сменять друг друга с течением времени. Привлекательность гибридной модели заключается в предположении, что все драйверные мутации приобретаются на начальных стадиях эволюции опухоли, после чего клоны размножаются без дальнейшего отбора. Подобные феномены обнаружены при изучении генетических изменений в клетках опухолей молочной железы при прогрессировании заболевания. Так, Y. Wang с соавт. (2014), изучая клональное разнообразие и мутационную эволюцию опухолевых клеток у пациенток с раком молочной железы на основании результатов секвенирования генома отдельных клеток, установили, что ни одна клетка не имела идентичного геномного профиля [39]. Таким образом, мутации, связанные с изменением числа копий генов, характерны для начальных периодов формирования опухолевого клона, а последующие точечные мутации приводят к дивергенции клеточного потомства и генерации значительной клональной неоднородности в ткани опухоли [40].

Показано, что гетерогенность опухолей выявляется не только у разных пациентов, но и в пределах новообразования одного и того же больного. При этом единичный гистологический анализ образца опухолевой ткани, результаты которого служат для определения врачебной тактики, не дает полного представления о характере опухоли и обо всем генетическом многообразии составляющих ее клеток. По утверждению M. Gerlinger с соавт. (2014), геномный анализ, основанный на единственном образце биопсии, создает иллюзию «клонального доминирования» [32]. Это заключение было сделано на основании исследования внутриопухолевой гетерогенности почечно-клеточных карцином 10 пациентов. Авторы наблюдали значительную внутриопухолевую молекулярную гетерогенность: три четверти всех мутаций представляли собой различные субклональные мутации, присутствующие в геноме отдельных клеток, находящихся в разных участках одной опухоли. Таким образом, если базироваться на результатах подобного анализа в единственном образце, можно создать ложное представление о характеристиках опухоли, что может привести к назначению неадекватной таргетной терапии. I.H. Rye с соавт. (2018) оценили клиническое значение гетерогенности внутриопухолевой экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu, опираясь на анализ 13 тысяч отдельно взятых опухолевых клеток в злокачественных новообразованиях молочной железы. Для изучения эволюции опухоли образцы были взяты до (n=37) и после неoadьювантной химиотерапии и таргетной терапии (n=22), а также из трех различных метастатических очагов. Ученые обнаружили, что высокая внутриопухолевая гетерогенность была связана с короткой безрецидивной выживаемостью и недостаточным ответом на таргетную терапию трастузумабом [41].

Таким образом, внутриопухолевая гетерогенность не может быть в полной мере оценена с помощью секвенирования биоптата, что диктует необходимость разработки иных диагностических подходов [42].

## 1.2. Индуцированная клональная опухолевая селекция

Интенсивность эволюционных процессов в опухоли, усиливается под воздействием различных терапевтических воздействий. При этом утрачивается лежащий в основе эволюции случайный характер изменений. Для определения эволюционных процессов, происходящих в опухоли под влиянием лечения может быть использован термин – «опухолевая/клональная селекция» (рис. 2).

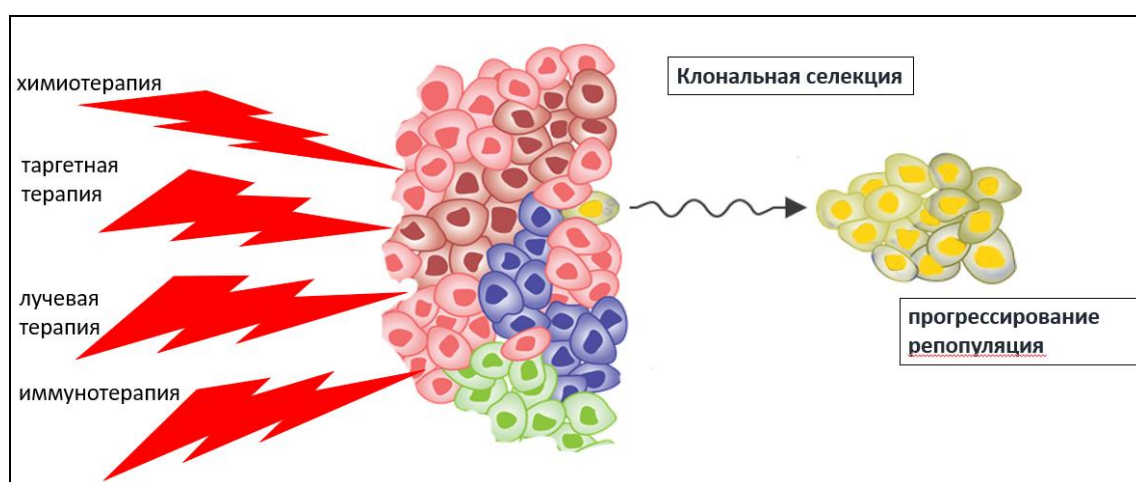


Рисунок 2 – Клональная селекция опухолевых клеток под воздействием терапевтического воздействия

Согласно определению Н.И. Вавилова, селекция представляет собой «эволюцию, направленную волей человека» [43]. Таким образом, термин «селекция» в полной мере может быть применен к процессам, искусственно инициированным в опухолевых клетках, в ходе проводимого лечения. Степень гетерогенности опухоли в данном случае приобретает критическое значение, и этот фактор обязательно следует учитывать при планировании терапии. Эффективность лекарственного воздействия будет зависеть от клонального разнообразия в популяции опухолевых клеток [44]. Если опухолевая популяция достаточно однородна – моноклональна, в процессе терапии она может быть практически полностью уничтожена, или воздействие лекарственного средства приведет к значительному уменьшению ее численности с последующим восстановлением опухолевой массы за счет пролиферации устойчивых клонов (рис. 3 А). Напротив, в гетерогенной опухоли, где клоны конкурируют

между собой, элиминация чувствительных к терапии клеток может привести к резкому росту оставшихся, нечувствительных к лечению опухолевых клонов (рис. 3 Б).

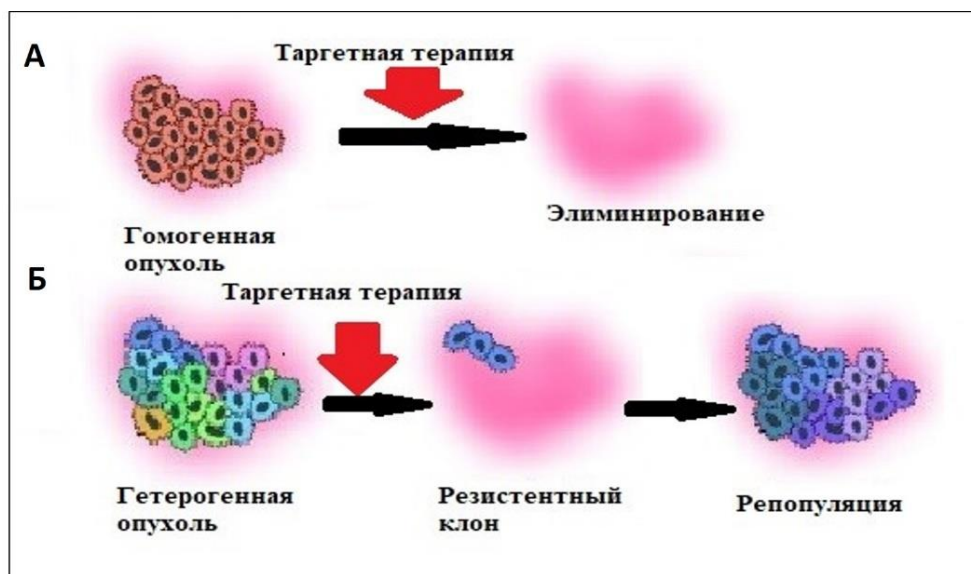


Рисунок 3 – Внутриопухолевая гетерогенность как универсальный прогностический маркер:

А – уничтожение гомогенной популяции опухолевых клеток в ответ на терапевтическое воздействие; Б – существование устойчивого к лекарственной терапии минорного клона в популяции приводит к клональной селекции опухолевых клеток с последующим восстановлением опухолевой массы (по L. Gay с соавт., 2016) [44]

Неоплазии представляют собой гетерогенные популяции опухолевых клеток, содержащие генетические мутации, ответственные за формирование лекарственной устойчивости в минорных клонах. Поэтому количественное определение внутриопухолевой гетерогенности рассматривается в качестве универсального прогностического биомаркера. Так, С.-Z. Zhang с соавт. (2015), проанализировав образцы аденокарциномы молочной железы, показали повышенную способность к метастазированию и устойчивость к химиотерапии там, где была определена высокая вариабельность РНК-транскриптов [45]. L. Gay с соавт. (2016) продемонстрировали связь между неблагоприятным прогнозом и выраженным клональным разнообразием у пациентов с аденокарциномой легкого, острым миелолейкозом и раком яичников [44]. М.С. Lee с соавт. (2014) провели полногеномное секвенирование клеток линии рака молочной железы MDA-MB-231 и выявили высокую гетерогенность экспрессии генов среди отдельных клеток [46]. После того как культура опухолевых клеток была обработана паклитакселом, образовалась активно пролиферирующая популяция резистентных к противоопухолевому агенту клеток, с меньшей генетической гетерогенностью, но

отличающаяся экспрессией уникальных генов, отвечающих за стабилизацию микротрубочек и адгезию клеток.

Таким образом, внутриопухолевая гетерогенность являлась субстратом для последующей клональной селекции под воздействием химиотерапевтических препаратов. При этом необходимо отметить, что только генетической гетерогенностью невозможно объяснить фенотипическое разнообразие опухолевых клеток, тем более что разные клоны могут демонстрировать различное поведение, будучи идентичными генетически, благодаря сложным эпигенетическим изменениям (метилование, модуляция хроматина, экспрессия генов) [47].

Можно утверждать, что выраженное генетическое разнообразие клеток внутри опухоли ассоциировано с высокой вероятностью формирования устойчивых к терапии опухолевых клонов. В противоположность этому, ряд злокачественных новообразований с высокой степенью внутриопухолевой гетерогенности и дефектами репарации ДНК (микросателлитной нестабильностью) характеризуется достаточно благоприятным прогнозом. Так, в исследовании A.I. Phipps с соавт. (2015) в образцах опухолей 2050 пациентов была изучена корреляция между опухолевыми маркерами, такими как мутации генов KRAS и BRAF, и наличием микросателлитной нестабильности [48]. Полученные данные продемонстрировали наибольшую выживаемость в группе с наличием дефектов в системе репарации ДНК. В качестве одного из возможных объяснений может быть названа высокая иммуногенность таких опухолей, что определяет потенциальную возможность элиминирующего воздействия клеток иммунной системы. В работе K.H. Allison и G.W. Sledge (2014) на обширном материале было показано, что метастатические очаги могут существенно отличаться друг от друга и от первичной опухоли на уровне генома [4]. В частности, для колоректального рака в 11,6% случаев было обнаружено различие по мутации в гене KRAS между первичной опухолью и метастазами. При раке легкого частота расхождений по активирующей мутации в гене EGFR в парных метастазах достигала 24,4%, а у пациентов, получавших между биопсиями терапию ингибиторами EGFR, увеличивалась до 26,3%. Наблюдения авторов объясняют, почему метастазы одной опухоли демонстрируют разную реакцию на проводимое лечение: от резкого сокращения размера до продолжающегося роста [4]. Таким образом, первоначально метастатические очаги представляют собой результат эволюции субклона первичной опухоли, но в дальнейшем в них происходит дальнейшая независимая клональная селекция опухолевых клеток. Кроме того, на формирование генетической гетерогенности в метастазах огромное влияние оказывает микроокружение, которое меняется в сравнении с таковым в первичном опухолевом очаге. Обычно клинические и молекулярно-генетические биомаркеры исследуются только в первичных опухолях, но для определения тактики лечения и прогноза исхода заболевания также необходим анализ метастатических тканей [49]. M.S. Lawrence с соавт. (2013)

проанализировали геномную гетерогенность в 3083 образцах 27 видов злокачественных новообразований в парах «первичная-метастатическая опухоль» и продемонстрировали, что средняя частота несинонимичных мутаций варьировала более чем на три порядка [50]. В этом исследовании выявлены существенные различия между опухолями, подвергнутыми системному лечению, и случаями, в которых применяли исключительно хирургическое вмешательство: при отсутствии химиотерапевтического воздействия метастатические очаги оказались значительно более сходными с первичной опухолью. Таким образом, клональная селекция под воздействием химиотерапии существенно меняла геномный ландшафт в метастатических очагах.

Исследования влияния гормонотерапии на экспрессию рецепторов к эстрогенам в опухолях молочной железы показали, что мутации в гене, кодирующем эти рецепторы, практически не встречались при первичном раке молочной железы, однако у пациенток с метастазами на фоне проведения гормонотерапии их число возрастало до 12% [4]. При этом на долю утяжеляющих клиническое течение мутаций пришлось 10,1% случаев, и потеря рецепторов к эстрогенам в метастатических очагах составила 12,4%. На фоне химиотерапии гетерогенность увеличивалась, что, с одной стороны, было связано с положительной опухолевой селекцией уже существующих мутантных клонов, с другой стороны, являлось следствием вновь индуцированных мутаций. Связь химиотерапии с изменением внутриопухолевой гетерогенности была показана также в работе D.A. Landau с соавт. (2013), которые исследовали эволюцию субклональных мутаций при хроническом лимфолейкозе [51]. Измеряя количество мутаций в нескольких временных точках, авторы отметили проявления клональной селекции у 10 из 12 пациентов с хроническим лимфолейкозом, получавших химиотерапию, и только у одного из шести, не получавших лечение. Описанная эволюция клонов проявлялась в возникновении новых мутаций, частота обнаружения которых увеличивалась со временем.

Клональная селекция способствует повышению выживаемости малигнизированных клеток в неблагоприятных условиях под воздействием высокодозной химиотерапии. Американские исследователи предложили несколько иной подход: введение низких доз химиопрепаратов в течение длительных периодов времени в рамках метрономной терапии для поддержания объема опухоли на постоянном уровне [52]. Теоретическая концепция, лежащая в основе этой стратегии, основана на идее контроля размеров популяции существующих доминантных опухолевых клонов таким образом, чтобы минорные клоны не получали селективного преимущества. Данная методика нуждается во всестороннем изучении, в том числе и на биологических моделях, в качестве которых могут быть использованы культуры клеток солидных опухолей.

### 1.3. Стволовые клетки опухоли и их значение для опухолевой селекции

Высокая внутриопухолевая гетерогенность считается основной причиной низкой эффективности терапевтических стратегий. Согласно эволюционной теории, каждая клетка внутри опухоли обладает туморогенным потенциалом. При этом случайные мутации в отдельных опухолевых клетках способствуют отбору наиболее приспособленного клона. Со временем дополнительные благоприятные мутации порождают генетически дивергентные субклоны, которые независимо друг от друга поддерживают свой злокачественный потенциал. Согласно альтернативной гипотезе, туморогенез обуславливает существование стволовых клеток опухоли (СКО), наделенных способностью к неограниченному самообновлению, которые дифференцируются в субклоны с формированием клеточной иерархии [53]. Особенность СКО заключается в способности образовывать пул клеток с низкой пролиферативной активностью, устойчивых к химиотерапии и ответственных за рецидивирование и метастазирование. СКО обладают рядом общих свойств с нетрансформированными стволовыми клетками: способностью к самообновлению; экспрессией транскрипционных факторов (OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 и MYC); экспрессией фермента поверхностных маркеров, таких как CD44, CD133 и высокой активностью внутриклеточного альдегиддегидрогеназы (ALDH1); наличием антиапоптотических механизмов и экспрессией АТФ-связывающих транспортеров лекарственных средств [54]. Однако, в отличие от нормальных стволовых клеток, СКО характеризуются дисрегуляцией этих признаков и обладают способностью контролировать сигналы стволовости [55].

Концепция СКО остается горячо обсуждаемой темой научных исследований. Высказано предположение, что эволюционная и иерархическая теории не являются взаимоисключающими, поскольку СКО могут происходить не только от злокачественно трансформированных стволовых, но и от опухолевых клеток без признаков стволовости, в результате их дедифференцировки [56]. Поэтому целенаправленного устранения существующих СКО недостаточно, поскольку результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что они могут быть вновь образованы путем перепрограммирования из опухолевых клеток без признаков стволовости [57].

Хотя подтверждения существования СКО на сегодня не получено и не существует определенного перечня маркеров, позволяющих однозначно определить СКО, исследования в этой области необходимы в первую очередь для оценки роли СКО в опухолевой селекции и разработки новых терапевтических стратегий. Так, специфическим таргетированием стволовых клеток объясняется один из механизмов действия трабектедина – относительно нового препарата для лечения СМТ [58]. Для идентификации и выделения стволовых клеток сарком используются различные подходы, включающие обнаружение и изучение клеток, несущих

универсальные маркеры СКО (CD44, CD133) или альдефлуориметрический анализ, направленный на обнаружение клеток, сверхэкспрессирующих ферменты семейства альдегиддегидрогеназ, таких как ALDH1A1 и ALDH1A3. Недостатком этих подходов может быть само предположение, что наличие экспрессии указанных маркеров однозначно детектирует клетки в саркомах как СКО, что требует научного подтверждения [11; 59; 60]. Тем не менее на экспериментальных моделях сарком из трансформированных мезенхимальных стволовых клеток человека и в опухолевых ксенотрансплантатах показано, что прогрессирование сарком было связано с увеличением популяции клеток, позитивных по ALDH [61]. М.Е. Toledo-Guzmán с соавт. (2018) подтвердили роль ALDH не только в качестве биологического маркера СКО, но и в качестве индикатора неблагоприятного клинического исхода, как в экспериментальных моделях, так и клинических исследования [62]. В этом исследовании авторы показали, что прямое или косвенное ингибирование ALDH с использованием специфических ингибиторов или ретиноевой кислоты показало снижение активности ALDH, наряду со снижением клеточной пролиферации, инвазии и устойчивости к лекарственным препаратам. Х. Му с соавт. (2015) продемонстрировали способность ALDH к антиоксидантной и субстрат-специфической инактивации лекарственных препаратов, стимуляции пролиферативной активности опухолевых клеток с использованием сигналов ретиноевой кислоты и подтвердили взаимосвязь между высокой активностью ALDH и метастатическим потенциалом в различных солидных новообразованиях, в том числе в остеогенной саркоме [63]. Белки ALDH были использованы в качестве маркеров для идентификации СКО в таких СМТ, как эмбриональная рабдомиосаркома [64], липосаркома [65], остеосаркома, в которых их экспрессия коррелирует с более высокой скоростью пролиферации и ассоциирована с повышенной лекарственной устойчивостью и метастатическим фенотипом [66].

Еще один гликозилированный трансмембранный антиген проминин-1 (CD133) рассматривается в настоящее время в качестве универсального маркера опухолевых стволовых клеток. Считается, что высокая экспрессия CD133 также связана с метастатическим потенциалом опухоли и устойчивостью к терапии в первую очередь за счет участия в процессах ангиогенеза, апоптоза и аутофагии [67]. Экспрессия CD133 зарегистрирована в самых различных злокачественных новообразованиях, таких как: опухоли центральной нервной системы, печени, предстательной железы, легких, толстой кишки и поджелудочной железы. Y. Xie с соавт. (2018) сообщили о связи экспрессии CD133, определенной в образцах парафиновых блоков, с отдаленным метастазированием при остеогенной саркоме и возможности применения этого биомаркера для прогнозирования у данной категории больных [68].



#### **1.4. Раково-тестикулярные антигены/гены и их роль в опухолевой прогрессии**

РТА – это опухолеассоциированные антигены с физиологической экспрессией в яичнике и семенниках, обнаруживаемые при различных злокачественных новообразованиях, включая саркомы. Из-за своего ограниченного паттерна экспрессии и высокой иммуногенности РТА приобрели популярность в качестве многообещающих мишеней для противоопухолевой иммунотерапии.

Антигенные свойства традиционно приписываются иммунопривилегированным органам, таким как яичко, которое защищено от контакта с клетками иммунной системы барьером из клеток Сертоли. Это препятствие не является полностью непроницаемым, и именно поэтому развивающиеся сперматозоиды не экспрессируют основные молекулы комплекса гистосовместимости (HLA) I класса. Это обстоятельство имеет особое значение для использования РТА в качестве привлекательных мишеней для иммунотерапии, снижая опасность возникновения аутоиммунных осложнений. Кроме того, в последнее время РТА и соответствующие им гены (РТГ) зарекомендовали себя как надежные диагностические и прогностические биомаркеры [69].

Впервые термин РТА был введен Y.T. Chen с соавт. (1997) [70]. В настоящее время изучено и описано более 276 РТА, информация о которых представлена в онлайн-банке данных института исследования рака им. Людвига (<http://www.cta.lncc.br>) [71]. В зависимости от местоположения генов выделяют две группы РТА/РТГ. В первую включают РТА кодируемые генами X-хромосомы, во вторую связанные с соматическими или Y-хромосомой. Итого: на X-хромосоме расположены 128 генов РТА, на аутосомах – 138 генов, 9 – на Y-хромосоме и один ген с неизвестной локализацией [72]. X-хромосомные РТГ компактно расположены в области Xp11 и Xq26-q28 отличаются множественным числом копий генов и образованием кластеров. В герминогенных органах эти гены обычно экспрессируются на стадии сперматогония [73]. Вместе с тем не X-хромосомные РТГ широко распространены по геному и создают исключительно единичные копии. В нормальном яичке они экспрессируются на более поздних этапах сперматогенеза [74]. До сих пор не до конца известной остается роль РТА/РТГ в процессах туморогенеза, однако существует множество доказательств их участия в приобретении химиорезистентности, регуляции клеточного деления, дифференцировки и апоптоза [75]. Существуют обоснованные предположения, что все фенотипические характеристики опухоли, включая иммунное уклонение, клеточное бессмертие, гипометилирование, инвазивный потенциал и способность к метастазированию определяют именно РТА/РТГ [76]. С другой стороны, РТА связаны с поддержанием недифференцированного состояния стволовых клеток [77]. Согласно исследованиям S.N. Akers с соавт. (2010) aberrантная экспрессия РТГ в опухоли отражает реактивацию нарушенной

гаметогенной программы в соматических клетках, что становится одной из движущих сил туморогенеза [78]. По данным А. Jay с соавт. (2021), РТА экспрессия в соматических клетках приводит к геномной нестабильности, нарушая пути репарации ДНК [79]. В настоящее время предпринимаются попытки разработки универсальной для разных типов опухолей панели РТГ.

Так, А.А. Solodovnik с соавт. (2018) предложили панель из 11 РТГ *GAGE1*, *HAGE*, *NY-ESO1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SLLP1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* для онкогематологических и ряда солидных новообразований [80]. Авторы подтвердили универсальность разработанной модели для различных миело- и лимфопролиферативных заболеваний, меланомы. А. Danilova с соавт. (2020) оценили профили экспрессии этих РТГ в клеточных культурах меланом и сарком, показали сходные закономерности их транскрипционной активности и подтвердили возможность использования универсальной панели РТГ для эффективного таргетирования различных гистологических типов опухолей [81]. Среди РТГ, включенных в универсальную панель, для сарком наиболее изучены гены *MAGE*, *NY-ESO-1*, *PRAME* и *SSX* [72]. Остальные перспективны для изучения как представители крупных семейств, которые обнаруживаются при целом ряде злокачественных образований, отличаются доказанной иммуногенностью и отвечают за процессы, происходящие в опухоли на разных этапах ее прогрессии. Эти РТГ задействуют различные механизмы в онкогенной регуляторной цепи участвуя в процессах клеточной пролиферации, инвазии, способствуя химиорезистентности и предотвращая апоптоз [80].

Многочисленные исследования подтверждают значимость РТГ в качестве прогностических и предиктивных маркеров при саркомах. Так, высокая транскрипционная активность *MAGE-A* ассоциирована с метастазированием и низкой эффективностью химиотерапии при остеосаркоме [82]. К. Iura с соавт. (2017) продемонстрировали связь между экспрессией *NY-ESO-1* и распространенностью опухолевого процесса при синовиальной саркоме, а сочетанная экспрессия *MAGE-A4*, *NY-ESO-1* и *PRAME* в этом исследовании коррелировала с негативным прогнозом [6].

Важность РТГ и кодируемых ими РТА заключается также в возможности использования в качестве мишеней для противоопухолевых вакцин. Наибольшее число разработок в этой области посвящено высокоиммуногенным белкам *MAGE*, *NY-ESO-1* и *PRAME* [83–85]. Так, N. Somaiah с соавт. (2019) опубликовали результаты клинического исследования трансдуцированной *NY-ESO-1* дендритноклеточной вакцины против *NY-ESO-1*-экспрессирующих опухолей, показав эффективность терапии в виде стабилизации заболевания у 62,5% пациентов с саркомами [86]. Также РТА используются для создания генно-инженерных Т-лимфоцитов с химерным рецептором. S.P. D'Angelo с соавт. (2018) применили генно-инженерные Т-лимфоциты с рецептором, модифицированным против *NY-ESO-1* [87].

Объективный ответ в этом исследовании был достигнут у 50% пациентов (6/12) и продолжался в течение нескольких месяцев.

### **1.5. Основные сведения о биологии сарком мягких тканей и остеогенных сарком**

Саркомы представляют собой необычайно обширную и в высшей степени гетерогенную группу редких солидных новообразований, единственным объединяющим критерием для которых является происхождение из мезенхимальных клеток. Гетерогенность проявляется не только между разными гистологическими подтипами, но и на внутриопухолевом уровне. Если классифицировать саркомы по генетическим критериям, можно выделить две большие группы: саркомы с преимущественно нормальными кариотипами и дискретными структурными хромосомными изменениями и саркомы со сложными кариотипами и выраженной кариотипической нестабильностью [88]. К первой группе относятся, в частности, саркомы пациентов детского возраста, которые часто зависят от реципрокных транслокаций для активации специфических онкогенов. Саркомы у взрослых пациентов – в том числе остеосаркома, хондросаркома, большинство липосарком, фибросаркома, ангиосаркома, лейомиосаркома и недифференцированная плеоморфная саркома – обычно имеют сложные кариотипы с многочисленными структурными и числовыми изменениями [89]. Наиболее традиционная гистопатологическая классификация делит саркомы на две большие группы по типу ткани первичной манифестации, а именно саркомы костей, включая остеосаркомы и хондросаркомы, и саркомы мягких тканей, включая липосаркомы, фибросаркомы, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, недифференцированные плеоморфные саркомы, а также большую группу других сарком [90]. Высокая генетическая нестабильность и внутриопухолевая гетерогенность этих опухолей являются причинами формирования резистентности к проводимому лечению, частого метастазирования и неблагоприятного прогноза [91]. При этом, даже для групп сарком, объединенных общим происхождением, отсутствует единый эволюционный механизм опухолевой трансформации.

#### **1.5.1. Особенности клональной эволюции сарком мягких тканей**

Большинство выводов о клональной эволюции опухолевых клеток сделано на основе анализа данных, полученных при изучении гемопоэтических злокачественных образований и опухолей эпителиального происхождения [92]. Однако СМТ и ОС – солидные опухоли мезенхимального происхождения, могут иметь иные механизмы генетической гетерогенности. СМТ клинически и генетически неоднородны, разные гистотипы демонстрируют различные мутационные профили с преобладанием в одних случаях мутаций на уровне нуклеотидных

последовательностей, а в других – в виде геномных и хромосомных aberrаций. До сих пор остается малоизученным тот факт, в какой степени эти факторы воздействуют на клональную эволюцию и, соответственно, внутриопухолевую гетерогенность при этих заболеваниях. В исследовании J. Hofvander с соавт. (2018) методом полноэкзомного секвенирования проанализировали 54 образца СМТ 20 пациентов на протяжении длительного промежутка времени (306 мес.), в том числе 5 высокодифференцированных липосарком, 9 миксоидных липосарком и 6 миксофибросарком со сложным геномом [34]. Интересно, что в группе высокодифференцированных липосарком получены данные о преобладании нейтральной эволюции с минимальными клональными изменениями на протяжении всего периода наблюдений, миксоидные липосаркомы продемонстрировали относительную генетическую стабильность с медленными клональными изменениями, связанными с мутациями на уровне нуклеотидов, а клональная эволюция миксофибросарком со сложным геномом сопровождалась хромосомными и геномными мутациями. Кроме того, анализируя геномные aberrации в клетках опухолей с использованием математических моделей, ученые показали, что генетические изменения, предшествующие образованию метастазов, присутствовали задолго до выявления первичной опухоли, что позволило предположить, что формирование агрессивных клонов на ранних стадиях происходит через реализацию эволюционной модели «большого взрыва».

C. Walther с соавт. (2016), изучая 19 образцов рабдомиосарком различных гистологических подтипов, обнаружили выраженную генетическую гетерогенность и большое число субклональных хромосомных и геномных мутаций в этих опухолях, включая изменения ploидности клеток, при этом высокая степень клонального разнообразия коррелировала с худшими результатами лечения у этих пациентов [93]. В атлас генома опухолевых клеток включена информация о 206 образцах 6 основных гистологических типов СМТ, взятых у взрослых пациентов. Пять из них характеризуются сложным комплексным кариотипом, вывод был сделан на основании изучения 80 образцов лейомиосарком, 50 недифференцированных липосарком, 44 недифференцированных плеоморфных сарком, 17 миксофибросарком, 5 опухолей из оболочек периферических нервов [94]. Шестой тип представлен 10 образцами синовиальной саркомы с простым кариотипом. На основании результатов полногеномного секвенирования, были получены данные о низком уровне соматических мутаций в образцах, исследованных СМТ. Выявлены 3 гена (*TP53*, *ATRХ*, *RBI*), мутации в которых встречались чаще всего. При этом мутации *TP53*, антионкогена, экспрессирующего транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, наиболее часто обнаруживались в лейомиосаркомах (50% случаев). На втором месте по частоте выявляемости были изменения в гене *ATRХ*, которые связывают с репликативными нарушениями, приводящими к увеличению длины

теломер. Так, 30% недифференцированных липосарком имели делеции в этом гене. Мутации в гене-супрессоре *RB1*, ключевом компоненте негативного контроля клеточного цикла, встречались в недифференцированных плеоморфных саркомах, миксофибросаркомах и лейомиосаркомах, составляя до 15% всех мутаций при лейомиосаркомах. В исследовании N.D. Anderson с соавт. (2021) также были подтверждены частые изменения *TP53*, *RB1*, *PTEN* и *ATRX* при анализе 70 геномов и 130 транскриптомов первичных, рецидивных и метастатических лейомиосарком [95]. Пространственно разобщенные очаги демонстрировали различный мутационный профиль. Результаты исследования поддерживают разветвленную модель эволюции, в которой клоны расходятся от общего предка и эволюционируют параллельно, что приводит к образованию множества клональных линий.

### 1.5.2. Особенности клональной эволюции остеогенных сарком

Остеогенные саркомы характеризуются высокой степенью генетической гетерогенности, связанной со сложными генетическими aberrациями и значительными внутригрупповыми вариациями, которые затрудняют идентификацию драйверных генов. Быстрое прогрессирование ОС и раннее метастазирование предполагает необходимость мультимодальных подходов в лечении, которые в настоящее время могут обеспечить долгосрочную выживаемость не более, чем у 40% пациентов [96]. Частично объяснение неудач в лечении может быть связано с различиями в структурных aberrациях, инициирующих начало заболевания и приводящих к множеству мутаций в генах, из-за чего терапевтические мишени для ОС до сих пор так и не определены.

J.A. Perry с соавт. (2014) представили результаты комплексного секвенирования 59 образцов ОС [97]. С наибольшей частотой (75%) в этом исследовании обнаружены изменения в гене *TP53*. При этом в 34% случаев имели место множественные механизмы инактивации *TP53*. Кроме того, в единичных случаях отмечены мутации в гене *PTEN*, представляющем собой ген-супрессор, негативный регулятор пути PI3K/Akt/mTOR, и *RB1*, ген-супрессор, кодирующий белок ретинобластомы. В другой работе J.W. Martin с соавт. (2014) сообщают об анализе экспрессии генов в 32 случаях ОС у детей, также подтверждая высокое значение нарушений путей регуляции *RB1*, *TP53*, *PI3K* и *PTEN* при этом типе опухолей [98]. С наибольшей частотой обнаруживались мутации в следующих генах: *RUNX2*, кодирующем регуляцию дифференцировки костной ткани; *CDC5L*, регуляторе клеточного цикла; *MDM2*, инактиваторе транскрипции *TP53*; *RECQL4*, кодирующем ДНК-геликазу, и *CDK4*, кодирующем циклинзависимую киназу.

D. Vaumhoer (2016) представил результаты анализа секвенирования и количества генных копий 123 образцов ОС, полученных до начала лечения, что позволило выявить мутации

в 14 генах [33]. Хотя почти половину всех выявленных мутаций составляли изменения в генах *TP53* и *RB1*, не было найдено ни одной мутации, которая отвечала бы за инициацию этого типа опухолей. При полноэкзомном секвенировании 31 образца первичных ОС, М. Kovacs с соавт. (2015) также обнаружили мутации в генах *TP53* и *RB1* [42]. Кроме того, более 80% ОС в этом исследовании демонстрировали признаки, характерные для опухолей с дефицитом *BRCA1/2* и нестабильностью генома, что открывает новые перспективы к разработке подходов к лечению этой гетерогенной группы заболеваний. Н. Ху с соавт. (2018) продемонстрировали, что потеря генов *TP53* или *RB1* является одним из ранних событий остеосаркомогенеза, а утрата *PTEN* связана с метастазами в легких [99]. Филогенетический анализ в этом исследовании показал, что метастатические опухоли легких часто содержат клоны, которые отсутствуют или редки в первичных опухолях.

### **1.6. Современные представления о терапии сарком в контексте существующей теории клональной эволюции**

Хотя явление клональной гетерогенности на морфологическом, гистологическом и генетическом уровнях хорошо охарактеризовано, функциональная роль различных опухолевых клонов во время эволюции опухоли изучена недостаточно, особенно в случае опухолей мезенхимального происхождения, таких как СМТ и ОС [92]. В частности, остается нераскрытым вопрос, как различные клоны опухоли способствуют первичному росту опухоли, рецидивам и метастазированию. Во время первичного прогрессирования опухоли остается неясным, обусловлен ли рост непрерывным расширением доминантного клона или поддержанием общей клональной архитектуры. Кроме того, клональный состав отдаленных метастазов плохо изучен и неизвестно, все ли клоны опухоли в равной степени способны образовывать отдаленные метастазы. Определение клонального состава опухолей на всех основных этапах развития заболевания имеет важное значение для понимания биологических последствий внутриопухолевой гетерогенности и разработки новых стратегий терапии для предотвращения прогрессирования злокачественных новообразований.

Исследование М.К. Ibragimova с соавт. (2017) показали, что под воздействием химиотерапии значительно ускоряется ход эволюционных процессов в опухоли, что приводит к появлению резистентных клонов и метастазированию опухоли [100]. Кроме того, химиотерапия может способствовать формированию нового доминирующего клона из клона, который не был таковым в первичной опухоли и получил свободное пространство за счет элиминации чувствительных клонов в процессе химиотерапевтического воздействия. В результате примерно в 20% случаях химиотерапия может стимулировать клональную селекцию, способствуя опухолевой прогрессии. Исследователи предполагают целесообразным мониторинг клональной

динамики во время лечения, например, с помощью последовательных биопсий или анализа циркулирующих опухолевых клеток. Исследование клонального состава удаленной первичной опухоли может помочь в определении выбора терапии. Если опухоль моноклональная, авторы рекомендуют использовать стратегии, направленные на специфические молекулярные aberrации в доминирующем клоне. В случае поликлональной опухоли, по мнению авторов, предпочтение следует отдавать комбинированным методам лечения. Эти же авторы предлагали проводить клонирование *in vitro* с последующим тестированием лекарственных препаратов и создание органоидных культур из клонов опухоли с последующей их генетической идентификацией.

S. Gambera с соавт. (2018) изучили клональную динамику остеосарком, полученных из мезенхимальных клеток, трансформированных путем удаления генов Trp53 и Rb [101]. Исследователи получили моноклональные опухолевые клеточные линии методом предельных разведений, метили различными флуоресцентными лентивирусными векторами и имплантировали подкожно иммунодефицитным мышам. Через 25 дней образующиеся опухоли демонстрировали поликлональный характер, доказывая, что на ранней стадии остеосаркома может состоять из сосуществующих гетерогенных популяций. При последующем наблюдении в опухоли формировались доминирующие клоны, а в процессе дальнейшего прогрессирования различные моно- и олигоклональные метастатические клоны, которые не соответствовали доминирующим клонам, первичной опухоли.

На разработанной модели авторы показали, что остеосаркомагенез может следовать нейтральной модели эволюции: различные опухолевые клоны одновременно сосуществуют и размножаются в течение длительного времени, накапливая геномные изменения, и только некоторые из них становятся локально доминирующими. Метастатическое заболевание также имеет признаки поликлональности, при этом метастатические клоны могут отличаться от клонов, доминирующих в исходной опухоли, что может привести к неэффективности противоопухолевой терапии.

Еще в одном исследовании Y.J. Tang с соавт. (2019) на мышинной модели недифференцированной плеоморфной саркомы проследили клоны опухоли в процессе опухолевой прогрессии от инициации и местного рецидива до метастазирования, используя многоцветные флуоресцентные репортеры [102]. Авторы продемонстрировали, что первичная опухолевая прогрессия связана с экспансией доминантного клона, локальные рецидивы поликлональны, а прогрессирующие отдаленные метастазы имеют моноклональное происхождение. Чтобы определить, обусловлено ли клональное происхождение метастазов нейтральным дрейфом или отбором опухолевого клона, наиболее приспособленного к колонизации, анализировали экспрессию различных флуоресцентных репортеров в метастазах

мышей, которым были пересажены идентичные поликлональные комбинации опухолевых клеток. В том случае, если бы метастазы были вызваны нейтральным дрейфом, метастазы были бы сформированы различными клонами. Напротив, если бы клональный характер метастазов был обусловлен отбором клона – один клон образовал метастазы у всех мышей, что и было показано в эксперименте. Опираясь на результаты этого исследования, можно предположить, что существуют общие закономерности в процессе формирования метастатических клонов, которые могут быть использованы при реализации новых противоопухолевых стратегий.

В недавней публикации D. Wang с соавт. (2019) описали геномные различия между первичными и метастатическими остеосаркомами [103]. Метастатические образования в этом исследовании демонстрировали значительно более высокую мутационную и неоантигенную нагрузку, иммуногенность и геномную нестабильность по сравнению с первичными. Также отмечена повышенная экспрессия PD-L1 и лимфоцитарная инфильтрация метастатических опухолевых очагов, что позволяет рассматривать противоопухолевую иммунотерапию в качестве потенциально перспективной терапии метастатической остеосаркомы.

S.W. Brady с соавт. (2019) исследовали клональную эволюцию ОС путем полногеномного секвенирования образцов первичных опухолей и метастазов 4 пациентов, получавших терапию цисплатином [104]. Были проанализированы пространственные и временные изменения опухолевых клонов, связанные с химиотерапевтическим воздействием. Авторы показали, что в большинстве случаев метастазы возникали из единичного клона. Известная способность цисплатина вызывать двухцепочечные разрывы ДНК также может способствовать мутационному процессу. В ходе исследования удалось выявить эволюционные (селекционные) изменения в опухоли и метастатических очагах, потенциально индуцированные цисплатином. Кроме того, было обнаружено, что терапия цисплатином увеличивала мутационную нагрузку в опухоли, которая может иметь значение для оптимизации терапии в случае развития химиорезистентности.

## 1.7. Заключение

Пришедшая на смену хирургии в середине прошлого века химио- и лучевая терапия были в высшей степени эффективны и по праву считались прорывными стратегиями в лечении опухолей. Направленные на активно делящиеся клетки, они значительно улучшили показатели выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями, однако не дали шанса на полное исцеление, особенно в случае развития метастатической болезни и при возникновении резистентности к терапевтическим агентам. Более глубокое понимание биологических процессов, происходящих в опухолевых клетках, за последние десятилетия привело к появлению молекулярно и эпигенетически направленных таргетных препаратов, которые позволили



отодвинуть неизбежный финал при метастатическом поражении и обеспечить, в ряде случаев, длительный контроль над онкологическим заболеванием. Однако, вследствие формирования устойчивости опухолевых клеток к проводимому лечению главная цель так и не была достигнута. Иммунотерапия позволила добиться впечатляющего успеха при некоторых неоплазиях, таких как меланома, почечноклеточный рак и рак легкого, включая полный регресс метастатических образований. Однако и в этом случае нет абсолютно точных критериев отбора пациентов, которым этот вид терапии принесет максимальную пользу, нет полного понимания, как достигнуть успеха в лечении неиммуногенных опухолей, преодолеть иммунологическую толерантность. Основной преградой, стоящей на пути прогресса в излечении онкологических заболеваний, оказались эволюционные процессы, происходящие в опухолях.

Анализ исследований по изучению клональной эволюции злокачественных новообразований показал, что опухолевый процесс сопровождается постоянным мутагенезом, при котором происходит генетическая и фенотипическая дивергенция малигнизированных клеток. Во многих опухолях выделяют субклоны, индивидуальные свойства которых создают значительные трудности в подборе таргетной терапии. Клон клеток, чувствительных к терапии, может не получить преимущества в эволюционном процессе и не участвовать в продолженном росте и формировании метастазов, что, соответственно, приведет к неудачам в лечении. Поэтому исследования, направленные на изучение процессов формирования клонов в злокачественных новообразованиях, в том числе в саркомах, чрезвычайно актуальны. Понимание того, какие клетки ответственны за формирование метастазов и прогрессирование опухолевого процесса, поможет разобраться в том, на что в итоге должна быть направлена противоопухолевая терапия.

Современные представления о клональной эволюции базируются в основном на исследованиях опухолей эпителиального происхождения. В этом отношении саркомы, ввиду своей редкости и выраженной гетерогенности, недостаточно исследованы. Однако существующие на сегодняшний день достижения демонстрируют определенные общие закономерности, которые нуждаются в дальнейшем изучении. Исследования генетической гетерогенности опухолей делают очевидным влияние дарвиновского отбора при наличии инициирующего воздействия, дающего преимущества тем клеткам, которые устойчивы к данному типу терапии. При этом отсутствие инициирующего клональную селекцию воздействия (таргетной, лучевой, высокодозной химиотерапии, иммунотерапии) способствует эволюции нейтрального характера с накоплением большого числа мутаций и формированием внутриопухолевой гетерогенности. Кроме того, сами по себе эти инициирующие воздействия способны индуцировать генетические изменения и усилить вариативность генов. Высокая генетическая неоднородность популяции опухолевых клеток усложняет выбор тактики лечения,

которое в ряде случаев становится бесперспективным, поскольку индукция новых мутаций и селекция наиболее устойчивых клонов обеспечивают дальнейший рост и диссеминацию с образованием новых очагов. Кроме того, различие первичных и метастатических очагов на уровне генома и синтеза белков нивелирует действие таргетных и химиопрепаратов, заставляя ученых и врачей всего мира искать новые подходы к лечению онкологических заболеваний.

Согласно современным рекомендациям по лечению сарком, общепризнанным стандартом неoadъювантной, адъювантной терапии и первой линией при развитии метастатического процесса являются химиотерапевтические агенты. В свете современной теории об эволюции опухоли, представляется возможным предположение о том, что в случае неоплазии с высокой степенью внутриопухолевой гетерогенности, воздействие химиотерапии способно запустить процессы клональной селекции с образованием более агрессивной опухоли с высоким метастатическим потенциалом. Для решения вопроса о возможности применения иммунотерапии в этом случае необходим поиск прогностических и предикторных маркеров на клеточном уровне, позволяющих оценить направленность онкогенеза, что позволит повысить эффективность лечения больных метастатическими СМТ и ОС.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

В исследовании было скринировано 95 пациентов с диагнозом СМТ или ОС, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с мая 2013 по май 2020 года с гистологически подтвержденным метастатическим характером заболевания у которых интраоперационно были получены фрагменты опухолевой ткани.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом НМИЦ (протокол № 20 от 23 ноября 2017 г.), все пациенты подписали информированное согласие. Образцы опухолевой ткани хранили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и использовали в соответствии с Законом о тканях человека от 2004 года.

Получены 56 клеточных линий, которые в последующем изучали и клонировали. Для научных фундаментальных исследований «случайным образом» отобрано 83 клона.

Двадцать четыре пациента (11 мужчин и 13 женщин, средний возраст 39,0 лет [95% ДИ 31,5–46,6]), после хирургического этапа лечения получали иммунотерапию аутологичными компонентами крови с иммунологическим адьювантом – аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac». Пациенты, соответствующие критериям включения в исследование, подписали информированное согласие на проведение иммунотерапии, которая была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Клинические характеристики пациентов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клинические характеристики пациентов, включенных в исследование

Характеристика		I этап	II этап
Количество пациентов, n		56	24
1	2	3	4
Средний возраст, лет (диапазон)		37,5 [95% ДИ 33,0–42,0]	39,0 [95% ДИ 31,5–46,6]
Пол:	мужской/женский	30/26	11/13
Стадия:	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	56	24

1	2	3	4	
Локализация первичного очага	конечность	38	14	
	забрюшинное пространство	3	2	
	туловище	2	2	
	средостение	2	1	
	матка	4	1	
	голова	2	1	
	прочие	5	3	
Лечение на момент забора материала:	Хирургическое	56	24	
	Лучевая терапия	27	13	
	Количество линий химиотерапии	0	3	0
		1	11	4
		2	23	7
3+		19	13	

Дизайн исследования представлен на рис. 4.

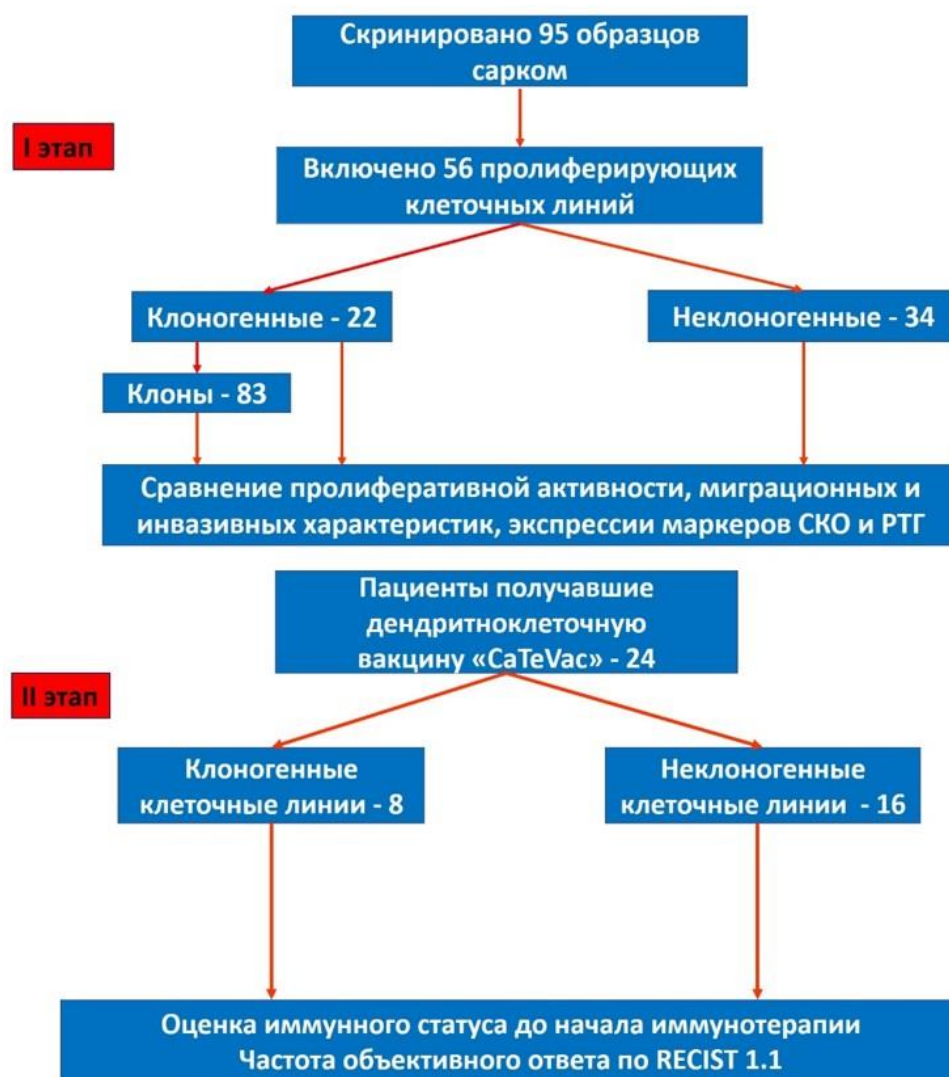


Рисунок 4. Дизайн исследования

Когорты пациентов были сопоставимыми по полу. У всех была определена IV стадия заболевания, больные получили от 0 до 6 линий химиотерапии.

Объектом исследования были: 1) опухолевые образцы, полученные интраоперационно; 2) клеточные культуры сарком на ранних пассажах и в процессе длительного культивирования; 3) клоны опухолевых культур; 4) мононуклеары периферической крови (МНПК); 5) периферическая кровь пациентов, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac».

Большая часть из 95 скринированных образцов СМТ была представлена липосаркомами 18,9% (n=18) и синовиальными саркомами 14,7% (n=14). Среди ОС остеосаркомы составили 17,9% (n=17), хондросаркомы 7,4% (n=7). Гистологические варианты сарком представлены на рис. 5.

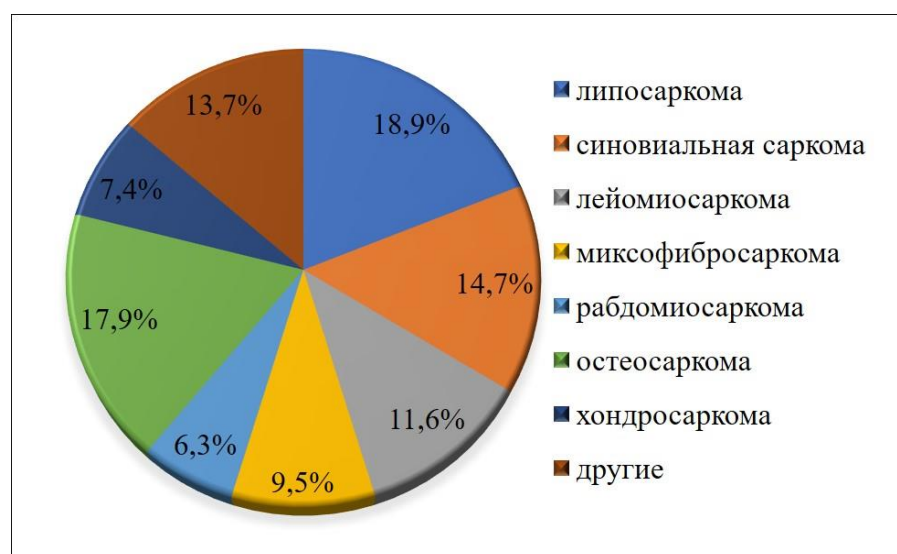


Рисунок 5 – Характеристика скринированных опухолевых образцов по гистотипу

В исследование включены стабильно пролиферирующие клеточные линии СМТ и ОС, прошедшие не менее 10 пассажей, полученные из образцов опухолей пациентов, у которых на момент хирургического вмешательства был подтвержден метастатический характер заболевания.

Отбор пациентов в исследования проводили с использованием общепринятых критериев включения и исключения, одобренных этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Культивирование опухолевых клеток

Культивирование опухолевых клеток осуществляли по методу R.I. Freshney в собственной модификации [105]. В течение 30 минут после резекции опухоли фрагменты размером не менее 1 см<sup>3</sup> отбирали в пробирки со стерильной питательной средой DMEM/F12 (Биолот, Россия) и немедленно доставляли в лабораторию. Опухолевую ткань помещали в стерильную чашку Петри с несколькими каплями предварительно нагретой до 37 °С питательной среды и измельчали скальпелями. Последующее измельчение продолжали с использованием медиконов и медимашины (Agilent Technologies, США). Клеточную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры 100 мкм (BD Falcon, США), осадок центрифугировали 10 минут при 200 g, ресуспендировали в полной питательной среде (ППС), состоящей из DMEM/F12, 20% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Биолот, Россия), с добавлением L-глутамина (Биолот, Россия), смеси ростовых факторов ITS (Gibco, США), содержащей трансферрин, инсулин и селен и комбинации антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, США) в стандартных концентрациях.

При достижении конfluence монослоя клетки пересевали. В качестве диссоциирующего агента применяли смесь равных объемов 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора версена (Биолот, Россия). Подсчет жизнеспособных опухолевых клеток, окрашенных 0,4% трипановым синим, производили в автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США). Культивировали в пластиковых флаконах (Sarstedt, Германия) при температуре 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности в CO<sub>2</sub>-инкубаторе «Heracel» (Termo Electron LTD GmbH, Германия). В случае успешного получения первичной культуры осуществляли смену среды не реже чем раз в неделю до достижения клетками монослоя, после чего пересевали с последующим центрифугированием и подсчетом жизнеспособных клеток.

### 2.2.2. Изучение морфологии культивируемых клеток сарком

Изучали морфологию культивируемых клеток, получая изображения методом фазово-контрастной микроскопии в автоматическом клеточном анализаторе Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) и методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов, окрашивающих ядра (DAPI (Sigma-Aldrich, США)), митохондрии (MitoTracker (Invitrogen, США)), лизосомы (LysoTracker (Invitrogen, США)) и актиновый цитоскелет (Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, США)) в конфокальном лазерном микроскопе Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония). В этом случае использовали стандартный протокол последовательного окрашивания. Клетки выращивали в чашках Петри  $\mu$ -Dish со стеклянным дном (Ibidi, США). После достижения оптимальной конfluence монослоя

культуральную среду меняли на смесь рабочих разведений MitoTracker+LysoTracker в соотношении 1:1 и помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор на 1,5–2 часа для прижизненного окрашивания митохондрий и лизосом. Затем трижды отмывали клетки фосфатно-солевым буфером, фиксировали 10 минут в 3% растворе формалина, пермобилизировали раствором тритона (Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США)) и окрашивали последовательно цитоскелет (Alexa Fluor 488 Phalloidin) и ядра (DAPI).

### **2.2.3. Криоконсервация и размораживание опухолевых клеток**

Криоконсервировали опухолевые клетки СМТ и ОС в среде, содержащей 90% ФБС и 10% диметилсульфоксида (ДМСО) с предварительным подсчетом в концентрации не менее 2 млн и с жизнеспособностью не ниже 90%. Вначале пробирку помещали в замораживатель, позволяющий осуществлять постепенное снижение температуры на 1 °С в минуту, а затем, охлажденные до -80 °С образцы помещали в биобанк при -160 °С, где хранили до использования.

Размораживание опухолевых клеток осуществляли следующим образом: немедленно после извлечения из банка опухолевых образцов, криопробирку с клетками ставили на водяную баню с температурой +42 °С на 3 минуты. После этого автоматической или пастеровской пипеткой содержимое переносили в стерильную 15-мл пробирку, добавляли 10 мл среды ДМЕМ/F12 без добавок и центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин. После центрифугирования подсчитывали жизнеспособные клетки, как описано ранее. При соблюдении вышеуказанных условий жизнеспособность клеток составляла не менее 90%.

### **2.2.4. HLA-типирование опухолевых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком**

С целью подтверждения идентичности и для контроля кроссконтаминации полученных опухолевых культур проводили HLA-типирование опухолевых культур и образцов биологического материала пациентов – МНПК, с определением генов HLA I класса методом ПЦР-SSP [106]. Принцип метода основан на использовании сиквенс-специфических детектирующих пар праймеров (sequence specific primers), комплементарных аллелям специфических локусов HLA. Если нуклеотидные последовательности праймеров и специфические участки ДНК пациента совпадают, запускается амплификация, продукты которой визуализируют с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для эксперимента из криобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России извлекали криоконсервированные клетки СМТ и ОС и размораживали, как описано ранее. Для последовательного выделения ДНК из клеток использовали стандартный набор

Протранс ДНК Vox 500 (Protrans medizinische diagnostische Produkte, Германия). Проверку концентрации ДНК проводили на флюориметре Quantus (Promega, США) с использованием набора ONE dsDNA QuantiFluor Dye System (Promega, США) и дважды дистиллированной воды. Элюированную ДНК помещали в Циклерплатную систему Протранс HLA-A, -B, -Cw (Protrans medizinische diagnostische Produkte, Германия) с праймерами и добавлением Taq-полимеразы для амплификации в термоциклере. Впоследствии ампликоны переносили в лунки агарозного геля для электрофореза, который осуществляли с помощью электрофоретической камеры Протранс DyePUR (Protrans medizinische diagnostische Produkte, Германия) в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Если специфические участки ДНК опухолевого образца совпадали со специфическими участками праймеров, в лунке появлялась полоска. Результаты исследования детектировались с применением УФ-трансиллюминатора по таблице интерпретации.

### 2.2.5. Трехмерное моделирование

Кинетику опухолевого роста культивируемых клеток в трехмерных сфероидных структурах изучали методом «висячей капли» (hanging drop method) [107; 108]. Для этого  $3 \times 10^4$  клеток высевали в ППС методом висячей капли и инкубировали в увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С в течение недели. Наличие сфероидов подтверждали микроскопически. Исследование проводили в триплетах. Сфероиды помещали в полимеризованный матригель в 96-луночных планшетах и оценивали время, необходимое для распространения клеток из сфероида, с использованием прибора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия).

Принцип действия прибора основан на автоматическом видеонаблюдении за клетками в инкубаторе с регулируемым составом газовой смеси, с последующим анализом изображений, что может быть использовано для оценки пролиферативной и миграционной активности адгезионных клеточных культур. В процессе культивирования через запрограммированные промежутки времени прибор в автоматическом режиме производит фотофиксацию выбранной исследователем области.

В дальнейшем изображения анализируются программой Analyser на основании составленной библиотеки образов. Мы изучали изменение диаметра и площади, занимаемой клетками сфероида, фиксируемое в системе Cell-IQ. Инвазивную область определяли путем вычисления разности между конечной областью (t=48 часов) и начальной областью (t=0 часов) с помощью программы анализа изображений, а данные нормировали к контрольным ячейкам. Наблюдение вели в течение 48 часов.



### **2.2.6. Клонирование опухолевых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком**

Для изучения функциональных характеристик гомогенных сублиний в гетерогенной опухолевой популяции использовали клонирование методом предельных разведений как описано Е.А. Greenfield (2019) [109]. Клетки 56 опухолевых культур СМТ и ОС в фазе логарифмического роста диссоциировали с применением смеси 0,25% раствора Трипсина и Версена в равных пропорциях, тщательно суспендировали для выделения единичных клеток, производили подсчет и разведение, и высевали в ячейки 96-луночного планшета (Thermo Fischer Scientific Nunc, Дания) таким образом, чтобы в каждой лунке было по 1 клетке в 150 мкл среды. На следующий день отмечали ячейки планшета с адгезированными клетками. Культивировали в течение 7–10 суток в ППС на основе ДМЕМ/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 20% ФБС (Биолот, Россия). Производили ежедневную микроскопию ячеек с целью визуализации и оценки роста колоний. Подсчитывали одиночные колонии опухолевых клеток в ячейках по отношению к числу отмеченных адгезированных клеток. Результат выражали в % как эффективность клонирования.

Также высевали опухолевые культуры в ячейки 24-луночного планшета, последовательно титруя с уменьшением концентрации опухолевых клеток от 100 до 3–4 клеток на лунку. Для внесения в среду дополнительных ростовых факторов в ячейки планшета вставляли стерильные инсерты, в которые высевали клетки клонируемой опухолевой культуры в концентрации 100 тысяч клеток в мл. Культивировали в стандартных условиях 10–14 суток, ежедневно проводили микроскопическую визуализацию колоний и осуществляли частичную смену среды каждые 4–5 дней. Далее, из ячеек, в которых клонирование было успешным аккуратно удаляли инсерты и среду, клоны изолировали при помощи стерильных силиконовых цилиндров (BD Science, США), в которые заливали смесь Трипсина и Версена для диссоциации, суспендировали и извлекали. Для дальнейших исследований случайным образом отбирали по 4–6 клонов каждой линии. Клетки осаждали центрифугированием 10 минут при 200 g и культивировали в стандартных условиях не менее 5 пассажей (1–2 мес.). Криоконсервировали на 5-ом пассаже по 1,5–3 млн клеток как описано ранее. Полученные таким образом сублинии использовали в экспериментах.

### **2.2.7. Определение параметров пролиферативной активности опухолевых клеток**

Время удвоения опухолевых клеток определяли по методике описанной Freshney [105]: клетки в посевной концентрации  $2 \cdot 10^4$  кл/мл или  $1 \cdot 10^5$  кл/флакон высаживали во флаконы 25 см<sup>2</sup>, каждые 24 часа по 2 флакона извлекали из СО<sub>2</sub>-инкубатора, диссоциировали в смеси трипсин/версен и производили подсчет жизнеспособных опухолевых клеток, как описано ранее.

Повторяли отбор образцов, диссоциацию и подсчет клеток каждые 24 часа (каждые 48 часов для медленно пролиферирующих культур) с построением кривой зависимости клеточной концентрации от времени культивирования. Эксперимент продолжали в течение 7–14 суток в зависимости от пролиферативной активности опухолевых культур и прекращали при достижении стационарной фазы (фазы плато). Время удвоения клеточной популяции определяли по кривой роста в период экспоненциальной или lag-фазы.

Также пролиферацию опухолевых клеток СМТ и ОС в режиме реального времени изучали с помощью автоматического клеточного анализатора xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США). Прибор позволяет производить количественную оценку пролиферации клеток СМТ, ОС и их клонов с помощью оценки сопротивления на электродах, размещенных в дне лунок планшета. Перед началом эксперимента измеряли фоновое сопротивление 50 мкл ППС в лунках пролиферационного планшета E-Plate 16 (ACEA Bioscience Inc., США) с электродами на дне. Суспензию клеток, диссоциированных в фазе логарифмического роста, высевали в лунки и в режиме реального времени контролировали их прикрепление и пролиферацию в течение 72 часов. Оценивали пролиферацию по изменению импеданса на электродах, который увеличивался с ростом количества пролиферирующих клеток на поверхности планшета. После прикрепления клеток к электроду измеряемый сигнал линейно коррелирует с числом клеток на протяжении всего эксперимента с высокой точностью.

Изменение сопротивления рассчитывали с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (Roche, Швейцария). Колебания импеданса на микроэлектродах отражает величина Cell Index (клеточный индекс), по формуле  $\text{Cell Index} = (R_b/R_n)/t$ , где  $R_b$  – фоновое значение импеданса в лунке,  $R_n$  – значение импеданса в момент времени  $t$ ). Для математического анализа полученных кривых определяли угловой коэффициент линейной зависимости Slope. Изучали изменение пролиферативной активности опухолевых культур на разных этапах в процессе непрерывного культивирования (на ранних <10 и поздних >15 пассажей) в группах, отличающихся по клоногенному потенциалу и по гистологической принадлежности опухоли, в клонированных опухолях и исходных культурах. Для представления результатов использовали экспоненциальную запись.

### **2.2.8. Изучение миграции и инвазии опухолевых клеток**

Инвазивные и миграционные свойства клеточных культур оценивали в автоматическом клеточном анализаторе xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США) с использованием двухкамерных планшетов CIM-Plate 16 (ACEA Bioscience Inc., США). Принцип метода основывается на регистрации клеток, мигрировавших через пористую мембрану. Клетки в посевной дозе  $10^5$  на лунку высаживали в бессывороточной среде DMEM в верхнюю камеру,

куда предварительно вносили по 30 мкл питательной среды (для изучения миграции) или матригеля (для оценки инвазии). Среду DMEM с добавлением 20% ФБС в качестве хемоаттрактанта вносили в нижнюю камеру [110]. Наблюдение продолжали в течение 96 часов. Оценивали клеточный индекс (CI) и параметр Slope, представляющий собой тангенс угла наклона кривой изменения CI за время наблюдения.

## **2.2.9. Идентификация маркеров стволовых клеток опухоли**

### **2.2.9.1. Определение CD133**

Для исследования клетки СМТ и ОС культивировали по вышеописанной методике до образования монослоя, снимали с флаконов, подсчитывали число жизнеспособных клеток в автоматическом счетчике Countess (Invitrogen, USA) и дважды центрифугировали (1000 об/мин 10 минут) с добавлением 2 мл StainBuffer (BDBioscience, США) с последующим удалением надосадочной жидкости. Для блокирования Fc-рецепторов вносили Stain Buffer из расчета 100 мкл буфера на миллион клеток и инкубировали образцы 15 минут при температуре +2+8 °С с добавлением 2,5 мкл реагента FcBlock для снижения неспецифического связывания (BDBioscience, США). После центрифугирования снова удаляли супернатант и разбавляли клетки буфером CellWASH (BDBioscience, США) до концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл.

Для определения маркеров стволовых клеток использовали следующие моноклональные антитела: CD133, меченые PE (Miltenyi Biotec GmbH, Германия), CD44, меченые Alexa Fluor®700 (BD Bioscience, США). В пробирки с антителами вносили по 100 мкл клеточной суспензии, перемешивали в вихревом встряхивателе 1–3 секунды при 3000 об/мин. Образцы инкубировали в темноте в течение 30 минут. Отмывали дважды в CellWASH центрифугированием (1000 об/мин 10 минут), затем аспирировали промывочный буфер. Во все пробирки добавляли по 500 мкл буфера и перемешивали при помощи шейкера (IKA, Германия) 3 секунды при 3000 об/мин.

Имунофенотипирование клеток СМТ и ОС проводили на проточном цитометре BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США). Экспрессия иммунофенотипических маркеров оценивалась по сравнению с изотипическим контролем.

### **2.2.9.2. Определение активности альдегиддегидрогеназы**

Активность альдегиддегидрогеназы I типа (ALDH1) определяли методом проточной цитометрии с использованием набора ALDEFLUOR™ Kit (STEMCELL Technologies Inc., Канада), как описано L. Mele с соавт. (2018) [111]. Принцип метода основан на использовании BODIPY-аминоацетальдегида – незаряженного субстрата альдегиддегидрогеназы, проникающего в клетку путем пассивной диффузии. При этом его обратный транспорт

ингибируется специфическим буфером. Под воздействием исследуемого фермента незаряженный субстрат превращается в заряженный BODIPY-аминоацетат, флюоресценция которого детектируется проточным цитометром на длине волны 520–540 нм. Клетки в количестве  $10^5$ – $10^6$  ресуспендировали в 1 мл буфера для исследования входящего в состав набора, данную пробирку обозначали как тестовую.

В пустую контрольную пробирку вносили 5 мкл специфического ингибитора ALDH диэтиламинобензальдегида. В тестовую пробирку добавляли 5 мкл BODIPY-аминоацетальдегида, перемешивали и быстро переносили 500 мкл клеточной суспензии в контрольную пробирку. Клетки инкубировали в течение 30 минут при 37 °С, после чего центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин. Затем, после удаления супернатантов клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера для исследования и анализировали с помощью проточного цитофлюориметра BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США). Гейтирование осуществляли по негативной популяции в контрольной пробирке. В связи с тем, что только клетки с неповрежденной клеточной мембраной могут удерживать субстрат альдегиддегидрогеназы, детектировали только живые клетки.

#### **2.2.10. Молекулярно-генетический анализ экспрессии раково-тестикулярных генов**

Для определения уровня экспрессии выбранных РТГ (*GAGE1*, *HAGE*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SLLP1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*), а также референсного гена *Abl* применяли системы специфических праймеров и зондов, разработанные с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank, и программы для сравнения последовательностей нуклеотидов и аминокислот BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), размещенной по адресу: [//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). [112] (табл. 2).

Таблица 2 – Последовательности праймеров и зондов, используемых для определения экспрессии изучаемых генов

Ген	Праймеры	Зонд
<i>GAGE1</i>	5'-AGCTGCTCAGGAGGGAGAGGAT-3'; 5'-GGTGACCCTGTTCCCTGGCTA-3'	5'-(R6G)- CATCTGCAGGTCAAGGGCCGAAGCCTGA A-(BHQ1)-3
<i>HAGE</i>	5'-GCCACAAGTGCCATGTCAAA-3'; 5'-CCTTCAAGTCATCCCACGTT-3	5'-(R6G)- AGCAGATAGTTGGAGGAAAGAAAATTTT AA-(BHQ1)-3
<i>MAGEA1</i>	5'-GAAGGAACCTGACCCAGGCT-3'; 5'-AATCCTGTCCCTCTGGGTTGG-3'	5'-(R6G)- TGTGAGGAGGCAAGGTTTTTCAGGGGAC- (BHQ1)-3'
<i>NY-ESO1</i>	5'-TCTGAAGGAGTTCCTGCTGTGT-3'; 5'-AGACAGGAGCTGATGGAGAG-3	5'-(R6G)- AACATACTGACTATCCGACTGACTGCTG CA-(BHQ1)-3'
<i>PASDI</i>	5'-GTGGGAAATGTTTGCATTCT-3'; 5'-AGCTTCATCACTGACTGCCT-3'	5'-(R6G)- TCAGCTCCTGCAGCAACTTTACACTTC- (BHQ1)-3'
<i>SCPI</i>	5'-AAAAGGAACAGAACAAGAAC-3'; 5'-TGTGGTAATGGCAGTTAACT-3'	5'-(R6G)- CCAAGCCAGAGAGAAAGAAGTACATGA TTT-(BHQ1)-3'
<i>SEMG1</i>	5'-TCCTCATCTTGGAGAAGCAA-3'; 5'-TGGGAAAATTCACTTGGTAA-3'	5'-(R6G)- ATGGGACAAAAAGGTGGATCAAAAGGC C-(BHQ1)-3
<i>SLLP1</i>	5'-ACTTCGGGCTGGACGGATAC-3'; 5'-GCGTTGAAACCGCTTGTGAA-3'	5'-(R6G)- ATACAGCCTGGCTGACTGGGTCTGCCTT GCTTA-(BHQ1)-3'
<i>SPANXAI</i>	5'-GAGGAGCGTCCCCTGTGATT-3'; 5'-AGCAGGTTGCGGGTCTGAGT-3'	5'-(R6G)- AGGCCAACGAGATGATGCCGGAGACCC CAA-(BHQ1)-3'
<i>SSX1</i>	5'-GTATATGAAGAGAACTATAAGG- 3';5'-TATTACACATGAAAGGTGGG-3'	5'-(R6G)- ATGACTAAACTAGGTTTTCAAAGTCACC- (BHQ1)-3'
<i>PRAME</i>	5'-TCTTCCTACATTTCCCCGGA-3'; 5'-GCACTGCAGACTGAGGAACTGA-3'	5'-(FAM)- AAGGAAGAGCAGTATATCGCCCAGTTCA CC-(Tamra)-3'

Во всех случаях праймеры были подобраны на экзоны, разделенные протяженными (порядка тысяч пар оснований) участками некодирующих последовательностей. При этом в реакции ПЦР программа была настроена на синтез коротких нуклеотидных последовательностей. Таким образом, были получены высокоспецифичные целевые ампликоны, источником которых служила матрица комплиментарной ДНК. Праймеры синтезированы компанией (Евроген, Россия). Синтез флуоресцентных зондов осуществлялся в компании (ДНК-синтез, Россия). Для флуоресцентных зондов использовался флуорофор Нех с гасителем BHQ1.

С целью верификации экспрессии анализируемых генов в качестве референсного использовали ген домашнего хозяйства *ABL*. На предварительном этапе производили экспериментальный подбор референсного гена, в результате чего были получены результаты, подтверждающие его пригодность. Другие, предложенные в качестве референсных, гены были отклонены по следующим причинам: ген *GAPDH* оказался нестабильным, а ген *B2M* обладал слишком высоким уровнем экспрессии, на фоне которого активность РТГ терялась. В результате малейшие колебания в экспрессии *B2M* сильно отражались на расчетной активности РТГ.

Для предварительной подготовки к выделению общей РНК клетки СМТ и ОС и клоны культивировали в стандартных условиях до получения монослоя. В фазе логарифмического роста клетки снимали с культуральных флаконов с использованием смеси растворов Версена и 0,25% Трипсина, взятых в равных пропорциях, центрифугировали в течение 10 мин при 200 g, осадок отмывали в 0,9% растворе NaCl и использовали для выделения РНК.

РНК выделяли по методу, разработанному P. Chomczynski и N. Sacchi (1987) [113]. Выделенную мРНК использовали для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции. Для каждого образца определяли уровень экспрессии гена *Abl* и всех 11 изучаемых РТГ. Анализ проводили на ПЦР-амплификаторе Light Cyler 96 (Roshe, Швейцария) в триплетах. В качестве положительного контроля применяли векторы, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Ввиду существенной гетерогенности данных кластерный анализ экспрессии РТГ проводили на трансформированных данных: к значениям экспрессии добавляли константу (единицу) поскольку значение логарифма не определено в нуле и применяли логарифм по основанию 2.

## **2.2.11. Определение химиочувствительности культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком**

### **2.2.11.1. МТТ-тест**

Для оценки химиочувствительности клеток СМТ и ОС использовали различные химиотерапевтические агенты и их комбинации, применяемые в клинике. Для СМТ было изучено воздействие двух комбинаций химиопрепаратов: Доксорубицин (Лэнс-фарм, Россия) + Ифосфамид (Холоксан, Бакстер онкология ГмбХ, Германия) и Гемцитабин (Гемцитабин-эбве, Эбеве фарма, Австрия) + Доцетаксел (Доцетаксел Сандоз Эбеве фарма, Австрия). Для ОС была исследована чувствительность к 4 препаратам: Цисплатин (Цисплатин-Тева, Израиль), Этопозид, (Лэнс-фарм, Россия), Доксорубицин (Лэнс-фарм, Россия) и Ифосфамид (Холоксан, Бакстер онкология ГмбХ, Германия). Для расчета действующей концентрации препарата использовали информацию о его пиковой концентрации в плазме крови согласно рекомендациям Salmon S.E. (1980) [114]. В приведенном руководстве рекомендовано принимать, в качестве эквивалентной терапевтической, концентрацию равную 10% от расчетной пиковой концентрации препарата в плазме крови. Для постановки МТТ-теста были применены 2 концентрации химиопрепаратов: терапевтическая (соответствующая 10% от пиковой концентрации в плазме) и десятикратно превышающая терапевтическую (соответствующая пику концентрации в плазме).

Для эксперимента из криобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России извлекали клетки СМТ и ОС, замороженные на разных этапах культивирования (5, 20, 40 пассажи) и клоны этих культур на 5 пассаже, размораживали, согласно вышеописанной методике, и культивировали в стандартных условиях до получения 90% монослоя. Клетки в фазе логарифмического роста диссоциировали смесью равных пропорций растворов 0,25% Трипсина и Версена, центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин и высевали в ячейки 96-луночных планшетов (Falcon, USA) в посевной дозе  $2 \times 10^4$  клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 24 часов в стандартных условиях, затем извлекали по 100 мкл среды и добавляли по 100 мкл исследуемых химиопрепаратов, разведенных в ППС в двух исследуемых концентрациях, соответствующих 10% и 100% от пика концентрации этих препаратов в плазме крови (табл. 3).

Таблица 3 – Фармакокинетические параметры исследуемых химиопрепаратов

Химиопрепарат	Период полувыведения, час	Пик концентрации препарата в плазме крови, мкг/мл
Доксорубицин	20	0,5
Ифосфамид	15	222,0
Доцетаксел	11	3,7
Гемцитабин	1	10,0
Цисплатин	2	2,5
Этопозид	1,5	30,0

В контрольных лунках клетки выращивали без добавления цитостатиков, добавляя в них на этом этапе по 100 мкл ППС. Одновременно на одном планшете оценивали химиочувствительность клеток опухолевых культур каждой из СМТ на разных этапах культивирования и ее клонов. Для клеток и клонов ОС использовали по два 96-луночных планшета: один – для определения чувствительности к Ифосфамиду и Доксорубицину, второй – для Цисплатина и Этопозиды в соответствии с различными периодами полувыведения для этих пар препаратов. Продолжительность взаимодействия клеток с химиотерапевтическими агентами определялась в соответствии с установленным периодом полувыведения, по истечению которого в ячейки вносили по 10 мкл приготовленного раствора МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-Ил]-2,5 дифенилтетразолийбромид) (Sigma, St. Louis, США) в концентрации 10 мг/мл и инкубировали в течение 4 часов. В ячейках, маркированных как отрицательный контроль, клетки фиксировали 3,7% формальдегидом. Принцип анализа МТТ заключается в том, что для большинства жизнеспособных клеток, включая опухолевые, митохондриальная активность постоянна и, следовательно, увеличение или уменьшение числа жизнеспособных клеток линейно с ней связано. Соли тетразолия под действием митохондриальных дегидрогеназ жизнеспособных, метаболически активных клеток превращаются в нерастворимый в воде формазан, имеющий фиолетовую окраску. Таким образом, любое увеличение или уменьшение числа жизнеспособных клеток под воздействием исследуемых препаратов может быть обнаружено путем измерения концентрации формазана, отраженной в оптической плотности. Для сравнения используют оптическую плотность лунок с клетками, не подвергнутыми воздействию. После образования на поверхности лунок кристаллов формазана добавляли по 100 мкл ДМСО для их растворения на 12 часов. Оптическую плотность раствора измеряли с помощью спектрофотометра при длине волны 550 нм. Эксперимент проводили в дуплетах. Результаты выражали в процентах по отношению к положительному контролю, жизнеспособность клеток в котором принимали за 100% с использованием стандартной формулы, как описано Cree I. A. (2011) [115].



Выживаемость клеток в присутствии исследуемого вещества равна:  $(D \text{ опытных лунок} - D \text{ отрицательного контроля}) / (D \text{ положительного контроля} - D \text{ отрицательного контроля}) \times 100\%$ , где  $D$  – оптическая плотность.

Чувствительными к воздействию лекарственных средств считали культуры, где количество живых клеток было менее 50% на момент анализа [116].

#### **2.2.11.2. Детекция химиорезистентности культивируемых опухолевых клеток с помощью клеточного анализатора xCelligence**

Для наблюдения процесса пролиферации клеток СМТ и ОС в режиме реального времени применяли автоматический клеточный анализатор xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США). Оценивали пролиферацию по изменению импеданса на электродах, который увеличивался с ростом пролиферирующих клеток на поверхности планшета. Изучали химиочувствительность клонов сарком в сравнении с клетками исходной опухоли по отношению к тем же химиопрепаратам, что были использованы в МТТ-тесте. Перед началом эксперимента измеряли фоновое сопротивление 50 мкл ППС в лунках пролиферационного планшета E-Plate 16 (ACEA Bioscience Inc., США). Суспензию клеток, диссоциированных в фазе логарифмического роста, высевали в лунки и, используя RTCA-систему, контролировали прикрепление и пролиферацию. По достижении логарифмической фазы (обычно через 24 часа культивирования) среду аспирировали и добавляли растворы химиопрепаратов в ППС в двух исследуемых концентрациях, соответствующих 10% и 100% от пика концентрации этих препаратов в плазме крови. Пролиферацию контролировали в течение 80 часов. Изменения в сопротивлении, выраженные как клеточный индекс (CI), рассчитывали автоматически. Для представления результатов была использована экспоненциальная запись.

#### **2.2.12. Приготовление аутологичной дендритноклеточной вакцины «CaTeVac» для иммунотерапии**

Дендритные клетки (ДК) получали путем дифференцировки *in vitro* из мононуклеаров периферической крови по ранее разработанной методике [117]. МНПК выделяли градиентным центрифугированием, для чего смесь равных объемов крови и среды RPMI-1640 (Биолот, РФ) аккуратно наслаивали в 15-мл пробирках на 2,5 мл фикола (Биолот, РФ) и центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 30 минут в стандартных условиях. Образовавшееся на границе раздела фаз кольцо мононуклеаров собирали пастеровской пипеткой и два раза отмывали в 10 мл RPMI-1640 при 1000 об/мин 10 минут. Проводили подсчет и оценку жизнеспособности мононуклеаров, после чего клетки инкубировали в течение 2 часов в культуральных флаконах в среде RPMI-1640 при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности для адгезии моноцитов. По прошествии

2 часов, неприкрепившуюся к пластику фракцию моноклеаров, содержащую главным образом лимфоциты, удаляли, а к адгезированным моноцитам добавляли бессывороточную среду CellGro DC (CellGenix, Германия). Суммарное время культивирования составило 10 дней. На 1, 3 и 5-й дни флаконы извлекали и в среду добавляли ростовые и дифференцировочные факторы (GM-CSF (препарат Неостим, Фармсинтез, РФ) и ИЛ-4 (CellGenix, Германия). На 7-е сутки культивирования флаконы извлекали, незрелые ДК диссоциировали смесью Трипсина и Версена в равных пропорциях, снимали с флаконов с помощью скребка (Corning, США), центрифугировали и ресуспендировали в свежей бессывороточной среде CellGro DC (CellGenix, Германия), куда вносили РТА-содержащий опухолевый лизат собственного производства, GM-SCF, ИЛ-4 и TNF- $\alpha$  (BD Bioscience, США) и продолжали культивирование в течение следующих 48 часов. Полученные таким образом зрелые ДК, после подсчета и оценки жизнеспособности зрелых клеток криоконсервировали по описанной выше методике.

Перед введением вакцины криопробирку с клетками размораживали на водяной бане, как описано ранее, производили подсчет и оценку жизнеспособности. Для каждого пациента готовили 4 шприца для внутрикожного паравертебрального введения. В 3 точки вводили суспензию ДК (5–15 млн клеток) в сочетании с иммунологическим адъювантом (Неостим, Сямэнь Амойтоп Биотех Ко.Лтд, Китай). Для контроля иммуногенности вакцины в четвертую точку вводили опухолевый лизат.

Кратность процедуры составляла: 2 недели (1–2 вакцинации), 3 недели (3–4 вакцинации) и каждые 4 недели (5–12 вакцинаций). В соответствии с ранее разработанным нами протоколом с иммуномодулирующей целью для элиминации регуляторных Т-лимфоцитов за 3 дня до вакцины пациенты получали 300 мг Циклофосфамида внутривенно [118]. Схема проведения иммунотерапии представлена на рисунке 6.

Среднее количество введенных вакцин составило 13 [95% ДИ 7–19]. При выявлении прогрессирования заболевания иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «СаТеVac» прекращали.

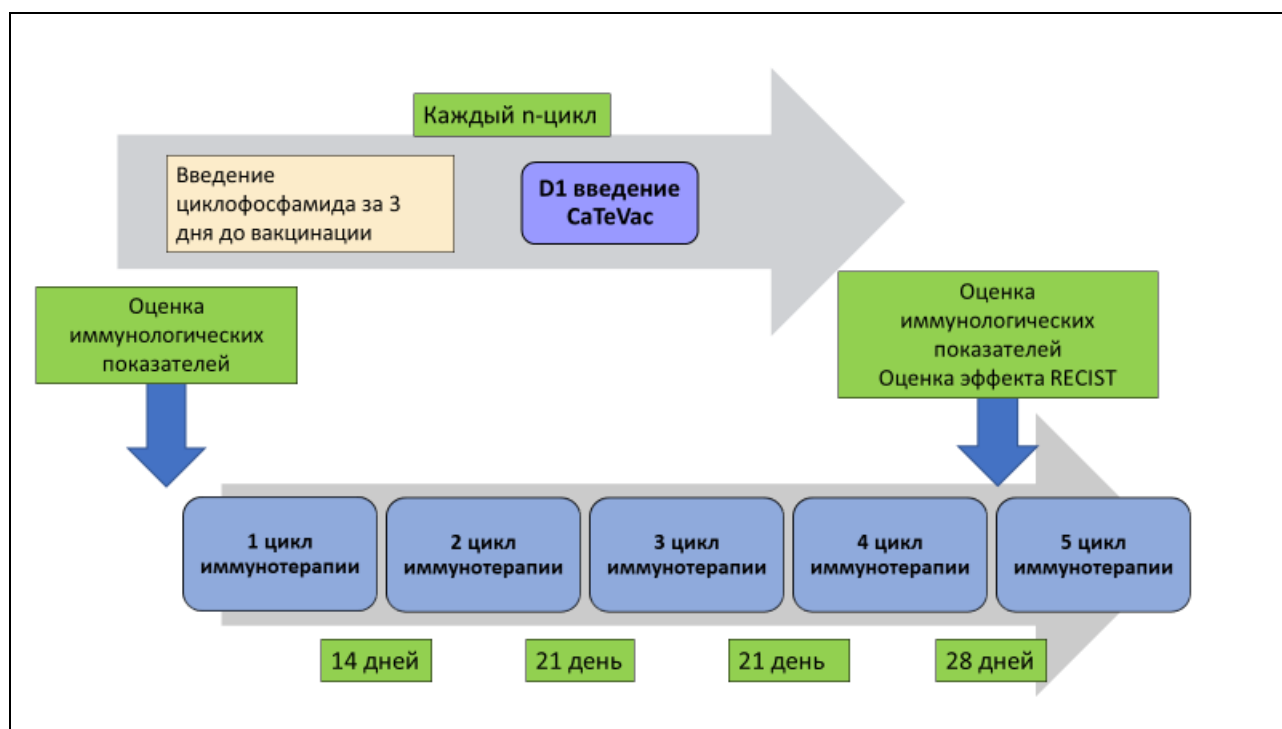


Рисунок 6 – Схема проведения иммунотерапии

### 2.2.13. Оценка иммунологических показателей периферической крови пациентов

Двадцать четыре пациента из группы получали иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в качестве одного из этапов системного противоопухолевого лечения. Основным условием для проведения данного вида лечения, помимо соответствия критериям включения, было отсутствие альтернативных вариантов терапии с доказанной клинической эффективностью. Всем пациентам проводили иммунологическое обследование с количественной оценкой основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в крови на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США) до начала и во время проведения иммунотерапии.

Для оценки иммунологических параметров образец периферической крови пациента отбирали в вакутейнеры с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для детекции маркеров иммунокомпетентных клеток использовали моноклональные антитела (набор антител для многоцветной панели (BD FACSCanto™ HIV Reagents Kits, 6-color TBNK Reagent), мышинные античеловеческие моноклональные антитела: HLA-DR Clone L243, меченые V450, CD127 Clone HIL-7R-M21, меченые Pe-Cy7, CD25 Clone M-A251, меченые FITC, CD4 Clone SK3, кат332772, меченые PerCP-Cy™5.5) (BD Bioscience, США), которые смешивали с исследуемым образцом и инкубировали 30 минут в темноте, после чего осуществляли процедуру

лизирования эритроцитов в автоматическом режиме в приборе для подготовки проб BD FACS Lyse/Wash Assistant (BD Bioscience, США) с помощью растворов FACS Lysing Solution (BD Bioscience, США) и CellWASH (BD Bioscience, США).

Оценивали относительное и абсолютное значение числа девяти основных популяций иммунокомпетентных клеток, представленных в таблице 4, в образцах крови пациентов, получавших лечение аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» по поводу метастатической СМТ или ОС (табл. 4).

Таблица 4 – Изучаемые параметры иммунной системы больных СМТ/ОС

№ п/п	Субпопуляция	Фенотип
1	В-лимфоциты	CD3- CD19+
2	Т-лимфоциты	CD3+CD19-
3	Цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+
4	Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+HLA-DR+
5	Т-лимфоциты хелперы	CD3+CD4+
6	Активированные Т-лимфоциты хелперы	CD3+CD4+HLA-DR+
7	НКТ-клетки	CD3+CD16+CD56+
8	НК-клетки (естественные киллеры)	CD3-CD16+CD56+
9	Регуляторные Т-лимфоциты	CD4+CD25brightCD127+

Относительное значение для числа В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), активированных ЦТЛ, Т-лимфоцитов хелперов, активированных Т-лимфоцитов хелперов, НКТ- и НК-клеток вычисляли по отношению к числу лимфоцитов; для регуляторных Т-лимфоцитов – по отношению к числу Т-лимфоцитов хелперов. Абсолютное значение для всех популяций представляли в стандартном виде: количество клеток \*10<sup>9</sup>/л. Группу разделили по клоногенности опухолевых клеточных линий. Сравнивали показатели популяционного состава иммунокомпетентных клеток в образцах периферической крови пациентов по результатам иммунологического обследования, наиболее приближенного по времени к дате забора опухолевого образца.

#### 2.2.14. Статистическая обработка результатов

Хранение, обработку, статистический анализ данных и визуализацию результатов осуществляли с использованием Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, США), Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и R v.3.6.2. Для сравнения независимых групп по качественным показателям анализировали таблицы сопряженности, применяя статистические критерии: хи-квадрата Пирсона ( $\chi^2$ ) и точный критерий Фишера. Для сравнения по

качественным показателям применяли U-критерий Манна–Уитни. С помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и с использованием коэффициента корреляции Спирмена оценивали достоверность отличий и проводили корреляционный анализ полученных количественных данных в независимых парных выборках.

Для проверки нескольких выборок использовали непараметрический дисперсионный анализ и ранговый критерий Краскела–Уоллиса, являющийся многовыборочным обобщением критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Для анализа повторных измерений, связанных с одним пациентом (одной клеточной культурой), использовали критерий Фридмана. Для построения кривых общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования использовали метод Каплана–Мейера. Для сравнения кривых выживаемости использовали логранговый критерий. Выживаемость без прогрессирования определена как время между датой операции и датой рецидива или смерти, если смерть наступила до рецидива; пациенты, которые были живы и не имели рецидивов, цензурированы в последний день наблюдения.

Общая выживаемость (ОВ) определена как время между датой операции и датой смерти по любой причине; пациенты, которые были живы, подвергнуты цензуре в последний день наблюдения. Под временем до прогрессирования (ВДП) понимали время от даты операции до появления первых признаков прогрессирования заболевания. У пациентов, получавших иммунотерапию «CaTeVac» оценен эффект терапии по системе RECIST, ОВ и ВДП от начала иммунотерапии. Применяли иерархический кластерный анализ (метод полной связи с Евклидовой метрикой) для выделения кластеров экспрессии РТГ. Количество кластеров определяли автоматически с помощью библиотеки «NbClust» в R [119]. Во всех случаях значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Получение и культивирование клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком

Стабильные клеточные линии метастатических СМТ и ОС получены в 56 случаях, что составило 58,9% от общего числа поступивших на исследование образцов опухоли (56/95). Созданная коллекция из 56 клеточных линий СМТ и ОС 16 гистологических подтипов, представлена 38 культурами СМТ и 18 ОС – может стать одной из крупнейших в мире. Высокий процент успешного перевода опухолевых клеток метастатических сарком в культуру отражает возрастающую с опухолевой прогрессией пластичность и способность клеток к независимому росту.

Распределение полученных клеточных линий СМТ и ОС по гистологическим подтипам представлено в таблице 5.

Таблица 5 – Гистотипическая принадлежность полученных метастатических клеточных линий СМТ и ОС, распределение по локализации опухоли и продолжительность культивирования

Морфологический код и гистологический подтип опухоли	Локализация метастазов		Пройдено пассажей	
	переведено в культуру		<10	>15
	n	локализация	n	n
1	2	3	4	5
8852/3 Миксоидная липосаркома	2	легкое (1) мягкие ткани (1)	1	1
8854/3 Плеоморфная липосаркома	1	легкое (1)	0	1
8811/3 Миксофибросаркома	7	легкое (5) мягкие ткани (2)	2	5
8890/3 Лейомиосаркома	7	легкое (7)	5	2
8910/3 Эмбриональная рабдомиосаркома	1	легкое (1)	0	1
8920/3 Альвеолярная рабдомиосаркома	1	мягкие ткани (1)	1	0
8901/3 Плеоморфная рабдомиосаркома	1	легкое (1)	1	0
8912/3 Веретенклеточная рабдомиосаркома	1	легкое (1)	1	0
9540/3 Опухоль из оболочек периферических нервов	2	легкое (1) надпочечник (1)	2	0
9040/3 Синовиальная саркома без уточнений	2	легкое (1) мягкие ткани (1)	1	1
9041/3 Монофазная синовиальная саркома веретенклеточная	8	легкое (6) плевры (1) брюшная полость (1)	3	5

1	2	3	4	5
9043/3 Бифазная синовиальная саркома	1	легкое (1)	1	0
9581/3 Альвеолярная саркома мягких тканей	2	легкое (2)	1	1
9044/3 Светлоклеточная саркома мягких тканей	2	легкое (1) мягкие ткани (1)	1	1
9180/3 Остеосаркома	14	легкое (14)	6	8
9220/3 Хондросаркома	4	легкое (3) средостение (1)	3	1
Всего	56	легкое (46) мягкие ткани (6) другая (4)	29	27

Среди установленных причин, препятствующих успешному культивированию, чаще всего отмечали недостаточный объем опухолевого материала (45,2%, n=21) и контаминацию стромальными клеточными элементами (38,7%, n=12), рост которых обычно сочетался со слабой пролиферативной активностью опухолевых клеток, определяемой по низкому уровню выявляемости антигена Ki67.

### **3.1.1. Изучение морфологии культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком (фазово-контрастная микроскопия)**

Несмотря на общее мезенхимальное происхождение, в процессе культивирования опухолевые клетки СМТ и ОС демонстрировали выраженную морфологическую гетерогенность. Преобладали варианты с фибробластоподобной и веретеновидной формой клеток (в 57,1% и 14,3% культур соответственно). Кроме того, наблюдали значительные отличия внутри каждого из гистологических подтипов. Клетки миксофибросарком и синовиальных сарком характеризовались наибольшей морфологической гетерогенностью. В культурах этих опухолей были представлены все возможные морфологические варианты: с веретеновидной, фибробластоподобной, округлой, полигональной формой клеток.

Среди миксофибросарком преобладали культуры, состоящие из округлых и полигональных (рис. 7 А, В, Г), а в группе липосарком (рис. 8 А, Б, Г) и синовиальных сарком – вытянутых клеток (рис. 9 А, В, Г).

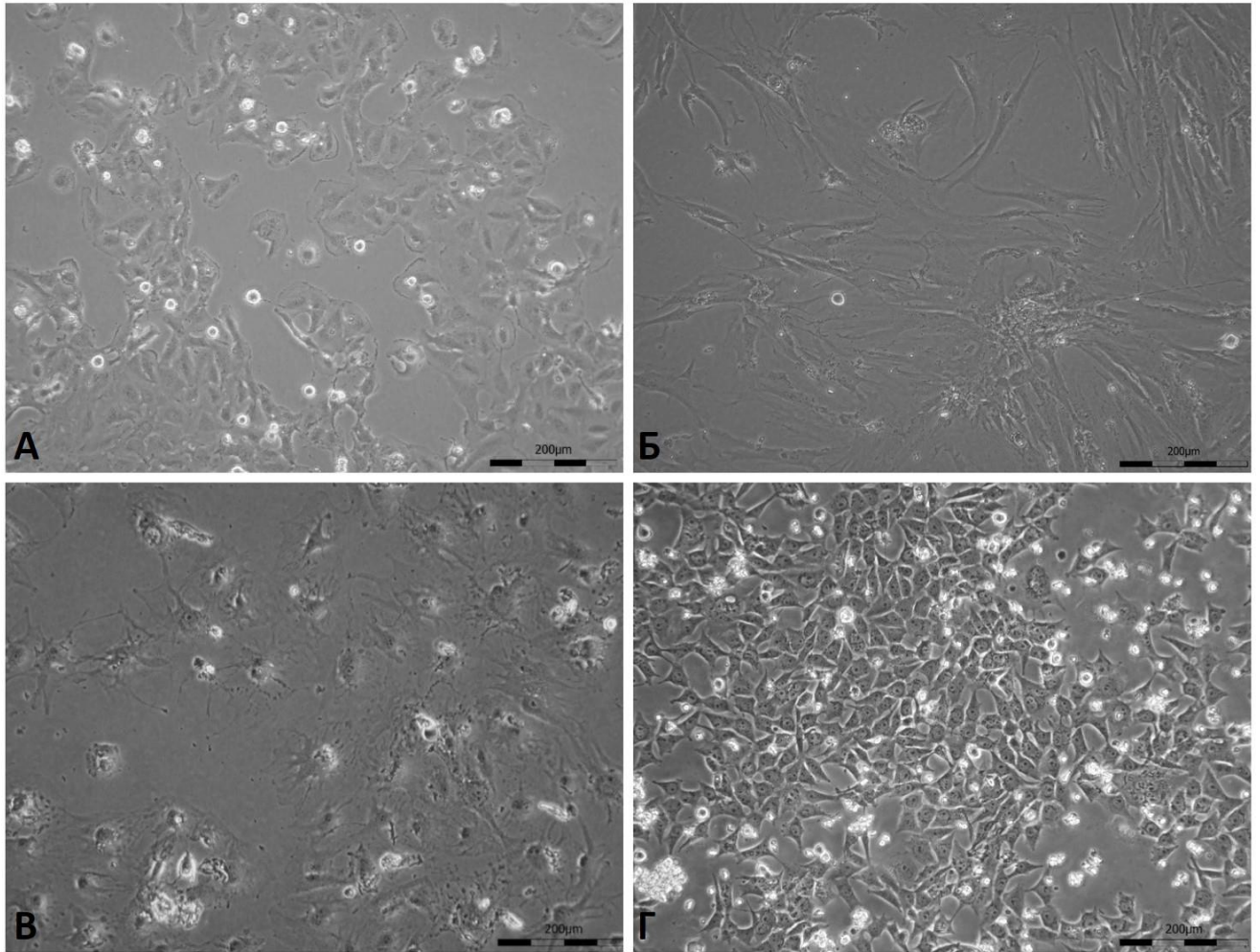


Рисунок 7 – Морфология культивируемых клеток миксофибросарком:  
А – миксофибросаркома #924, 17 пассаж; Б – миксофибросаркома #933, 13 пассаж;  
В – миксофибросаркома #678, 20 пассаж; Г – миксофибросаркома #920 11 пассаж.

Инvertированный микроскоп, ув.  $\times 100$



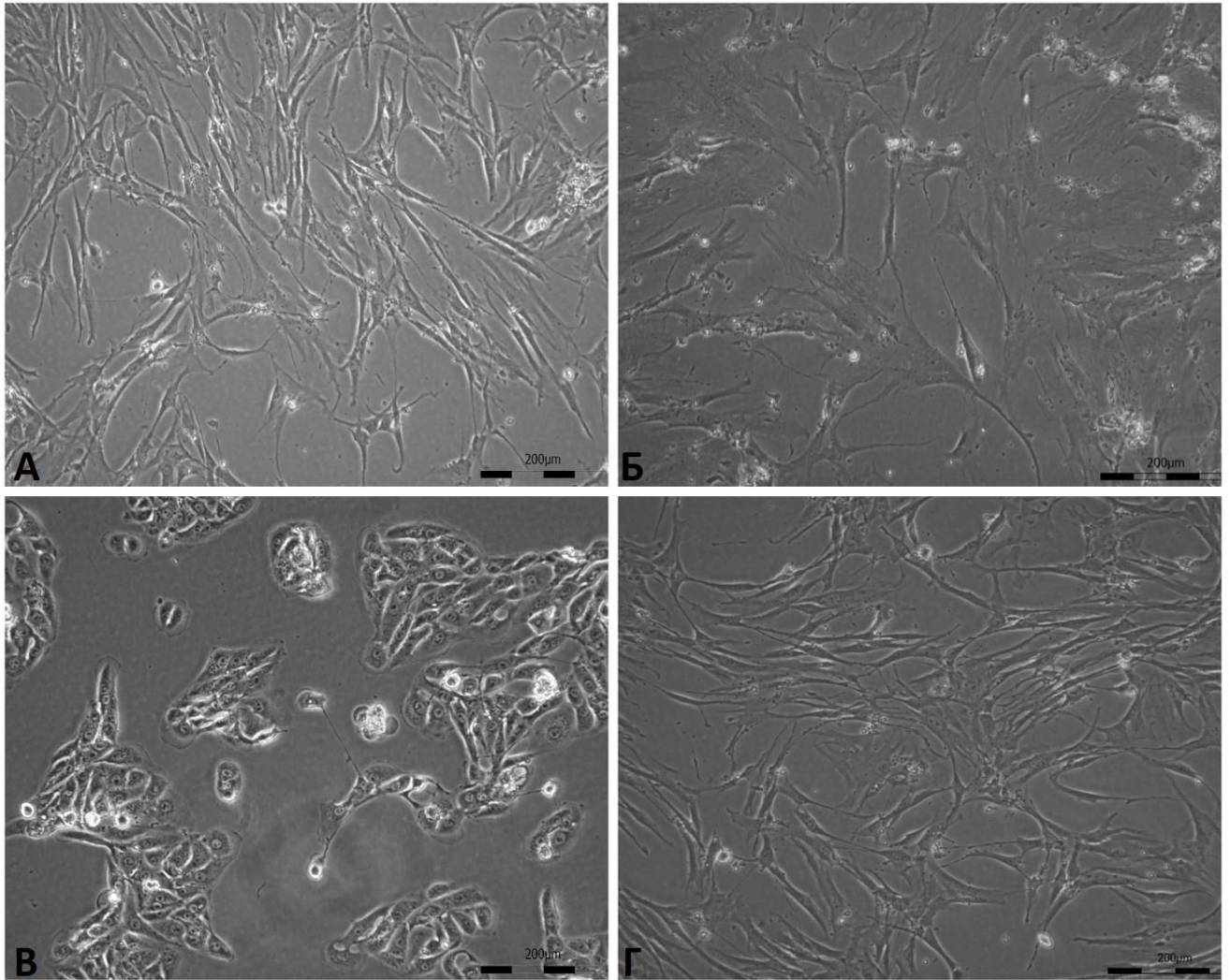


Рисунок 8 – Морфология культивируемых клеток липосарком:

А – миксоидная липосаркома #941, 10 пассаж; Б – миксоидная липосаркома #944, 15 пассаж;  
В – плеоморфная липосаркома #702, 11 пассаж; Г – миксоидная липосаркома #961, 9 пассаж.

Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

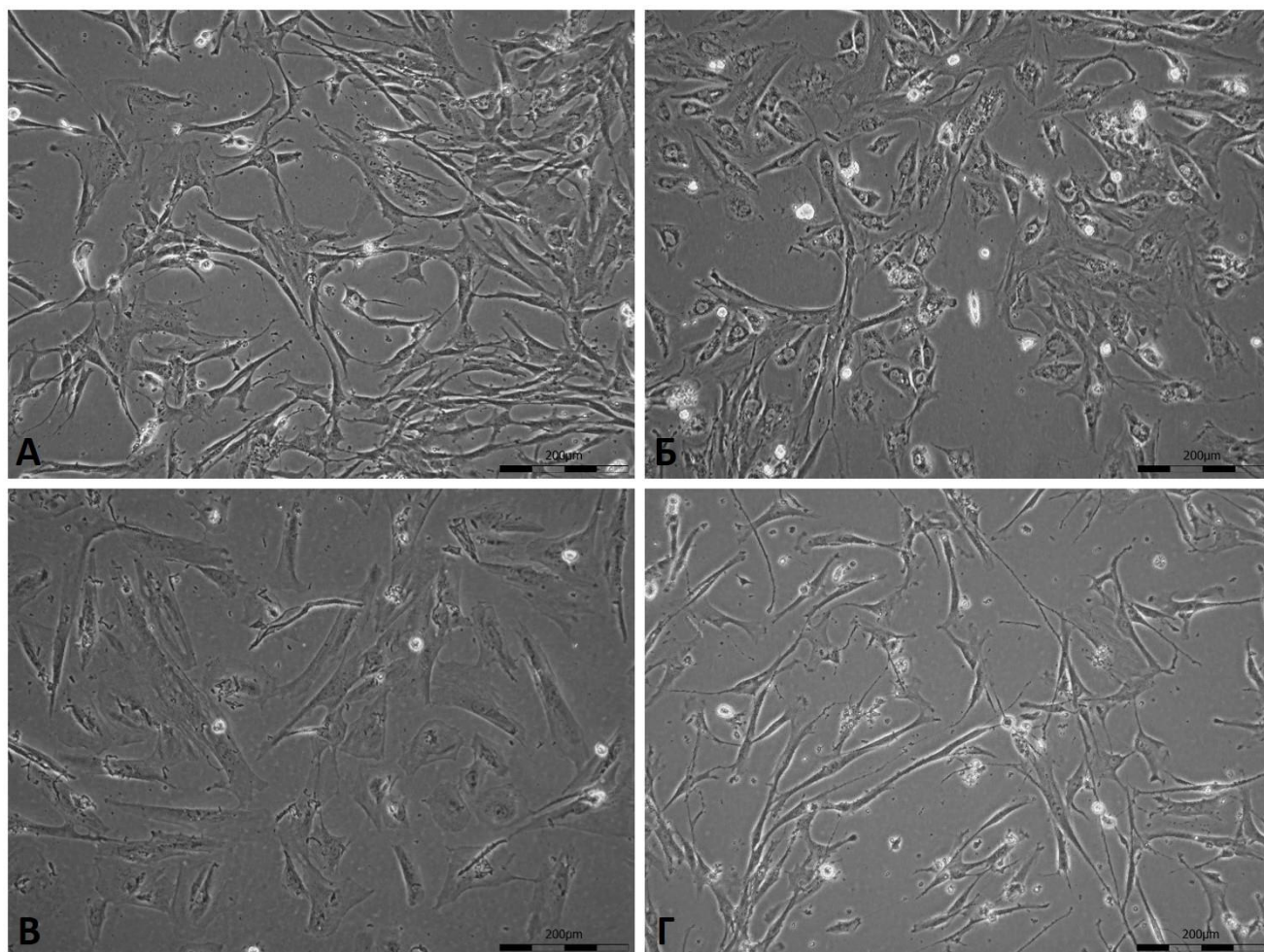


Рисунок 9 – Морфология культивируемых клеток синовиальных сарком:

А – монофазная синовиальная саркома #998, 3 пассаж; Б – монофазная синовиальная саркома #814, 13 пассаж; В – монофазная синовиальная саркома #997, 2 пассаж;

Г – бифазная синовиальная саркома #710, 9 пассаж.

Инvertированный микроскоп, ув.  $\times 100$

Сочетание в культуре вытянутых и полигональных клеток было присуще злокачественной опухоли из оболочек периферических нервов (рис. 10), светлоклеточной (рис. 11) и альвеолярной саркомам (рис. 12).

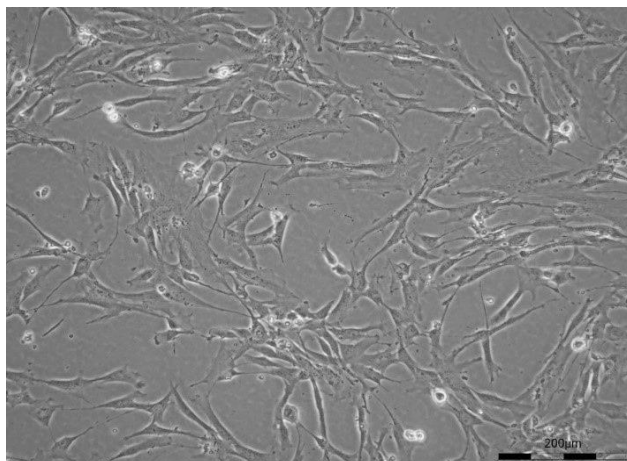


Рисунок 10 – Морфология культивируемой опухоли из оболочек периферического нерва #976, 13 пассаж. Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

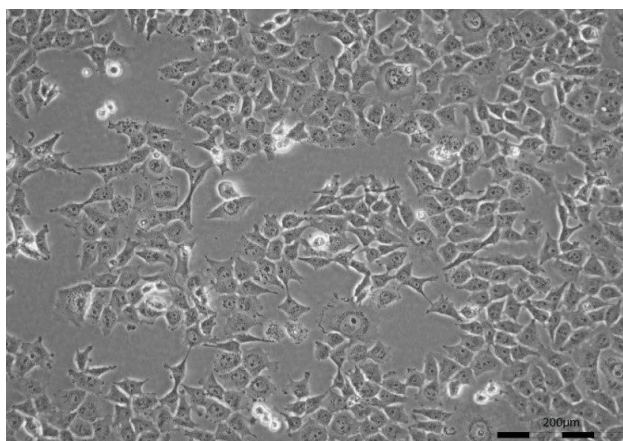


Рисунок 11 – Морфология культивируемой светлоклеточной саркомы #932, 12 пассаж. Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

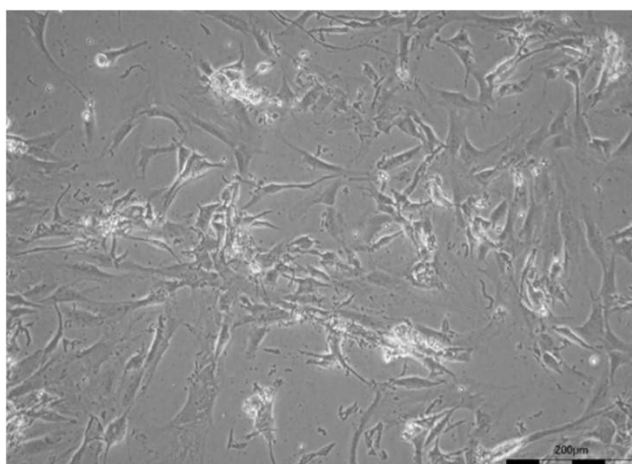


Рисунок 12 – Морфология культивируемой альвеолярной саркомы #927, 10 пассаж. Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

Среди культур ОС преимущественно наблюдали вытянутую веретеновидную и фибробластоподобную форму клеток (рис. 13, 14), которая была единственным вариантом в группе лейомиосарком (рис. 15) и рабдомиосарком (рис. 16). В процессе роста в монослое при усилении его конfluenceности клетки имели тенденцию к образованию радиальных или спиралевидных скоплений.

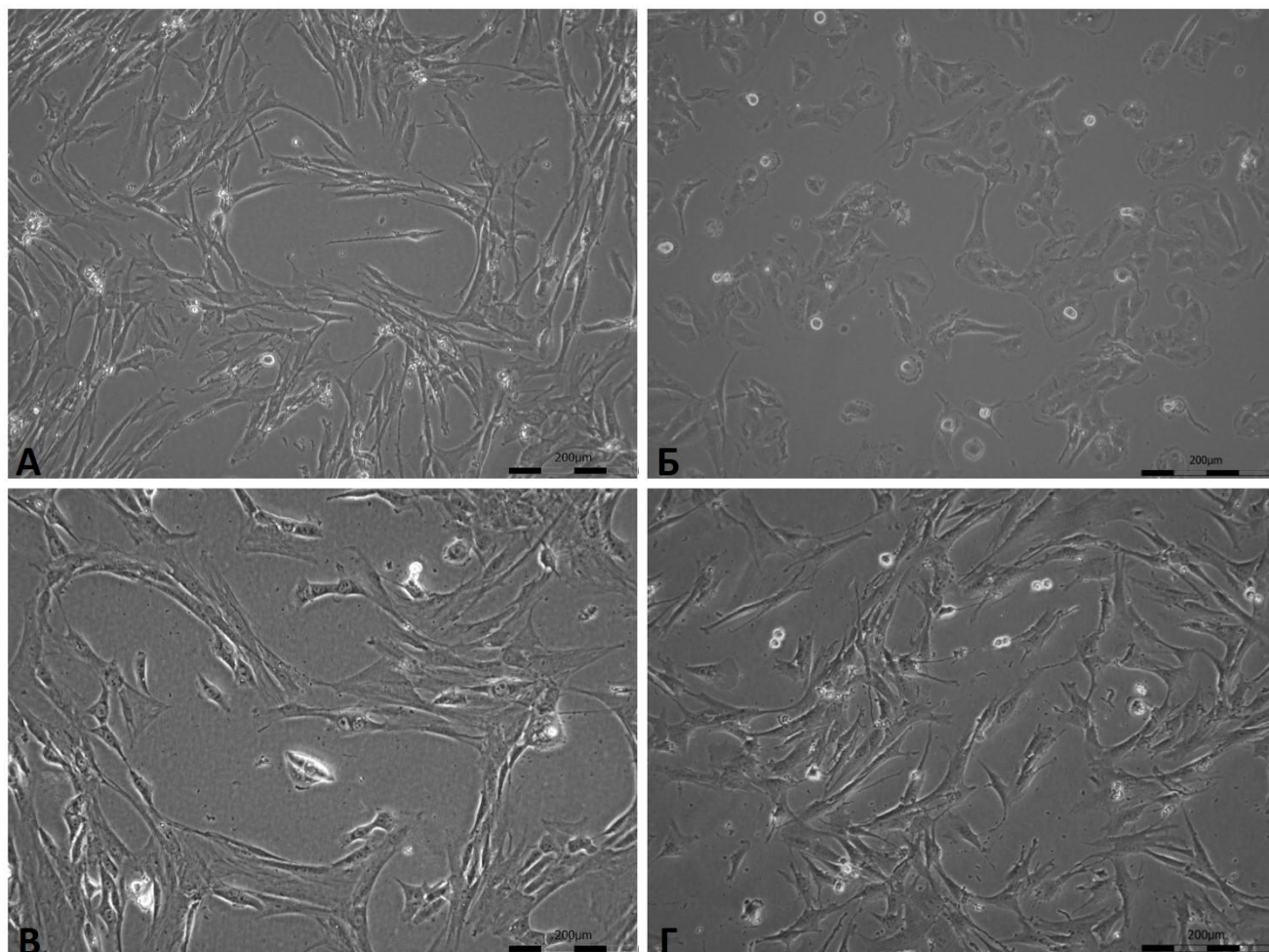


Рисунок 13 – Морфология культивируемых клеток остеосарком:  
А – остеосаркома #962, 8 пассаж; Б – остеосаркома #921, 10 пассаж;  
В – остеосаркома #793, 8 пассаж; Г – остеосаркома #996, 16 пассаж.

Инvertированный микроскоп, ув.  $\times 100$

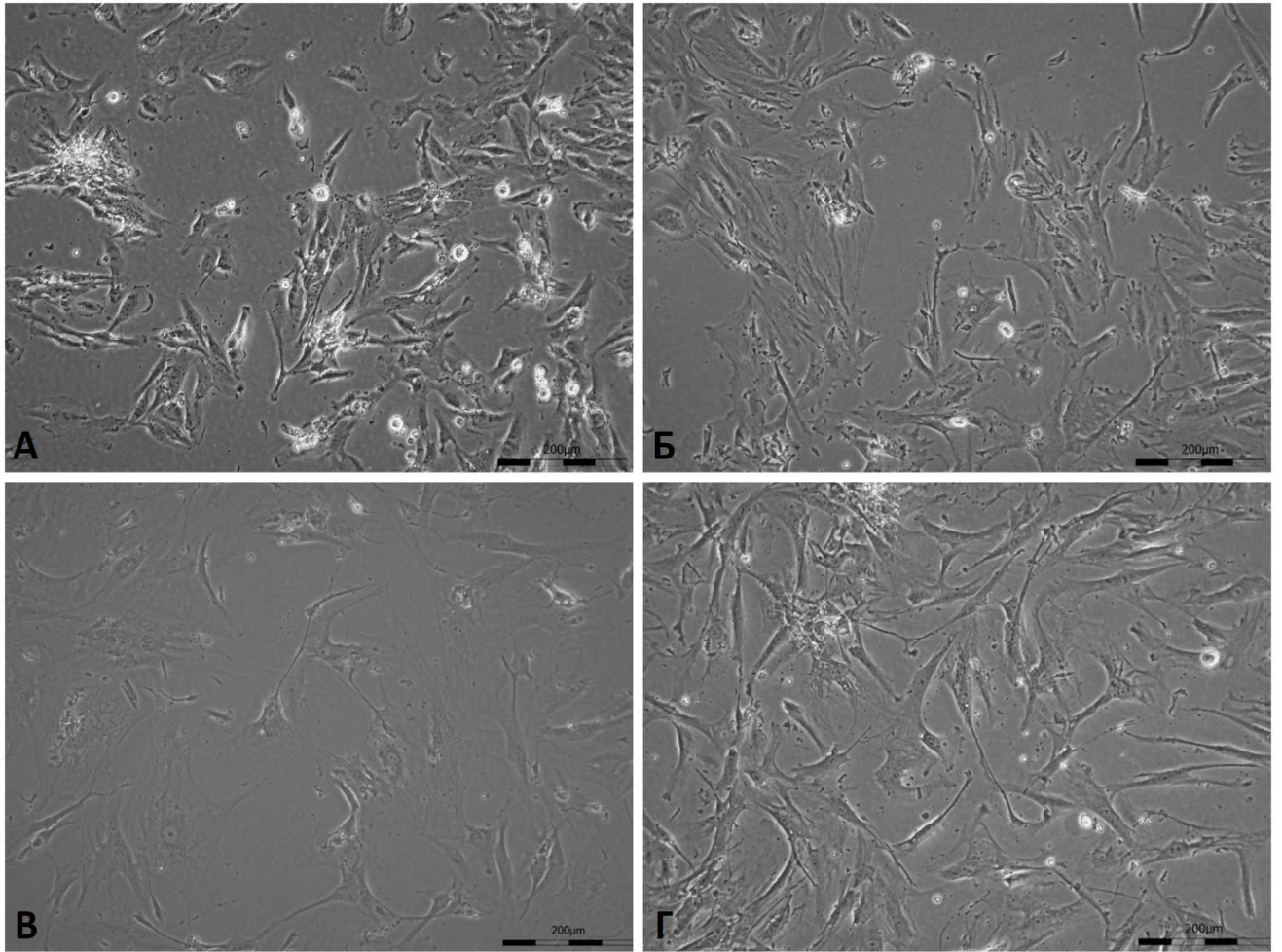


Рисунок 14 – Морфология культивируемых клеток хондросарком:  
А – хондросаркома #925, 10 пассаж; Б – хондросаркома #739, 15 пассаж;  
В – хондросаркома #967, 5 пассаж; Г – хондросаркома #974, 10 пассаж.

Инvertированный микроскоп, ув.  $\times 100$

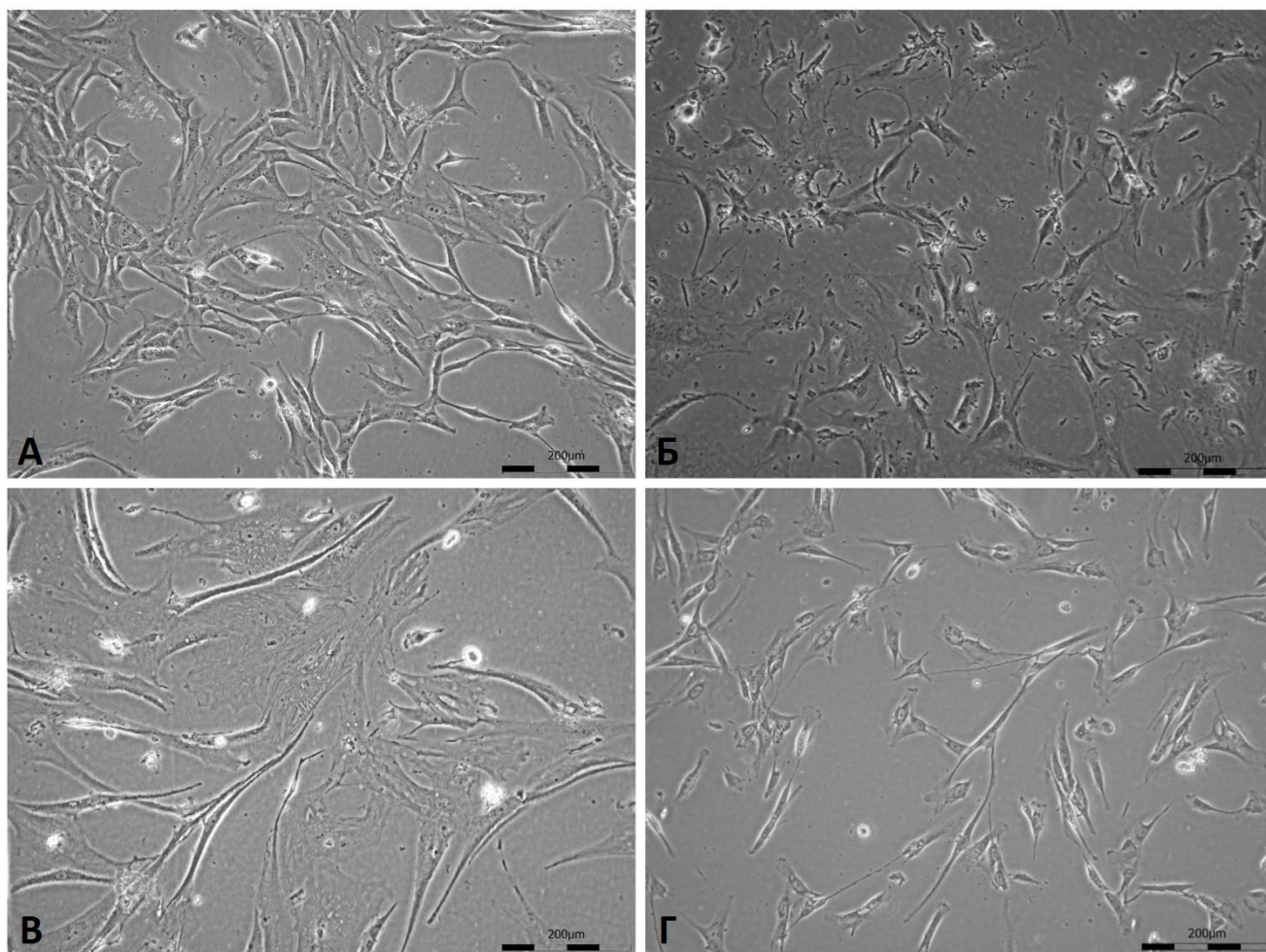


Рисунок 15 – Морфология культивируемых клеток рабдомиосарком:

А – эмбриональная рабдомиосаркома #862, 10 пассаж; Б – альвеолярная рабдомиосаркома #948,

5 пассаж; В – веретенклеточная рабдомиосаркома #919, 14 пассаж;

Г – плеоморфная рабдомиосаркома #1013, 5 пассаж.

Инvertированный микроскоп, ув.  $\times 100$

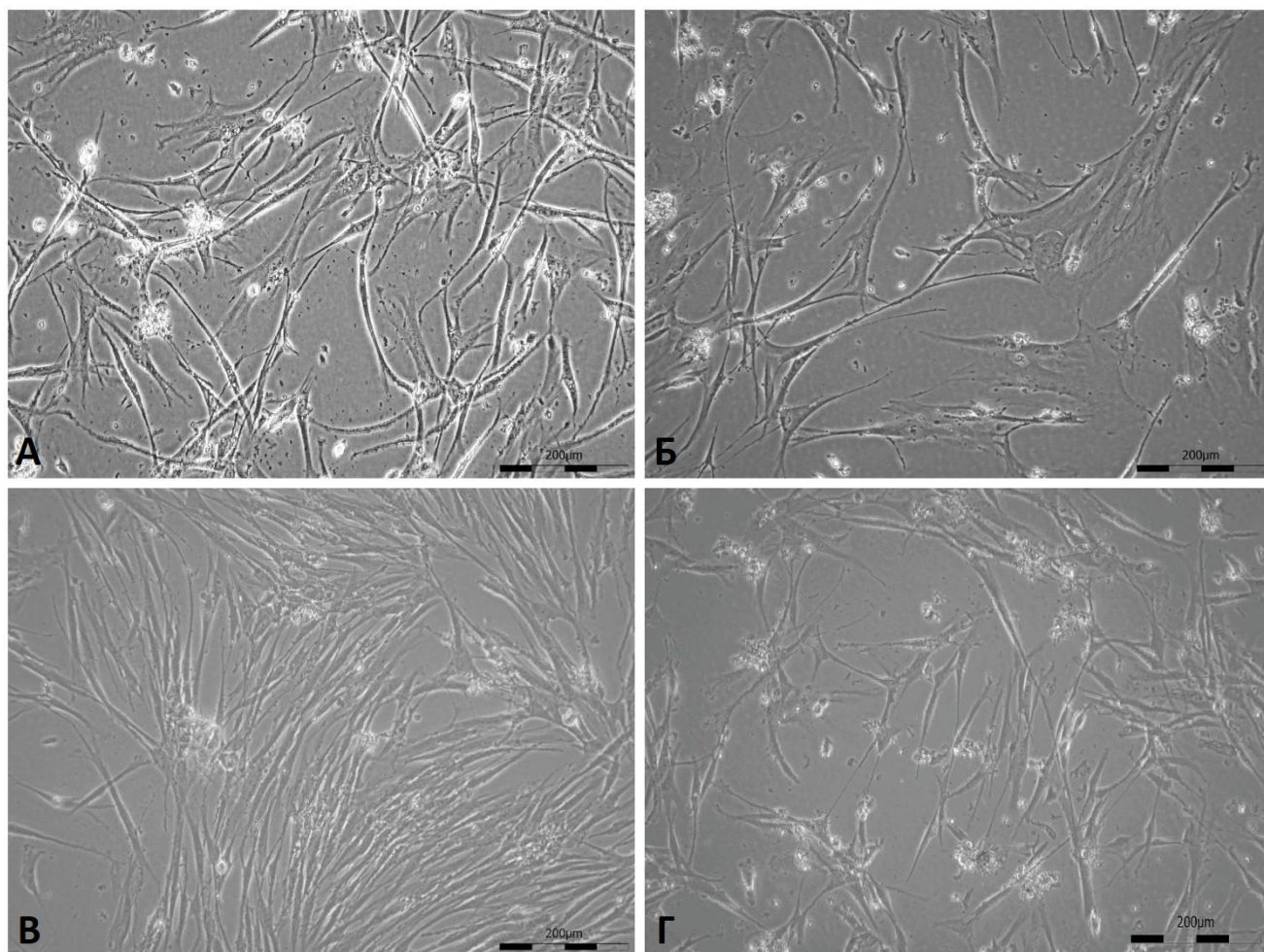


Рисунок 16 – Морфология культивируемых клеток лейомиосарком:

А – лейомиосаркома #699, 16 пассаж; Б – лейомиосаркома #971, 10 пассаж;

В – лейомиосаркома #1008, 4 пассаж; Г – лейомиосаркома #1010, 5 пассаж.

Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

### 3.1.2. Изучение морфологии культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком (конфокальная микроскопия)

Более детально морфология культивируемых клеток ОС была изучена с помощью конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов, окрашивающих ядра, митохондрии, лизосомы и актиновый цитоскелет. Клетки культур сарком, полученные от разных пациентов, сильно варьировали по размеру, ядерно-цитоплазматическому отношению, наличию и ориентации актиновых фибрилл, количеству митохондрий и лизосом. В целом присутствие хорошо развитого митохондриального и лизосомального аппарата указывает на высокий метаболический потенциал и, возможно, на активацию механизмов аутофагии в культивируемых клетках (рис. 17, 18).

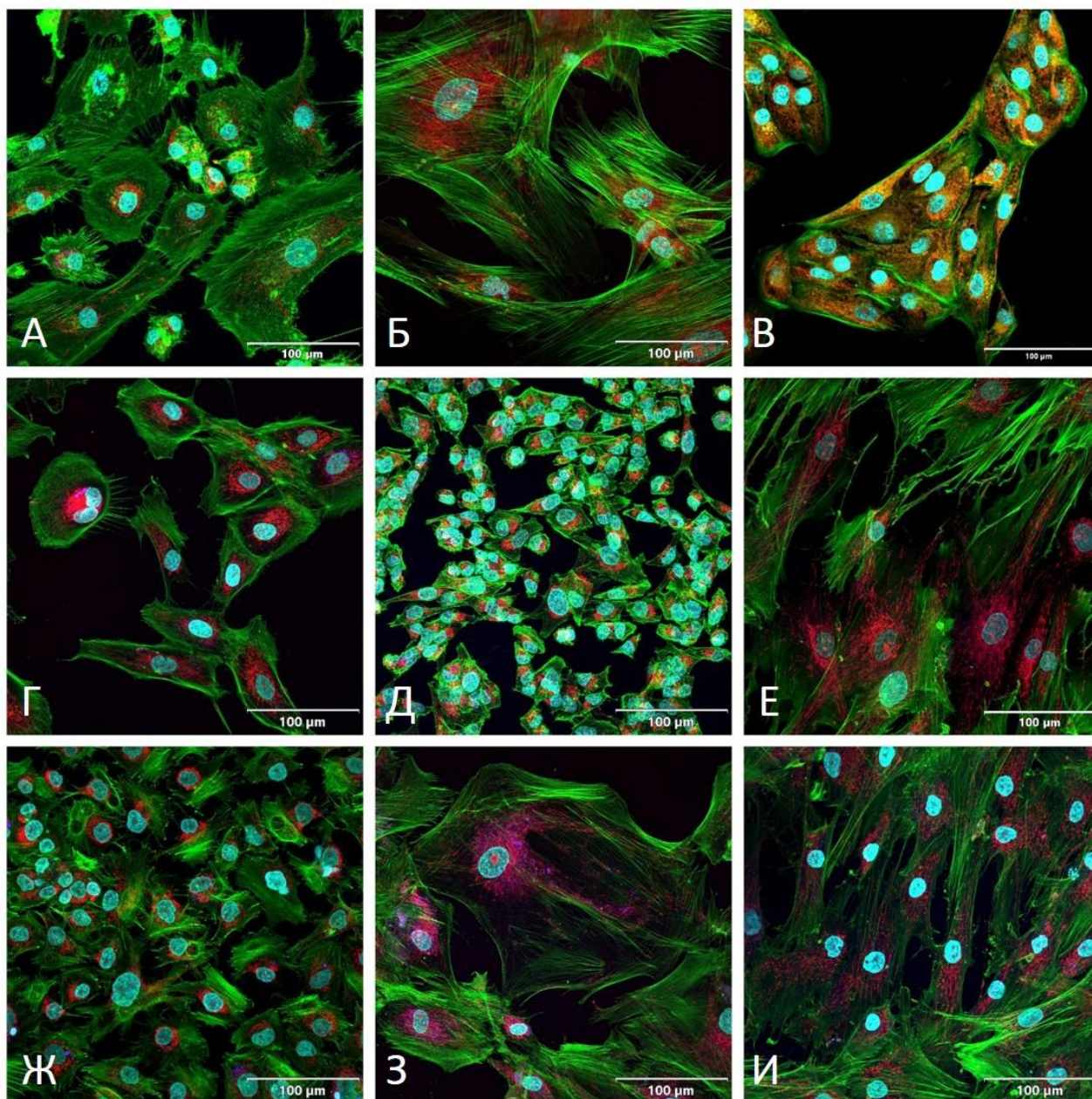


Рисунок 17 – Морфологическая гетерогенность культивируемых клеток СМТ:

А – миксофибросаркома #678, 11 пассаж; Б – лейомиосаркома #699, 16 пассаж; В – липосаркома #702, 10 пассаж; Г – синовиальная саркома #710, 7 пассаж; Д – альвеолярная саркома #927, 13 пассаж; Е – рабдомиосаркома #1013, 10 пассаж, Ж – светлоклеточная саркома #932, 11 пассаж; З – липосаркома #944, 12 пассаж;

И – миксофибросаркома #933, 11 пассаж.

■ – ядро (DAPI); ■ – актин (Alexa Fluor 488); ■ – митохондрии (Alexa Fluor 555);

■ – лизосомы (Cy5). Конфокальный микроскоп, масштабная линейка 100 мкм



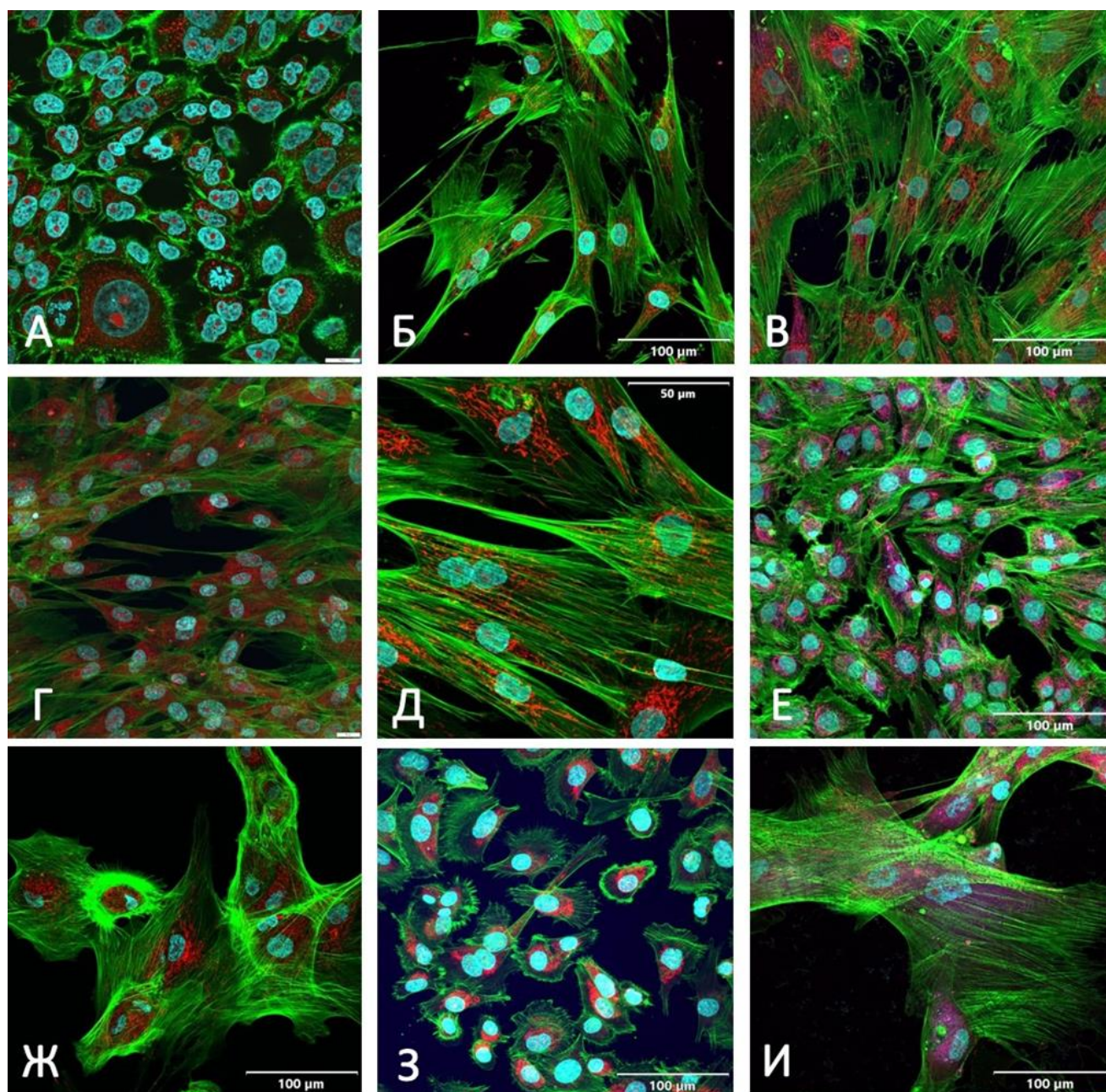


Рисунок 18 – Морфологическая гетерогенность культивируемых клеток ОС:  
 А – #921, 11 пассаж; Б – #926, 6 пассаж; В – #949, 11 пассаж; Г – #996, 12 пассаж; Д – #1030,  
 11 пассаж; Е – #1056, 40 пассаж; Ж – #1068, 11 пассаж; З – #1092, 6 пассаж;  
 И – #1106, 14 пассаж.

■ – ядро (DAPI); ■ – актин (Alexa Fluor 488); ■ – митохондрии (Alexa Fluor 555);  
 ■ – лизосомы (Cy5). Конфокальный микроскоп, масштабная линейка 20 (А, Г), 50 (Д)  
 и 100 мкм (Б, В, Е, Ж, З, И)

### 3.1.3. Характеристика культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком. Результаты HLA-типирования

Анализ экспрессии HLA I класса в опухолевых культурах и образцах мононуклеаров периферической крови пациентов исключил вероятность кроссконтаминации и показал высокую частоту встречаемости у пациентов с СМТ и ОС аллелей HLA-A\*02 75,9% (41/54), и A\*32 18,5% (10/54), что выше, чем в популяции Северо-Западного региона Российской Федерации: 54% ( $p=0,008$ ) и 6% ( $p=0,016$ ) соответственно, по данным ресурса Allele Frequency Net Database (AFND) [www.allelefrequencys.net](http://www.allelefrequencys.net) [120] (рис. 19).

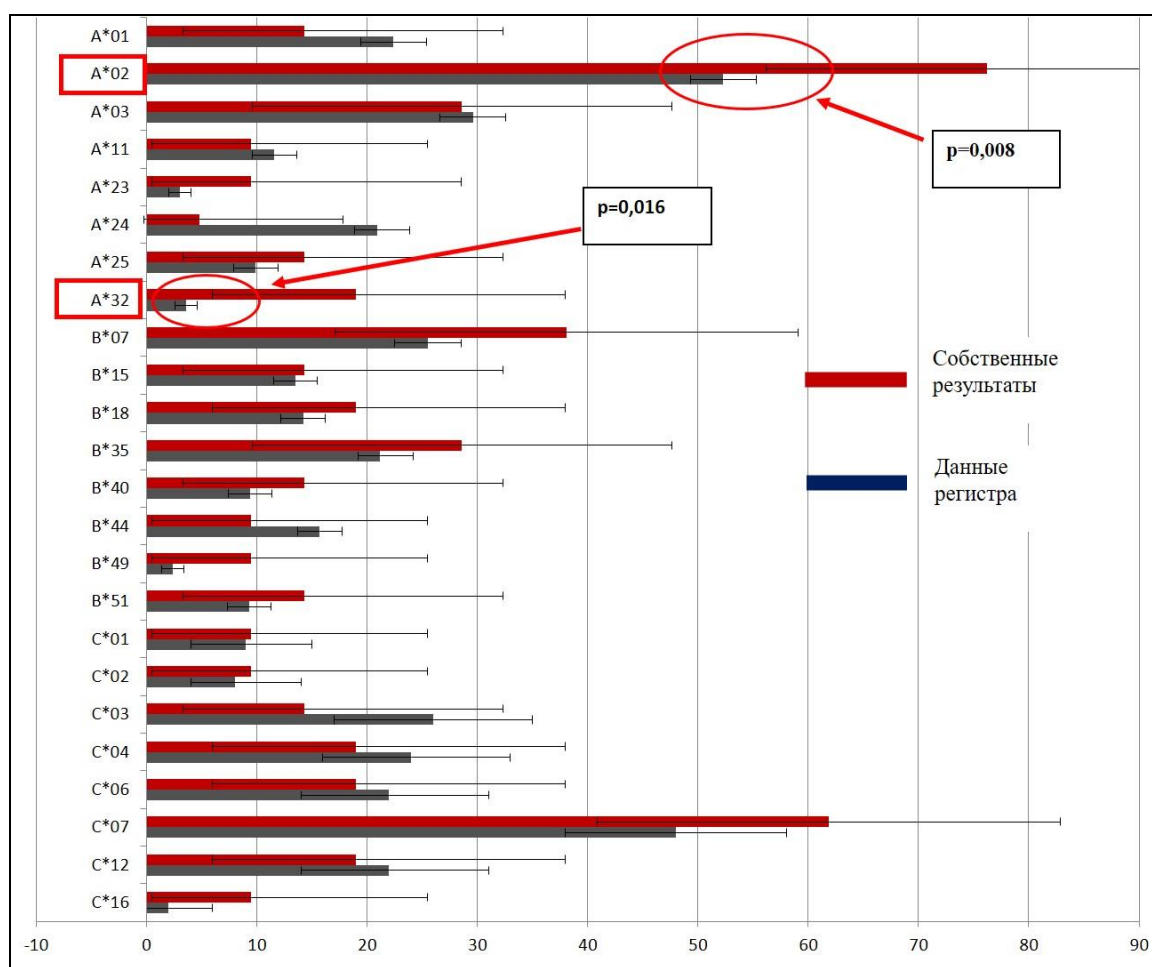


Рисунок 19 – Экспрессия антигенов HLA A/B/C: в культурах клеток СМТ и ОС (собственные результаты) и в популяции Северо-Западного региона РФ (данные регистра)

В процессе прогрессирования происходит ускользание опухоли из-под иммунологического надзора. Наиболее частая причина этого – потеря экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости. Кроме того, различные гаплотипы HLA коррелируют как с риском заболевания, так и с его прогнозом. E. Andersson с соавт. (2012) показали, что пациенты с метастатической серозной аденокарциномой яичника имеют особенно плохой

прогноз, если они несут генотип HLA-A\*02 [121]. В исследовании L. Bahls с соавт. (2017) обнаружена связь между определенными HLA гаплотипами, в том числе I класса (HLA A/B/C), сывороточными концентрациями цитокинов (интерлейкина 6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли-альфа, ИЛ-10 и ИЛ-17) и риском развития рака шейки матки [122]. У женщин, носителей аллели HLA-B\*14 и HLA-C\*08 или гаплотипа HLA-B\*14; C\*08, наблюдалось снижение частоты тяжелых интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки. В другом исследовании В.С. Ваурактар соавт. (2012) выяснили, что HLA-B\*13:01, выявленный только в контрольной группе, может оказаться защитным для рака молочной железы, а HLA-B\*55:01, который встречался только в группе пациенток, может быть фактором риска развития этого заболевания [123].

Активация эффективного иммунного ответа против опухолевых клеток включает презентацию антигена специфическим Т-клеткам. Лейкоцитарные антигены человека (HLA) играют важную роль в этом процессе. Молекулы HLA класса I, которые экспрессируют все ядродержащие клетки организма, представляют внутриклеточные антигены для цитотоксических Т-клеток, в то время как молекулы HLA класса II на поверхности профессиональных антигенпрезентирующих клеток (дендритных клеток, макрофагов и В-лимфоцитов), представляют внеклеточные антигены для хелперных Т-клеток. Поскольку гены, кодирующие молекулы HLA, отличаются значительным полиморфизмом, разнообразие HLA, возможно, определяет различную способность иммунного распознавания, что впоследствии создает различную восприимчивость к неопластической прогрессии.

В нашем исследовании в качестве контрольной группы были использованы данные регистра здоровых жителей Северо-Западного региона РФ. При этом значимые различия с контрольной популяцией были определены только для двух аллелей: A\*02 и A\*32. Частота остальных аллелей была сопоставима со средними показателями по региону (табл. 6).

Таблица 6 – Частота встречаемости различных аллелей в клеточных культурах СМТ и ОС

Аллель	Частота встречаемости в опухолевых культурах (%) / в популяции (%)	Критерий $\chi^2$	Уровень значимости p
1	2	3	4
A*01	14,8/17	0,12	0,73
<b>A*02</b>	<b>75,9/54</b>	<b>7,13</b>	<b>0,008</b>
A*03	27,8/24	0,27	0,61
A*11	9,3/12	0,27	0,61
A*23	9,3/3	2,79	0,09
A*24	22,2/22	0,001	0,96
A*25	14,8/10	0,79	0,38

1	2	3	4
<b>A*32</b>	<b>18,5/6</b>	<b>5,9</b>	<b>0,016</b>
B*07	16,7/22	0,62	0,43
B*15	14,8/15	0,001	0,98
B*18	18,5/12	1,22	0,27
B*35	27,8/22	0,64	0,42
B*40	14,8/12	0,25	0,62
B*44	20,4/22	0,06	0,82
B*49	7,4/3	1,57	0,21
B*51	14,8/9	1,21	0,27
C*01	9,3/9	0,003	0,99
C*02	9,3/8	0,07	0,79
C*03	14,8/26	2,55	0,11
C*04	18,5/24	0,61	0,43
C*06	18,5/22	0,26	0,61
C*07	61,1/48	2,42	0,12
C*12	18,5/22	0,26	0,61
C*16	5,6/2	1,41	0,24

### 3.1.4. Сравнительный анализ пролиферативной активности культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком на разных пассажах в процессе длительного культивирования

В процессе культивирования опухолевые клетки демонстрировали различную скорость пролиферации. Время удвоения ( $T_2$ ) составило в среднем 75 ч (min 29 ч – max 119 ч). При этом минимальное  $T_2$  продемонстрировали клеточные линии альвеолярной саркомы, миксофибросарком и липосарком (табл. 7). Наибольшее  $T_2$  продемонстрировали клетки остеогенных сарком. В процессе длительного культивирования во всех случаях происходило уменьшение  $T_2$ , что демонстрирует адаптационную пластичность малигнизированных клеток.

Аналогичным образом изменялись показатели пролиферативной активности максимальное значение клеточного индекса и параметр Slope ( $CI_{max}$ , Slope), измеренные с помощью автоматического клеточного анализатора xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США) за 72 часа наблюдения.

Таблица 7 – Пролиферативная активность культивируемых клеток сарком и ее изменение в процессе длительного пассирования

	Гистотип саркомы	<10 пассажей, среднее (min–max)			>15 пассажей, среднее (min–max)		
		T <sub>2</sub> /ч	CI <sub>max</sub>	Slope *10 <sup>-3</sup> /ч	T <sub>2</sub> /ч	CI <sub>max</sub>	Slope *10 <sup>-3</sup> /ч
СМТ	Липосаркома	48,5 42–55	2,1 1,9–2,4	19,7 15,5–23,8	50,5 30–71	3,7 3,5–3,9	38,7 34,2–43,2
	Синовиальная саркома	76 70–89	2,9 0,6–8,4	13,1 5,4–20,5	70,6 58–86	2,6 1–4,7	22,8 10,7–39,5
	Миксофибросаркома	67 40–96	2,4 0,3–5,0	30 2,8–71,3	63,1 43,5–92	3,6 0,7–6,6	37,6 7,4–89,6
	Лейомиосаркома	95 75–115	3,4 2,8–3,9	15,5 2,7–28,2	87 67–107	3,3 2–4,7	29,5 6,1–52,8
	Рабдомиосаркома	87	1	10,6	85	1,1	11,6
	Опухоль из оболочек периферических нервов	81	2,94	32,8	77	4,2	34,5
	Альвеолярная саркома	51	3,8	56,1	47	4,3	61,8
	Светлоклеточная саркома	112	0,9	8,6	99	1,3	13,4
ОС	Остеосаркома	80,3 37–119	2 0,1–5,1	25,3 1,7–68,5	75,3 29–112	2,4 0,2–4,8	34,2 3,3–79,3
	Хондросаркома	99	1,3	16,9	93	2,5	22,7

На поздних пассажах отмечен рост пролиферативной активности. В культурах СМТ среднее значение показателя Slope увеличилось с 21,8 до 30,5 ( $p=0,0003$ ) (рис. 20 А). В культурах ОС этот показатель вырос с 24,7 до 33,3 ( $p=0,0001$ ) (рис. 20 Б).

Индивидуальные характеристики отдельных опухолевых культур СМТ и ОС с минимальным и максимальным значением пролиферативной активности представлены на рисунках 20 В, Г и 20 Д, Е соответственно.

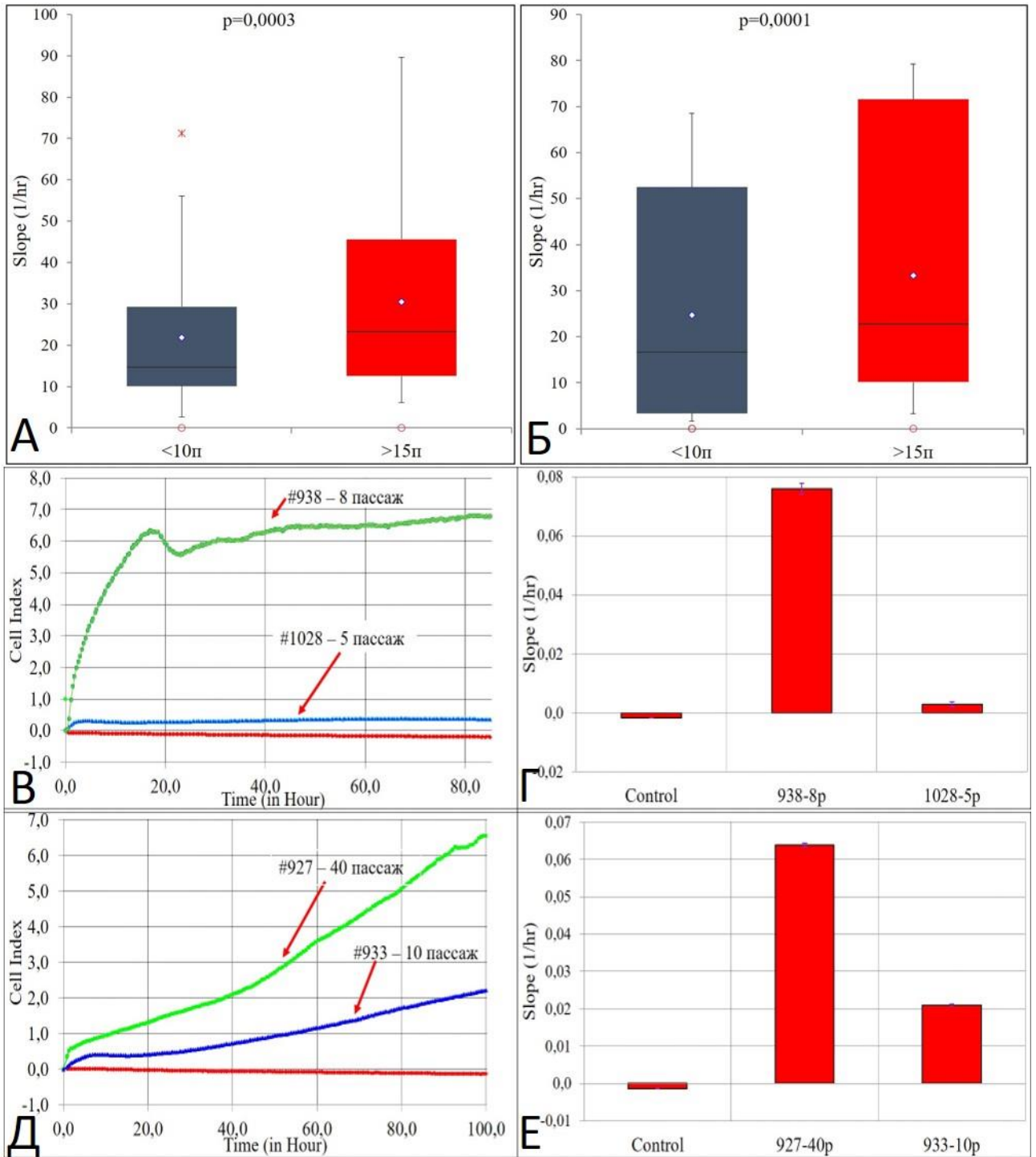


Рисунок 20 – Пролиферативная активность в культурах клеток СМТ и ОС на раннем (<10 пассажей) и позднем (>15 пассажей) этапах культивирования: А – Slope культур СМТ; Б – Slope культур ОС. Пролиферативная активность опухолевых культур СМТ: лейомиосаркомы #735, на 7 пассаже, с максимальным значением параметров и миксофибросаркомы #924, на 5 пассаже с min значением параметров: В – изменение клеточного индекса; Г – Slope. Пролиферативная активность опухолевых культур ОС: остеосаркомы #938, на 8 пассаже, с max значением параметров и остеосаркомы #1028, на 5 пассаже с min значением параметров: Д – изменение клеточного индекса; Е – Slope. XCelligence (72 ч наблюдения)

### 3.1.5. Изучение миграции и инвазии культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком

Все исследованные клеточные культуры СМТ и ОС, полученные от разных больных, проявляли инвазивные свойства и демонстрировали различный инвазивный потенциал. Согласно данным измерения электрического импеданса на приборе xCelligence, в большинстве случаев наблюдали «скачкообразный переход» малигнизированных клеток через поры мембраны (миграция) и через матригель (инвазия) в период между 30–45 часами наблюдения. Выявлены значимые различия по параметру миграционной активности между культурами СМТ и ОС ( $p=0,03$ ) за все время наблюдения (рис. 21 А), при этом по инвазивному потенциалу различий не обнаружено ( $p=0,3$ ) (рис. 21 Б).

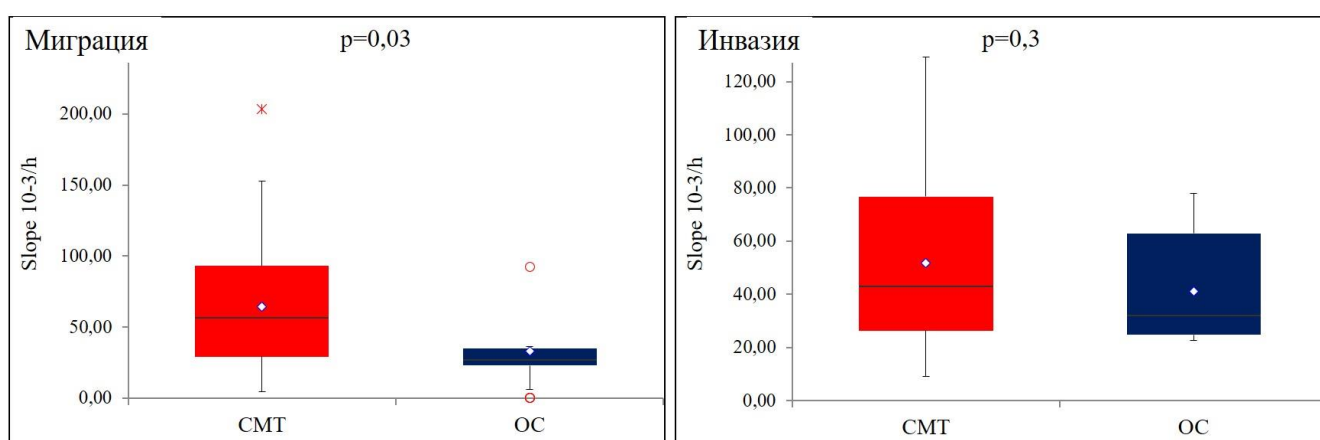


Рисунок 21 – Миграционная активность и инвазивный потенциал культивируемых клеточных линий: А – различия СМТ и ОС по миграционной активности; Б – различия по параметру инвазии. XCelligence (96 ч наблюдения)

В подгруппе СМТ наибольшими миграционными и инвазивными свойствами характеризовались культуры плеоморфной липосаркомы #702 (рис. 22 А, Б) и светлоклеточной саркомы #932 (рис. 22 В, Г).

Для ОС максимальное значение  $CI_{migr}$  было выявлено в культуре остеосаркомы #926 (рис. 22 Д, Е), максимальный  $CI_{inv}$  – в культуре хондросаркомы #925 (рис. 22 Ж, З).

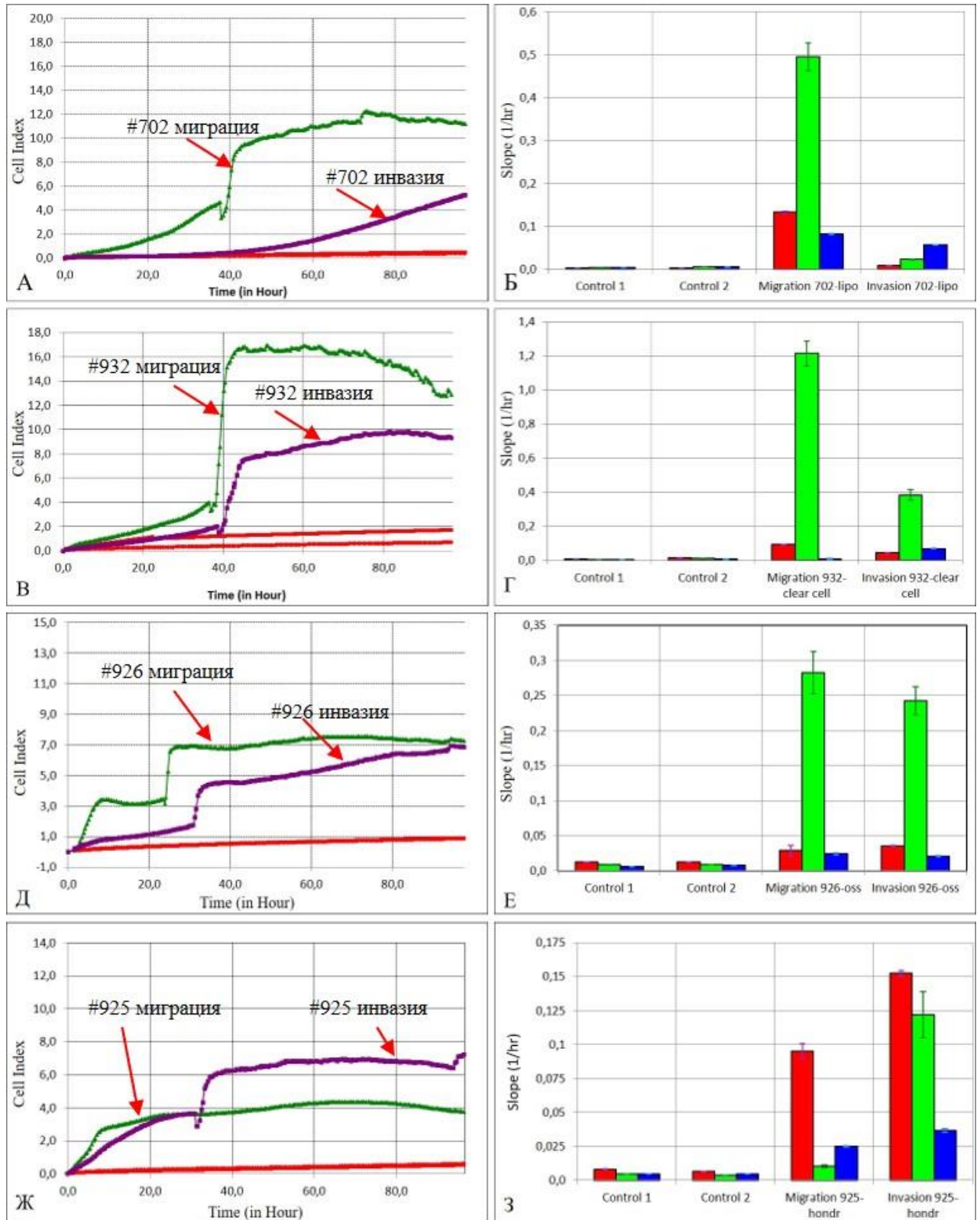


Рисунок 22 – Измерение параметров инвазивной и миграционной активности в опухолевых культурах СМТ и ОС: А, Б – культура липосаркомы #702 (10 пассаж); В, Г – светлоклеточной саркомы #932 (11 пассаж); Д, Е – остеосаркомы #926 (5 пассаж); Ж, З – хондросаркомы #925 (10 пассаж). Зеленый цвет – кривая миграции, фиолетовый – инвазии.

xCelligence (96 ч наблюдения)



### **3.1.6. Изучение свойств культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком в трехмерных структурах**

Все изученные опухолевые культуры продемонстрировали способность к образованию сфероидов. За одинаковое время (7 дней) опухолевые клетки, помещенные в каплю в одной и той же концентрации  $5 \times 10^4$ , образовывали сфероиды различного диаметра с медианным значением 192,5 мкм (min 113 мкм – max 365 мкм). Размеры сфероидов значительно варьировали в пределах одного гистологического подтипа.

Среди СМТ максимальный диаметр к началу эксперимента имели сфероиды миксофибросаркомы #982 (рис. 23 А, Б, В), минимальный – рабдомиосаркомы #862 (рис. 23 Г, Д, Е).

Среди ОС самые крупные сфероиды имела культура #921 (рис. 23 Ж, З, И), а клетки линии #996 отличались минимальным размером образованных сфер (рис. 23 К, Л, М).

Инвазию культивируемых клеток СМТ и ОС в 3D-системе оценивали по изменению диаметра и площади, занимаемой клетками сфероидов после их распределения в толще матрикеля. Проведенный анализ последовательных изображений в режиме реального времени показал прямую корреляционную зависимость высокой силы между начальным диаметром сфероидов и скоростью распространения клеток в матрикеле ( $\rho=0,72$ ;  $p=0,01$ ) (рис. 23 Н, О).

При этом не было выявлено значимых различий между опухолевыми культурами СМТ и ОС. За время наблюдения скорость изменения диаметра сфероидов для СМТ составила 9,6 мкм/ч (min 5,2 – max 14,0), а занимаемой им площади 7291,1 мкм<sup>2</sup>/ч (min 2474,1 – max 13387,2).

Для ОС эти показатели были несколько ниже и составили 6,6 мкм/ч (min 3,2 – max 12,2), а занимаемой им площади 2817,5 мкм<sup>2</sup>/ч (min 1093,5 – max 12584,1) ( $p>0,05$ ).

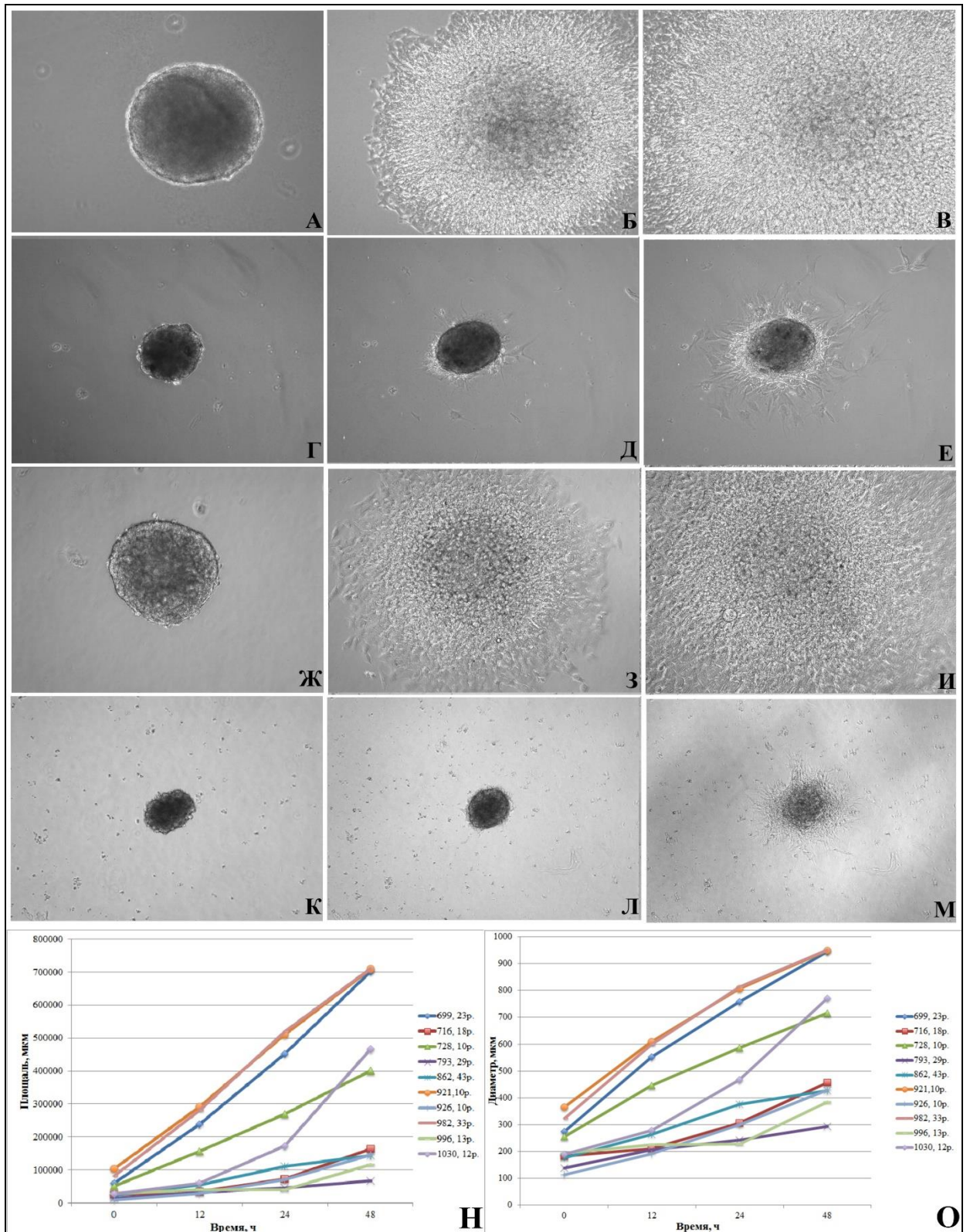


Рисунок 23 – Эволюция сфероидов СМТ и ОС, помещенных в матригель:

А, Б, В – культура миксофибросаркомы #982; Г, Д, Е – культура рабдомиосаркомы #862; Ж, З, И – культура остеогенной саркомы #921; К, Л, М – культура остеогенной саркомы #926; Н – графическое отображение изменения диаметра сфероидов СМТ и ОС за 48 ч наблюдения; О – графическое отображение изменения площади сфероидов СМТ и ОС за 48 ч наблюдения.

Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

### 3.2. Клонирование культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком

Проведено клонирование всех 56 полученных опухолевых культур, при этом только в 22 случаях процедура была успешной. Изменения, происходящие в процессе клонирования культуры липосаркомы #702 на 5 пассаже (5р), продемонстрированы на рис. 24.

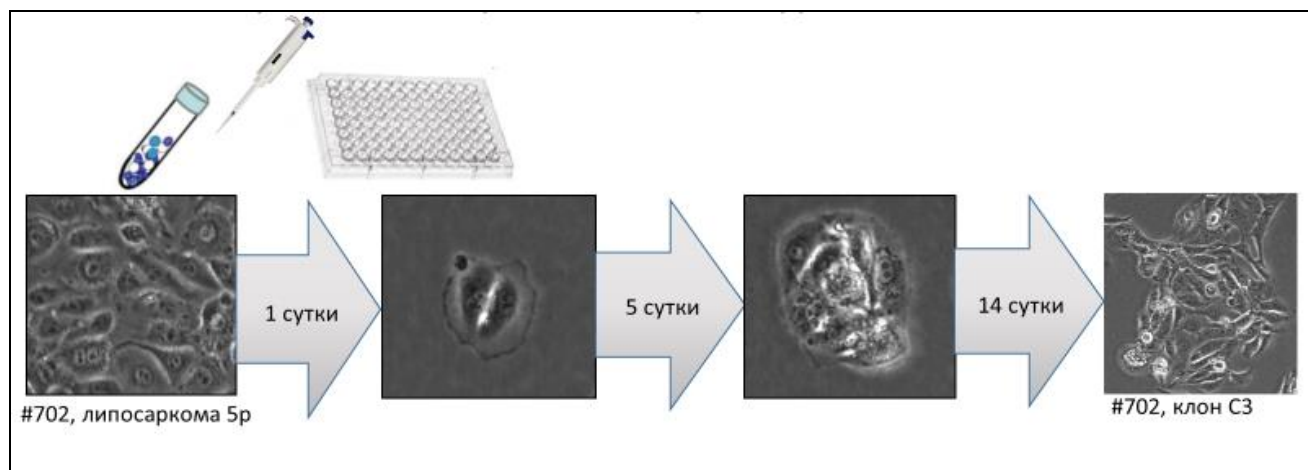


Рисунок 24 – Схема клонирования и рост клона липосаркомы #702 из одной клетки за 14 дней культивирования

Образцы опухолей были получены от пациентов, составляющих достаточно однородную группу по типу и характеру опухолевого процесса. Во всех случаях это были новообразования с высокой степенью злокачественности и низкой степенью дифференцировки. На момент хирургического вмешательства у всех больных был подтвержден метастатический характер заболевания. Тем не менее только 39,3% из клеточных линий обладали способностью к формированию колоний при использовании метода предельных разведений.

Таким образом, 56 клеточных линий по клоногенности были разделены на 2 группы: 1) клоногенные клеточные линии 39,3% (22/56) и 2) неклоногенные клеточные линии 60,7% (34/56). В качестве количественной характеристики клоногенности для клонированных клеточных линий определяли эффективность клонирования (ЭК) – отношение числа клеток, сформировавших колонии к общему числу адгезированных одиночных клеток. Среди клоногенных культур ЭК варьировалась от 9,1% в культуре липосаркомы #702 до 93,2% в остеогенной саркоме #921, составляя в среднем 47,5%. В дальнейшем проводили сравнение между группами клоногенных и неклоногенных сарком по различным параметрам. Также для исследований случайным образом было отобрано 83 клона. Их характеристики отражены на рисунке 25.

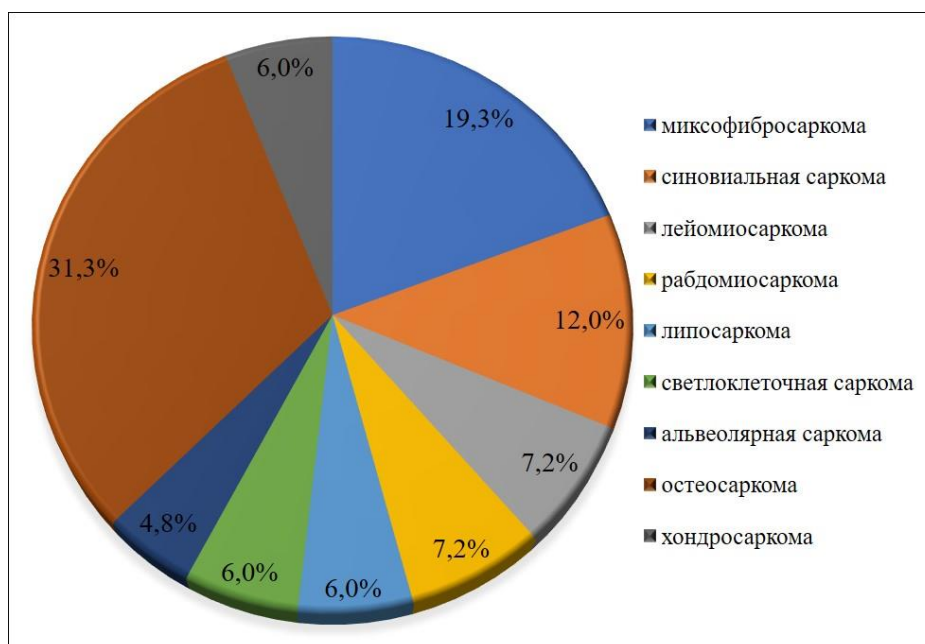


Рисунок 25 – Гистологические подтипы клонов метастатических сарком, отобранные для исследования

Морфологически клоны незначительно отличались от исходных «родительских» культур (рис. 26).

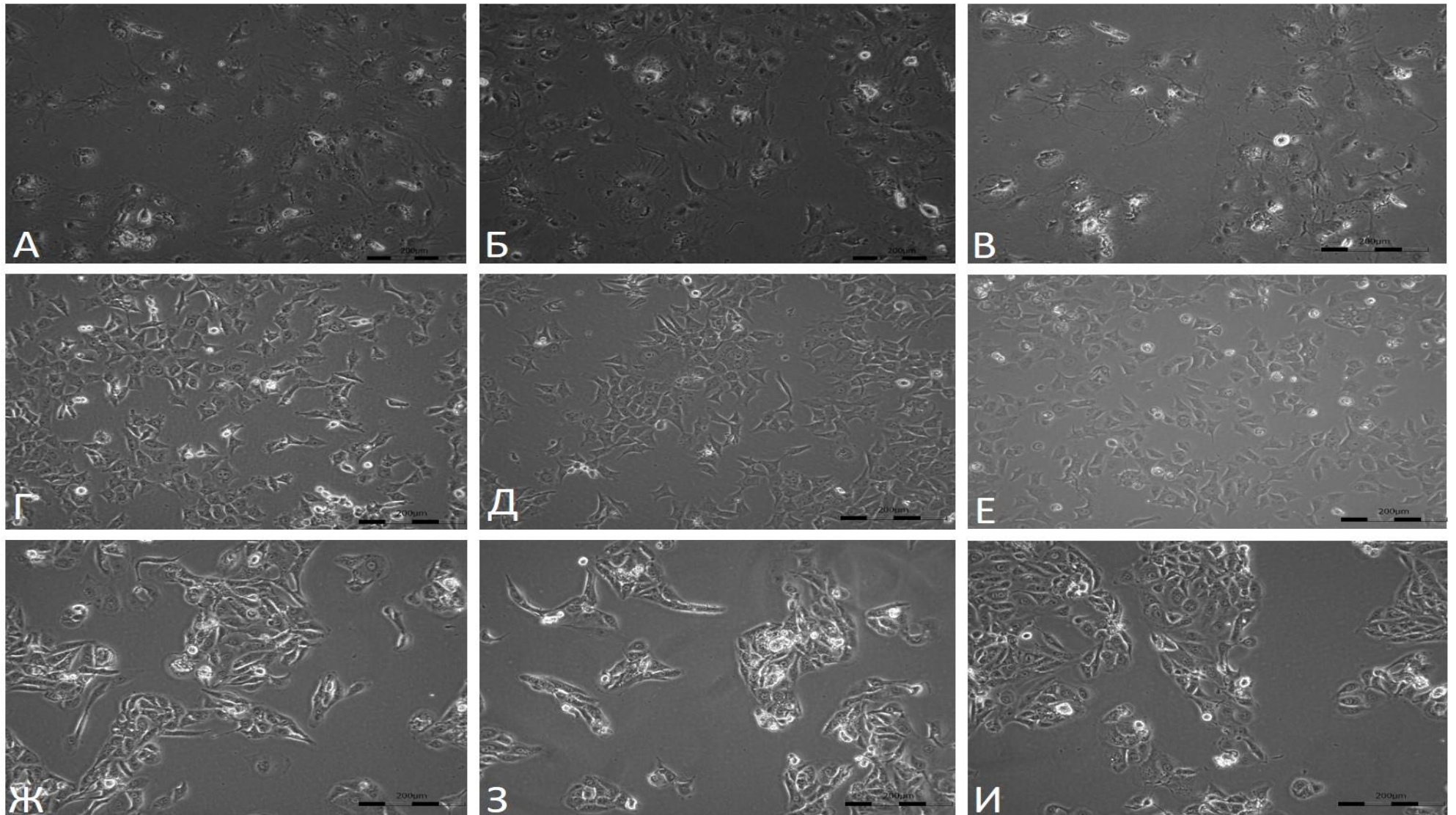


Рисунок 26, (начало) – Морфология культивируемых клеток СМТ, ОС и их клонов:

А – #678 хондросаркома; Б, В – клоны #678В6 и #678С6, 5 пассаж; Г – #920 миксофибросаркома; Д, Е – клоны #920В3 и #920С6, 5 пассаж; Ж – #702 липосаркома; З, И – клоны #702В3 и #702Д5, 5 пассаж. Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

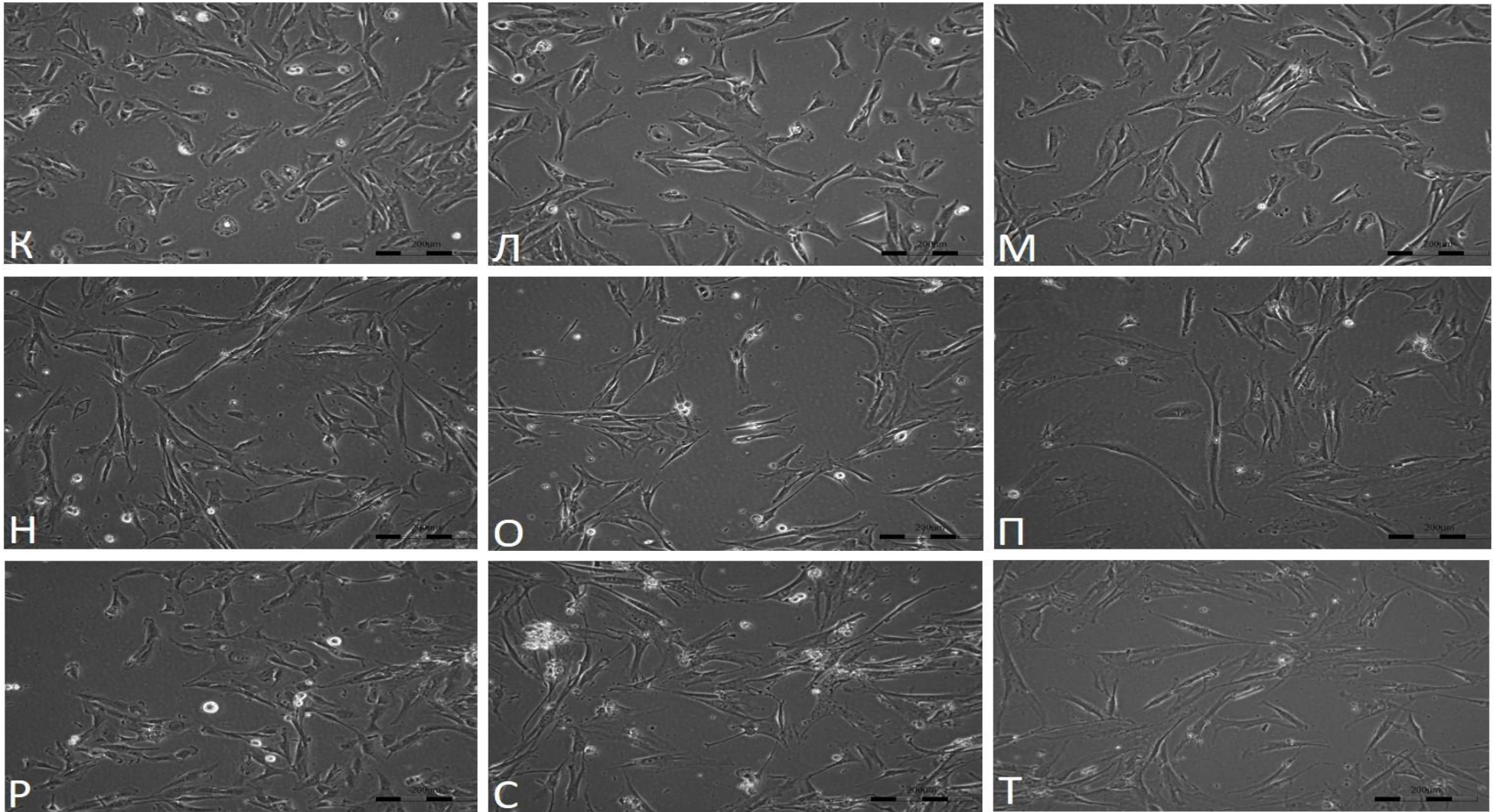


Рисунок 26 (окончание) – Морфология культивируемых клеток СМТ, ОС и их клонов:

К – #1019 синовиальная саркома; Л, М – #1019С6 и #1019D2, 5 пассаж; Н – #996 остеосаркома; О, П – клоны #996С4 и #996D3, 5 пассаж; Р – #925 хондросаркома; С, Т – клоны #925С2 и #925С4, 5 пассаж. Инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

### 3.2.1. Сравнительный анализ пролиферативной активности «родительских» культур сарком и их клонов

Значимые различия в пролиферации клеточных культур с высоким и низким клоногенным потенциалом не были обнаружены. В процессе длительного непрерывного культивирования, по мере адаптации к росту на пластике, пролиферативная активность опухолевых культур увеличивалась ( $p=0,0004$ ) (рис. 27 А). При сравнении интенсивности пролиферации опухолевых культур и их клонов отмечен рост пролиферативной активности клонов по сравнению с исходными культурами (рис. 27 Б). Медианное значение Slope для исходных опухолевых культур составило  $12,5 \cdot 10^{-3}$  (min  $2,1 \cdot 10^{-3}$  – max  $71,3 \cdot 10^{-3}$ ), для клонов  $31,9 \cdot 10^{-3}$  (min  $6,3 \cdot 10^{-3}$  – max  $184,7 \cdot 10^{-3}$ ), ( $p=0,0003$ ).

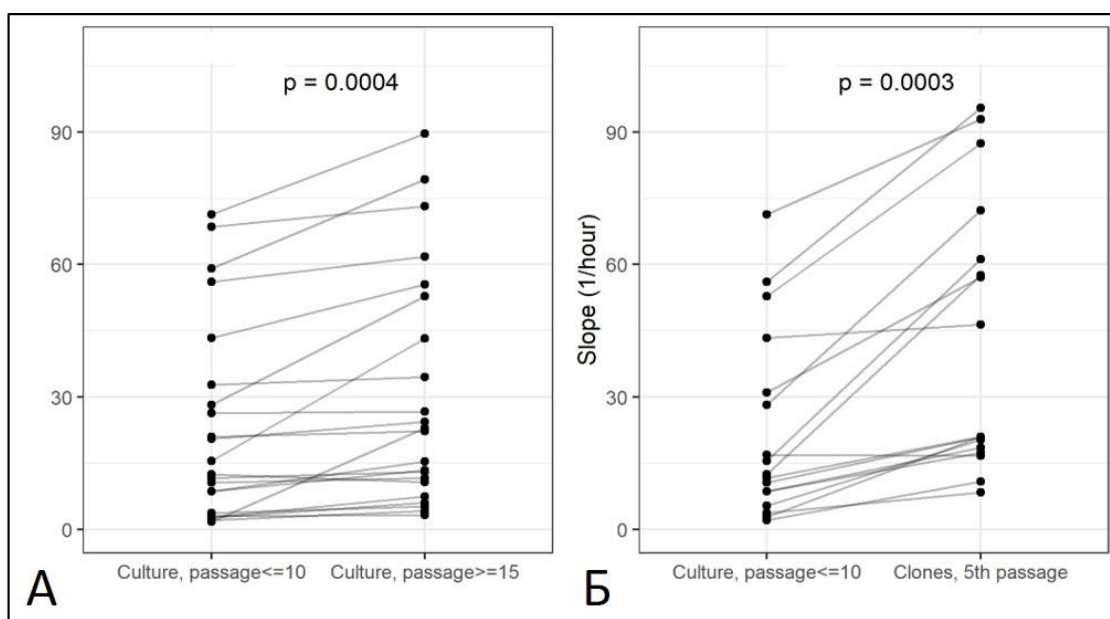


Рисунок 27 – Анализ пролиферативной активности клеточных культур сарком: А – в процессе длительного культивирования; Б – при клонировании

### 3.2.2. Изучение миграционной и инвазивной активности клоногенных и неклоногенных опухолевых культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком

Миграционная активность клоногенных опухолевых культур была выше по сравнению с неклоногенными культурами [медианные значения Slope  $51,35 \cdot 10^{-3}$  (min  $5,48 \cdot 10^{-3}$  – max  $203,6 \cdot 10^{-3}$ ) и  $31,1 \cdot 10^{-3}$  (min  $4,8 \cdot 10^{-3}$  – max  $133,3 \cdot 10^{-3}$ ) соответственно ( $p=0,04$ )] (рис. 28 А). Инвазивная способность клеточной популяции клоногенных культур также была выше [медианные значения Slope  $47,5 \cdot 10^{-3}$  (min  $17,6 \cdot 10^{-3}$  – max  $129,4 \cdot 10^{-3}$ ), чем в неклоногенных культурах ( $34,6 \cdot 10^{-3}$  (min  $9,2 \cdot 10^{-3}$  – max  $109,9 \cdot 10^{-3}$ )], ( $p=0,05$ ) (рис. 28 Б). На рисунке 28 В, Г представлены примеры инвазивных и миграционных характеристик клоногенной культуры

светлоклеточной саркомы #932 с максимальными параметрами и неклоногенной культуры лейомиосаркомы #971 с минимальными характеристиками.

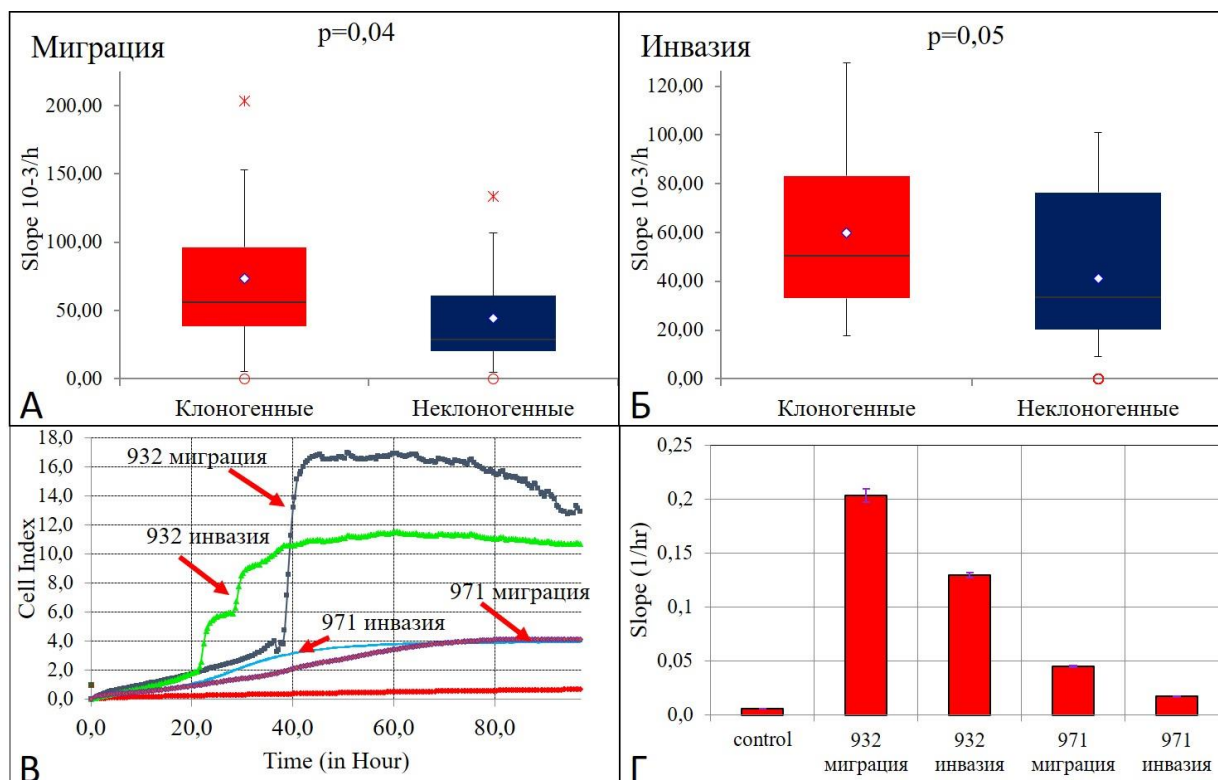


Рисунок 28 – Сравнительный анализ: А – миграционной; Б – инвазивной активности культур клоногенных и неклоногенных сарком; В, Г – пример инвазивных и миграционных характеристик клоногенной культуры #932, 14 пассаж с максимальными значениям параметров и неклоногенной культуры #971, 11 пассаж с минимальными параметрами (Клеточный анализатор xCelligence, ACEA Bioscience Inc., США), 96 ч наблюдения

### 3.2.3. Анализ маркеров стволовых клеток опухоли в культурах сарком мягких тканей и остеогенных сарком

Наибольшее количество ALDH1<sup>+</sup> и CD133<sup>+</sup> клеток было обнаружено в культурах лейомиосаркомы: 52,5% и 10,8% соответственно. Наименьшее количество ALDH1<sup>+</sup> и CD133<sup>+</sup> клеток присутствовало в культурах липосарком: 1,1% и 0,1% соответственно. Относительное содержание ALDH1<sup>+</sup> клеток в культурах СМТ и ОС характеризовалось вариабельностью с медианным значением 8% (min 0,3% – max 52,5%). Наибольшее количество позитивных по этому маркеру клеток выявлено в культурах СМТ с медианой 12,2% (min 1,1% – max 52,5%), для ОС этот показатель был ниже – 3,5% (min 0,3% – max 7,5%) ( $p=0,03$ ) (рис. 29 А). По содержанию CD133-позитивных клеток культуры сарком также демонстрировали гетерогенность. Медианное значение маркера составило 2,1% (min 0,1% – max 10,8%).



Наибольшее количество CD133+ клеток было обнаружено в культурах ОС: 4,8% (min 1,3% – max 10,2%). Для культур СМТ медиана составила 1,9% (min 0,1% – max 10,8%) ( $p=0,05$ ) (рис. 29 Б).

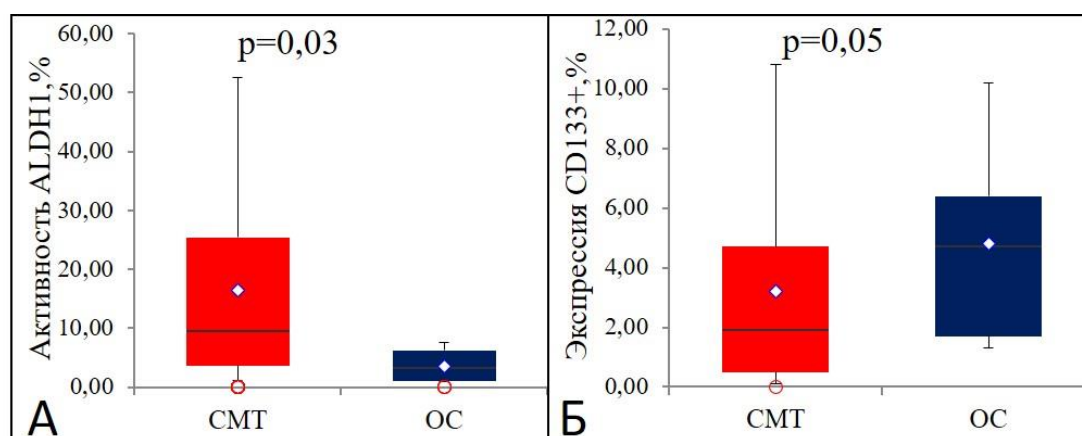


Рисунок 29 – Сравнительный анализ экспрессии маркеров СКО:

А – ALDH1; Б – CD133 в культурах клеток СМТ и ОС

Активность ALDH1 в группе клоногенных сарком была выше, чем в группе неклоногенных ( $p=0,02$ ) (рис. 30 А). Медианное значение экспрессии ALDH1 в этой группе составило – 20,3% (min 1,4% – max 52,5%), в группе неклоногенных опухолей – 5,0% (min 1,1% – max 23,2%). При этом нами не было обнаружено взаимосвязи между содержанием стволовых опухолевых клеток с экспрессией CD133+ и клоногенным потенциалом опухолевых культур ( $p=0,3$ ) (рис. 30 Б). На рисунке 30 В представлен пример высокой экспрессии маркера ALDH1 в клоногенной культуре лейомиосаркомы #735. Пример высокой экспрессии маркера CD133 в клоногенной культуре остеогенной саркомы #921 представлен на рисунке 30 Г.

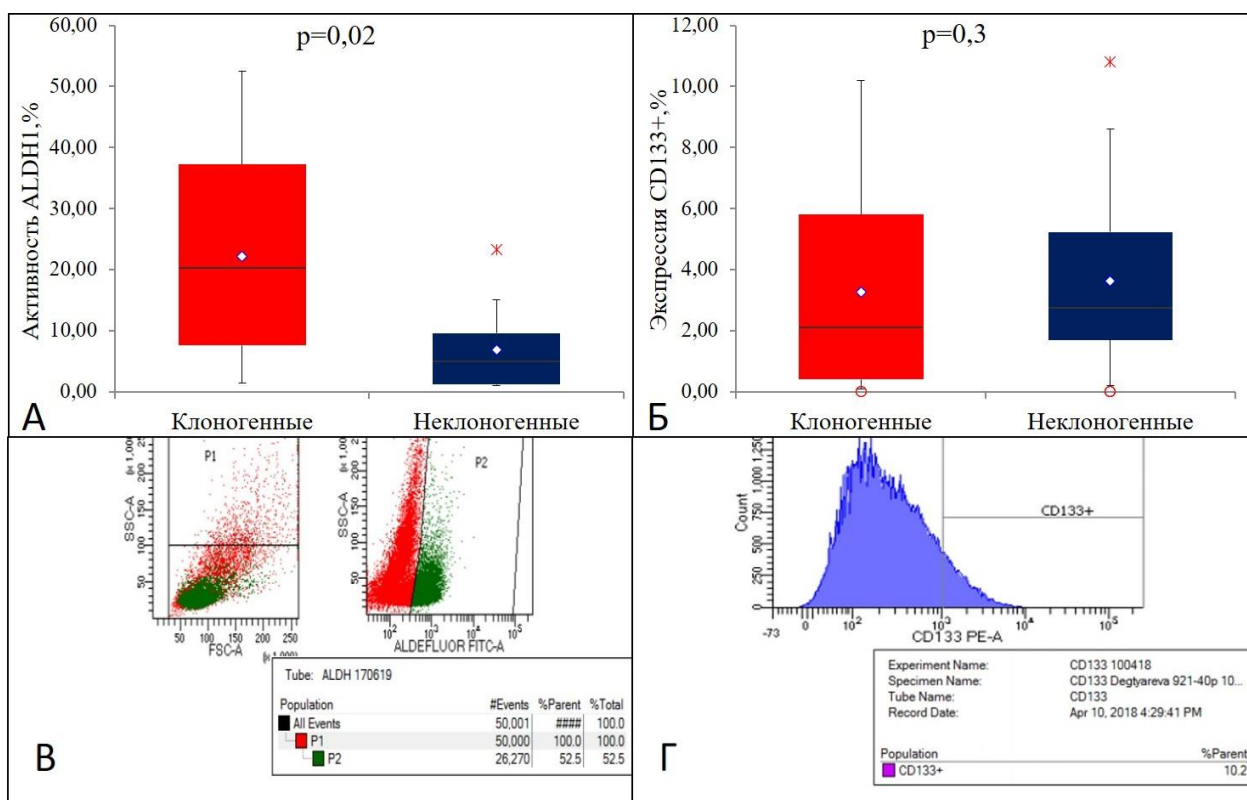


Рисунок 30 – Графическое изображение различия в экспрессии маркерных молекул стволовых опухолевых клеток: А – ALDH1; Б – CD133 – в культурах клоногенных и неклоногенных сарком; В – пример высокой экспрессии маркера ALDH1 в клоногенной культуре лейомиосаркомы #735, 18 пассаж; Г – пример высокой экспрессии маркера CD133 в клоногенной культуре остеогенной саркомы #921, 40 пассаж  
(Проточный цитофлуориметр BD FACS Canto™ II, BD Biosciences, США)

### 3.2.4. Изучение экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях сарком

#### 3.2.4.1. Частота встречаемости и уровень транскрипционной активности раково-тестикулярных генов в исходных клеточных линиях сарком мягких тканей и остеогенных сарком

В культурах клеток СМТ и ОС отмечена высокая степень гетерогенности транскрипционной активности изучаемых РТГ: min 0,0001 – max 8,57. Отсутствие активности исследуемых генов отмечено в 18,9% СМТ (7/37) и в 20,0% ОС (3/15) (табл. 8).

Таблица 8 – Экспрессия РТГ в культивируемых клетках СМТ и ОС

Частота встречаемости экспрессии РТГ						
РТГ	Частота детекции, %		Коэффициент сопряженности Пирсона	Критерий $\chi^2$	Точный критерий Фишера	p-value
	СМТ	ОС				
1	2	3	4	5	6	7
<i>PRAME</i>	51,4 (19/37)	66,7 (10/15)	0,1	1,0	0,4	0,3
<i>GAGE</i>	45,9 (17/37)	60,0 (9/15)	0,1	0,8	0,5	0,4
<i>SLLP1</i>	27,0 (10/37)	53,3 (8/15)	0,2	3,3	0,1	0,07
<i>PASDI</i>	29,7 (11/37)	33,3 (5/15)	0,03	0,06	1	0,8
<i>SSX1</i>	21,6 (8/37)	33,3 (5/15)	0,1	0,8	0,5	0,4
<i>MAGEA1</i>	18,9 (7/37)	13,3 (2/15)	0,07	0,2	1	0,6
<i>NY-ESO1</i>	16,2 (6/38)	6,7 (1/15)	0,1	0,8	0,7	0,4
<i>SPANXA1</i>	5,4 (2/37)	13,3 (2/15)	0,1	0,9	0,6	0,3
<i>HAGE</i>	8,1 (3/37)	0 (0/15)	0,2	1,3	0,5	0,3
<i>SCP1</i>	0 (0/37)	6,7 (1/15)	0,2	2,5	0,3	0,1
Количественное сравнение уровня экспрессии РТГ						
РТГ	Медиана (min-max)		U-Тест Манна–Уитни			
	СМТ	ОС	$U_{\text{эмп}}$	p-value		
<i>GAGE</i>	0 (0–8,6)	0,04 (0–5,1)	254	0,5		
<i>NY-ESO1</i>	0 (0–4,6)	0 (0–3,4)	253	0,4		
<i>MAGEA1</i>	0 (0–4)	0 (0–3,4)	266	0,4		
<i>PASDI</i>	0 (0–3,6)	0 (0–1,2)	270	0,5		
<i>SLLP1</i>	0 (0–3,6)	0 (0–8)	193	0,08		
<i>SSX1</i>	0 (0–0,9)	0 (0–0,2)	244,5	0,3		
<i>PRAME</i>	0,2 (0–5,6)	16,8 (0–3,2)	272	0,4		

В группе культур клеток СМТ чаще детектировали активность генов *PRAME* 51,4% (19/37) и *GAGE1* 45,9% (17/37). В группе ОС экспрессию *PRAME* выявляли в 66,7% (10/15) случаев и *GAGE1* – 60,0% (9/15). При этом в культурах СМТ и ОС обнаружена коэкспрессия этих генов ( $\rho=0,5025$ ;  $p=0,00015$ ). Ген *SLLP1* чаще детектировали в культивируемых клетках ОС – 53,3% (8/15), чем в СМТ – 27,0% (10/37). Активность генов *PASDI* и *SSX1* была продемонстрирована с сопоставимой частотой: 29,7% (11/37) и 21,6% (8/37) – для культур СМТ, 33,3% (5/15) и 33,3% (5/15) – для культур ОС соответственно. Экспрессия *PASDI* коррелировала как с *GAGE1* ( $\rho=0,6951$ ;  $p=0,00001$ ), так и с *PRAME* ( $\rho=0,5743$ ;  $p=0,00001$ ). Реже отмечали транскрипционную активность *NY-ESO-1* и *MAGE A1*: 16,2% (6/37) и 18,9% (7/37) – для культур СМТ, 6,7% (1/15) и 13,3% (2/15) – для культур ОС соответственно. Обнаружена коэкспрессия этих генов ( $\rho=0,4027$ ;  $p=0,00308$ ) в культурах сарком. В двух образцах культивируемых клеток СМТ и двух образцах ОС обнаружили

экспрессию гена *SPANXA1* (5,4% и 13,3% соответственно). Транскрипционная активность гена *SCPI* детектирована в единственном образце клеток ОС (6,7%) и отсутствовала в клетках СМТ. Напротив, экспрессию *HAGE* обнаружили в трех культурах СМТ (8,1%) и ни в одной – ОС. Экспрессия гена *SEMG1* не была зарегистрирована.

Среди СМТ наибольшую транскрипционную активность гена *GAGE1* продемонстрировали клетки миксофибросарком 71,4% (5/7), медиана 4,0 (min 0 – max 5,43). В клетках синовиальных сарком была выявлена максимальная экспрессия гена *PRAME*: 63,6% (7/11), медиана 0,07 (min 0; max 4,48). Клетки рабдомиосарком характеризовались минимальным набором активных РТГ: наблюдали полное отсутствие экспрессии *GAGE1*, *PRAME*, в одном случае обнаружены низкие значения экспрессии гена *SLLP1* (0,007) и в одном случае – гена *SSX1* (0,004). Среди клеток ОС большую транскрипционную активность РТГ демонстрировали клетки опухолей костного происхождения. В остеосаркомах чаще детектировали гены *PRAME* 72,7% (8/11), медиана 0,34 (min 0; max 2,31) и *GAGE1* 63,6% (7/11), медиана 0,94 (min 0; max 4,82). Отсутствие экспрессии изучаемых генов детектировали в 19,2% случаев (10/52).

Детектируемые уровни гена *PRAME* были обнаружены в 59,6% (31/52), в 51,9% случаев экспрессировался *GAGE1* (27/52), *SLLP1* выявлен в 34,6% культур (18/52), *PASD1* – в 32,7% (17/52). Реже определялись такие гены, как *SSX1* – 25% (13/52), *MAGEA1* – 19,2% (10/52), *NY-ESO-1* – 17,3% (9/52). В 4 культурах сарком была обнаружена экспрессия гена *SPANXA1* (7,7%), в 3 – *HAGE1* (5,8%), в одном случае – *SCPI* (1,9%) и ни в одном случае – *SEMG1* (0/52).

Мы провели кластерный анализ, исключив 3 РТГ (*HAGE*, *SEMG1* и *SCPI*) в связи с их низкой активностью в опухолевых культурах сарком (рис. 31). При анализе экспрессии РТГ в культурах сарком на ранних пассажах выявлено 3 кластера. В первом кластере объединены культуры с высоким уровнем экспрессии генов *GAGE1*, *PRAME* и наличием активности гена *PASD1* (миксофибросаркомы, синовиальные саркомы, лейомиосаркомы). Второй, наиболее обширный кластер, составили культуры с низкой и неопределяемой активностью исследуемых генов, куда вошло большинство культур ОС. В третий были объединены три опухолевых культуры с высоким уровнем экспрессии гена *SLLP1* (2 остеосаркомы и миксофибросаркома).

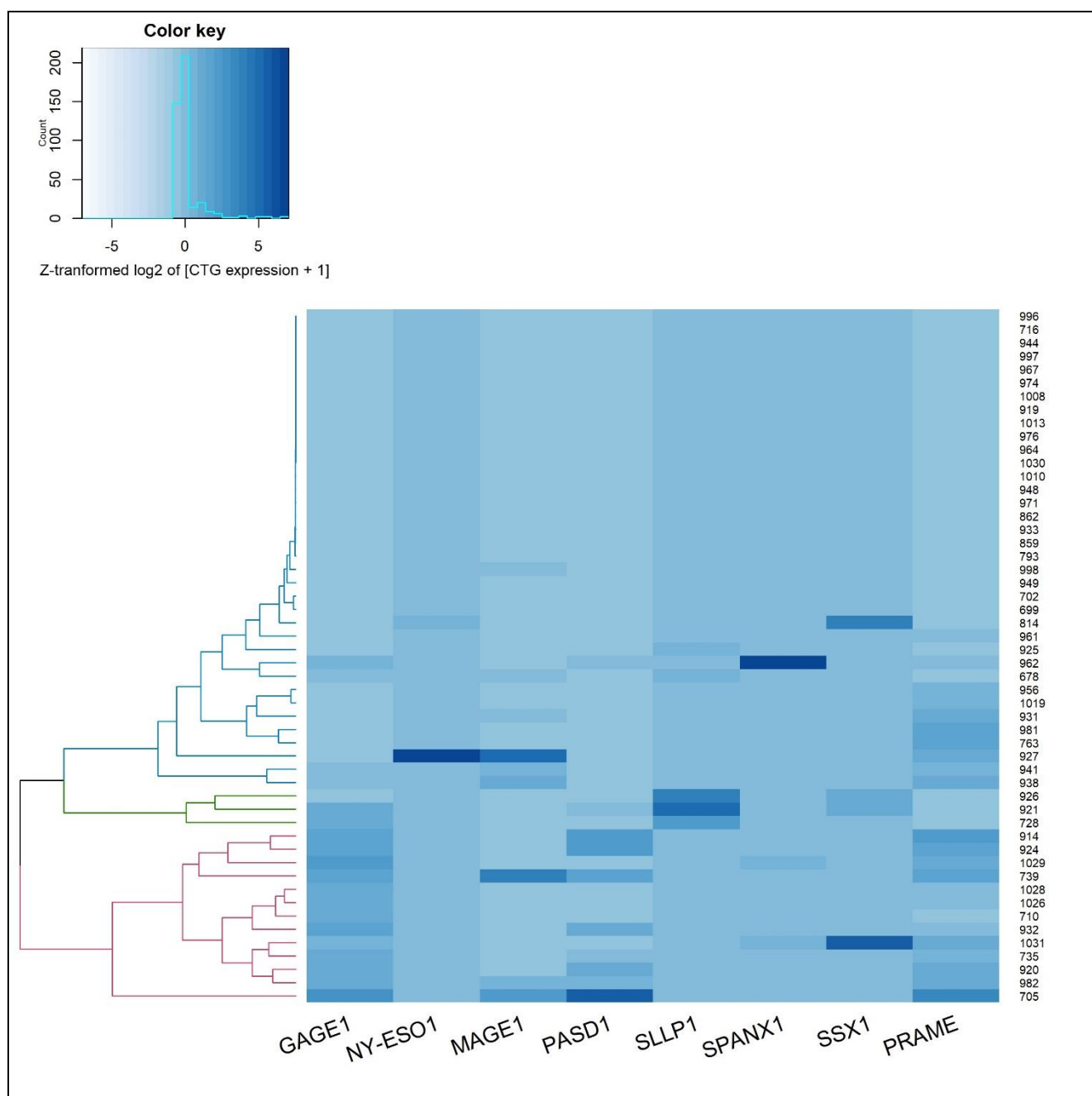


Рисунок 31 – Результаты кластеризации экспрессии РТГ в культурах клеток СМТ и ОС на ранних этапах культивирования

### 3.2.4.2. Изменение экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях сарком в процессе длительного культивирования и при клонировании

Были обнаружены различия по уровню экспрессии гена *GAGE1* в группах клоногенных и неклоногенных сарком ( $p=0,03$ ) (рис. 32 А). Медианное значение величины транскрипционной активности гена составило 1,06 (min 0; max 8,57) и 0 (min 0; max 7,28) соответственно. Также выявлены различия по экспрессии *SLLP1* ( $p=0,04$ ) (рис. 32 Б).

Для других РТГ (*NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*) подобных закономерностей не установлено. Участие этих генов в эволюционных процессах сарком требует дальнейшего изучения.

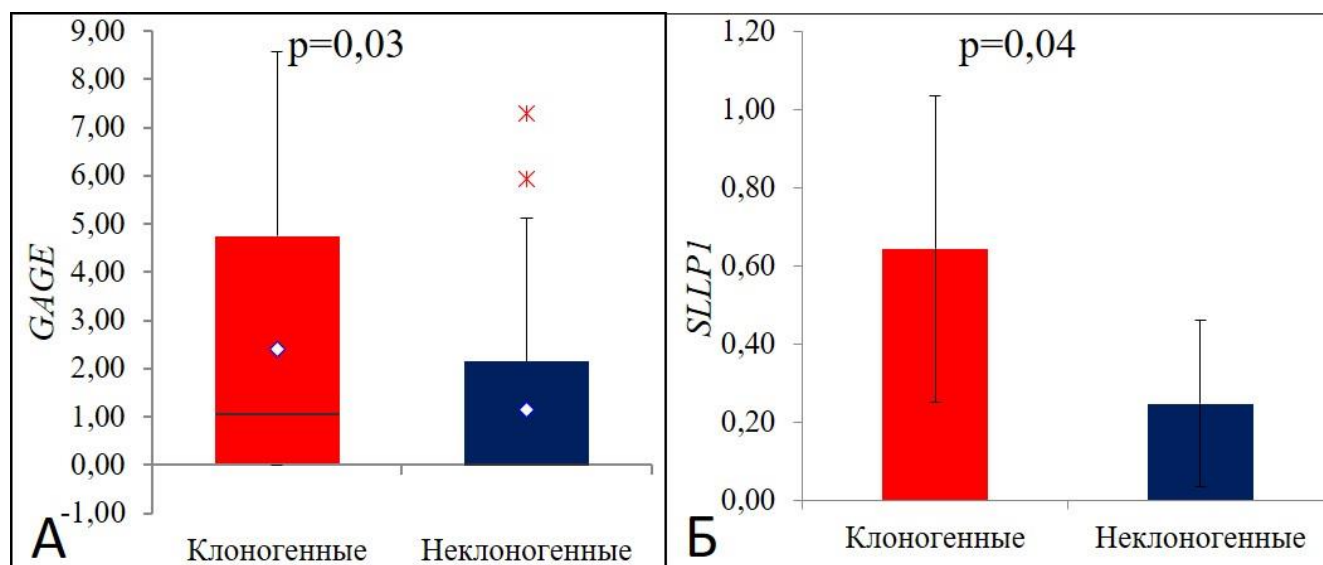


Рисунок 32 – Анализ экспрессии РТГ в клоногенных и неклоногенных культурах СМТ и ОС:

А – по уровню экспрессии гена *GAGE1*; Б – по уровню экспрессии гена *SLLP1*

Было обнаружено, что в процессе длительного культивирования экспрессия РТГ менялась различно: в одних культурах отмечали рост показателей и увеличение репертуара экспрессируемых РТГ, в других – снижение до полного исчезновения. Клоны демонстрировали большее разнообразие уровней экспрессии РТГ по сравнению с исходными культурами.

Увеличение мощности исследования с включением в кластерный анализ клонов подтвердило выявленные закономерности. Проведенный кластерный анализ экспрессии РТГ всех проанализированных образцов клеточных культур выявил 3 кластера (рис. 33).

В первом кластере объединены клеточные линии с низким и средним уровнем транскрипционной активности, а также с отсутствием экспрессии изучаемых генов. При этом отчетливо выделяется верхняя часть кластера, в которой представлены клоны с коэкспрессией генов *PRAME* и *GAGE1*, тогда как в нижней его части оказались в основном неклоногенные образцы. Второй кластер составили клеточные линии с высоким уровнем экспрессии *GAGE1* и его коэкспрессией с генами *PASD1* и *PRAME*. В этой группе оказалось максимальное количество клонов сарком. В третьем кластере преобладали клоногенные культуры и клоны с высоким уровнем транскрипционной активности *SLLP1* в сочетании с *GAGE1*.

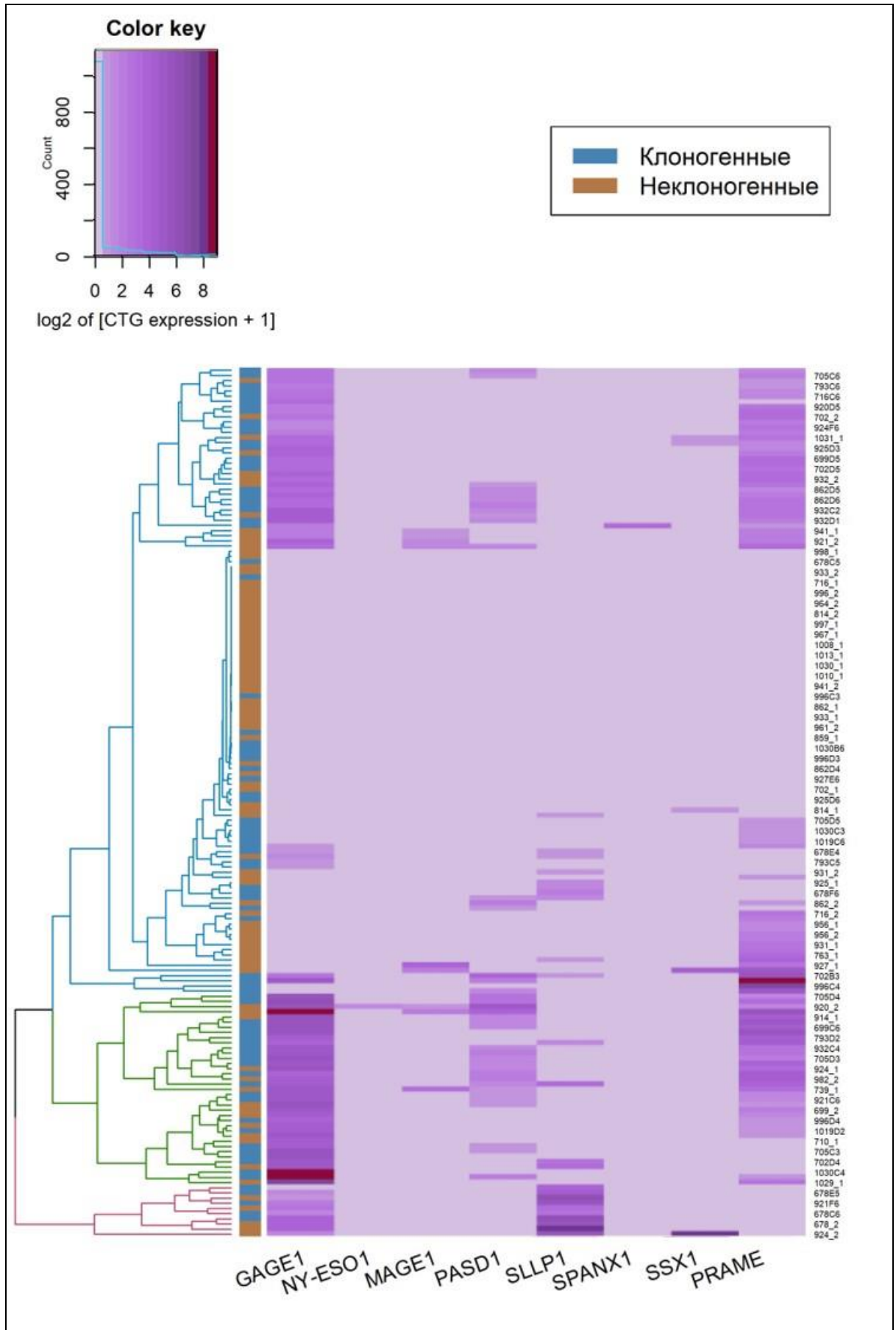


Рисунок 33 – Тепловая карта различий экспрессии РТГ в клеточных линиях СМТ и ОС и их клонах

### 3.2.5. Анализ химиорезистентности культур сарком и их клонов

Несомненный практический интерес в изучении биологии злокачественных новообразований представляет изучение чувствительности опухолеиницирующих клеток к проводимому лечению, в том числе химиотерапевтическому. Тем более что в конечном счете целью терапевтического воздействия являются именно клетки, способные к изолированному росту. Именно они восстанавливают опухолевую популяцию после хирургических вмешательств и отвечают за метастазирование. Нашей задачей было сравнение химиорезистентности опухолевых культур и их клонов, полученных методом предельного разведения, к композициям, используемым в клинике в МТТ-тесте с последующей спектрофотометрией и с использованием клеточного анализатора xCelligence. Обнаружено, что опухоли с высоким клоногенным потенциалом отличались высокой резистентностью к стандартным (терапевтическим) дозировкам химиопрепаратов (табл. 9).

Таблица 9 – Динамика химиорезистентности клеток СМТ и ОС по отношению к стандартным дозировкам химиопрепаратов в процессе длительного культивирования и при клонировании

Культуры клеток СМТ					
# культуры	Гистотип саркомы	AI		GemTax	
		культура <10п/ культура >15п/ клоны 5п			
678	миксофибро-саркома	61,2/72,2/97,1*		100/100/100	
982		77,6/97,5/100		100/100/100	
920		70,5/74,3/89,1		100/100/100	
924		29,9/46,9/100		100/97,9/99	
1019	синовиальная саркома	57,5/62,9/66,7		100/100/100	
716		51,1/50,9/61		100/100/100	
699	лейомиосаркома	62,2/76,4/88,5		100/99,4/100	
862	рабдомиосаркома	29/43,1/71,9		37,3/42,9/56,8	
927	альвеолярная саркома	53,6/64,7/86,1		100/100/100	
932	светлоклеточная саркома	24,2/33,7/50,7		100/100/100	
702	липосаркома	61,7/67,6/95,8		41,6/48,7/70,4	
Культуры клеток ОС					
		Ифосфамид	Доксорубин	Цисплатин	Этопозид
		культура <10 пассажей / культура >15 пассажей / клоны 5 пассажей			
996	остеогенная саркома	100/100/100	40,2/48,3/63	100/100/100	100/100/100
921		99/100/99,1	37,4/59,3/71,1	100/100/100	50,6/61,7/71,7
793		100/100/100	100/100/100	100/100/100	100/100/100
1030		100/100/100	100/100/100	100/100/100	100/100/100
1056		100/100/100	100/100/100	100/100/100	100/100/100
925	хондросаркома	100/100/100	50,4/57,5/78	100/100/100	58,3/70,8/74,6

\* – указан процент жизнеспособных клеток.



Так, среди культивируемых клеток СМТ чувствительность к стандартным дозировкам комбинации Доксорубина и Ифосфамида (схема AI) продемонстрировали всего 27,3% культур (3/11), к стандартным дозировкам комбинации Гемцитабина и Доцетаксела (схема GemTax) – 18,2% (2/11). В ряде случаев опухолевые клетки были резистентными и к дозировкам препаратов, десятикратно превосходящим терапевтические (рис. 34).

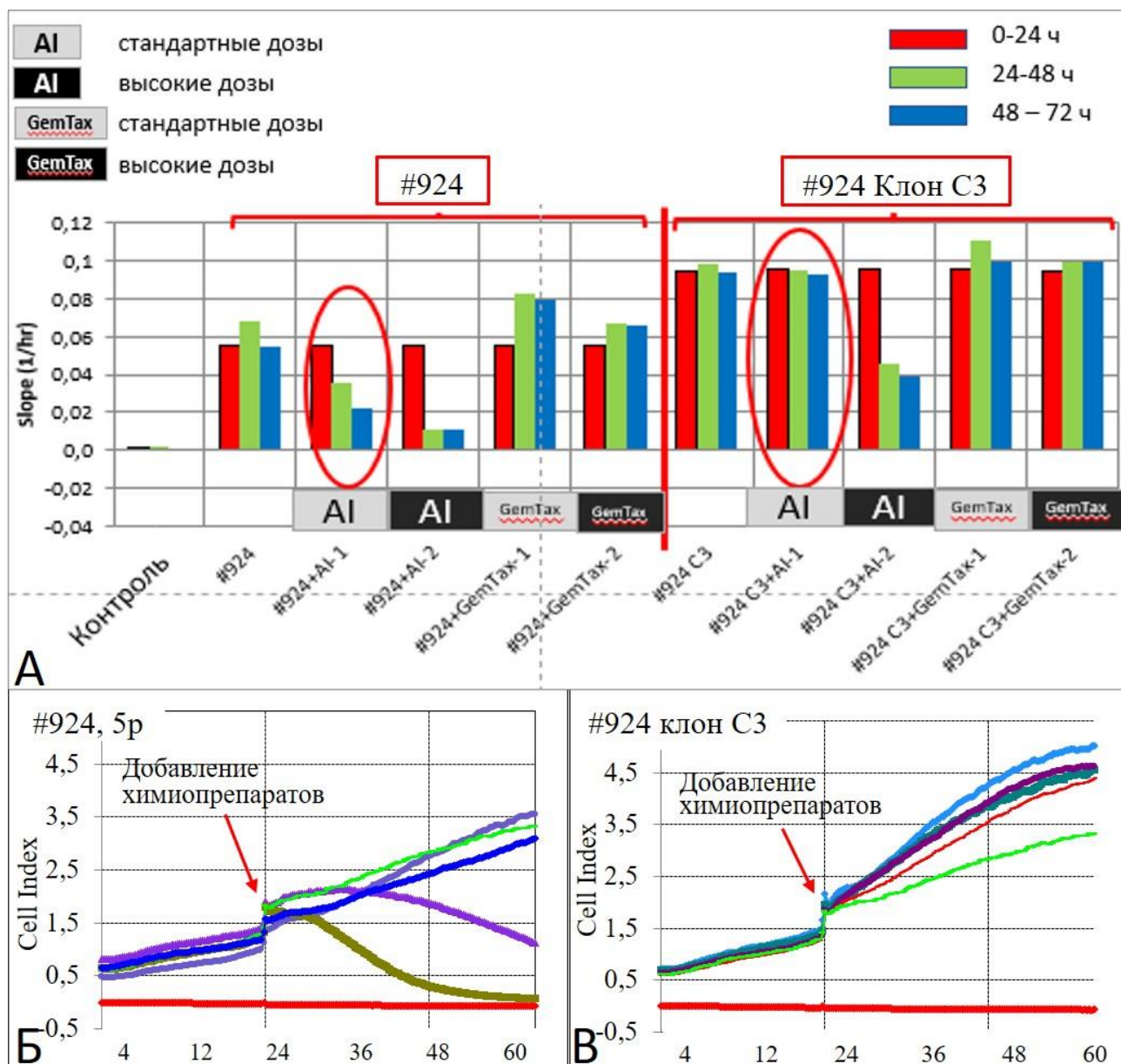


Рисунок 34 – Проллиферативная активность клеточной линии миксофибросаркомы #924 (А, Б) на 5-ом пассаже и ее клона #924 С3 (А, В) в присутствии композиций AI (Доксорубин+Ифосфамид) и GemTax (Гемцитабин+Доцетаксел). Внесение химиотерапевтических агентов в систему показано стрелкой. Серым цветом обозначено воздействие химиотерапевтических композиций AI и GemTax в стандартных дозах (эквивалентных терапевтическим), черным цветом – высокие дозы химиопрепаратов AI и GemTax (10-кратно превышающие терапевтические)

Например, клеточная линия миксофибросаркомы #924 продемонстрировала чувствительность к стандартным дозам препаратов схемы АI и 100% гибель к высоким дозам химиопрепаратов этой схемы (см. рис. 34 А, Б). Однако ее клон #924С3 оказался резистентным ко всем использованным дозам (см. рис. 34 А, В). При этом к комбинации препаратов схемы GemTax клеточная линия #924 и ее клон оказались резистентными как к стандартной, так и к десятикратно превышающей терапевтическую дозу, показывая даже ускорение пролиферативной активности по сравнению с контролем при добавлении стандартной дозировки GemTax.

Две из 11 культур клоногенных СМТ были резистентны по отношению к высоким дозировкам в группе АI (18,2%). Все 9 культур СМТ, не проявивших чувствительность к стандартным дозировкам схемы GemTax, были резистентными и к высоким дозам препаратов этой схемы (81,8%).

Все культивируемые клетки ОС оказались резистентными к терапевтическим концентрациям Ифосфамида, Цисплатина и Этопозида. К лечебной дозировке Доксорубицина чувствительны были две из шести культур (33,3%).

Культуры #793, #1030 и #1056 остеогенных сарком оказались также резистентны к дозировкам Ифосфамида и Цисплатина, десятикратно превосходящим терапевтические. К Доксорубину и Этопозиду в таких концентрациях были чувствительны 83,3% и 66,6% опухолевых культур (5/6 и 4/6 соответственно).

В процессе длительного культивирования происходило снижение чувствительности клеток к химиопрепаратам во всех исследуемых группах ( $p < 0,05$ ). Клоны демонстрировали большую лекарственную устойчивость по сравнению с исходными культурами (рис. 35).

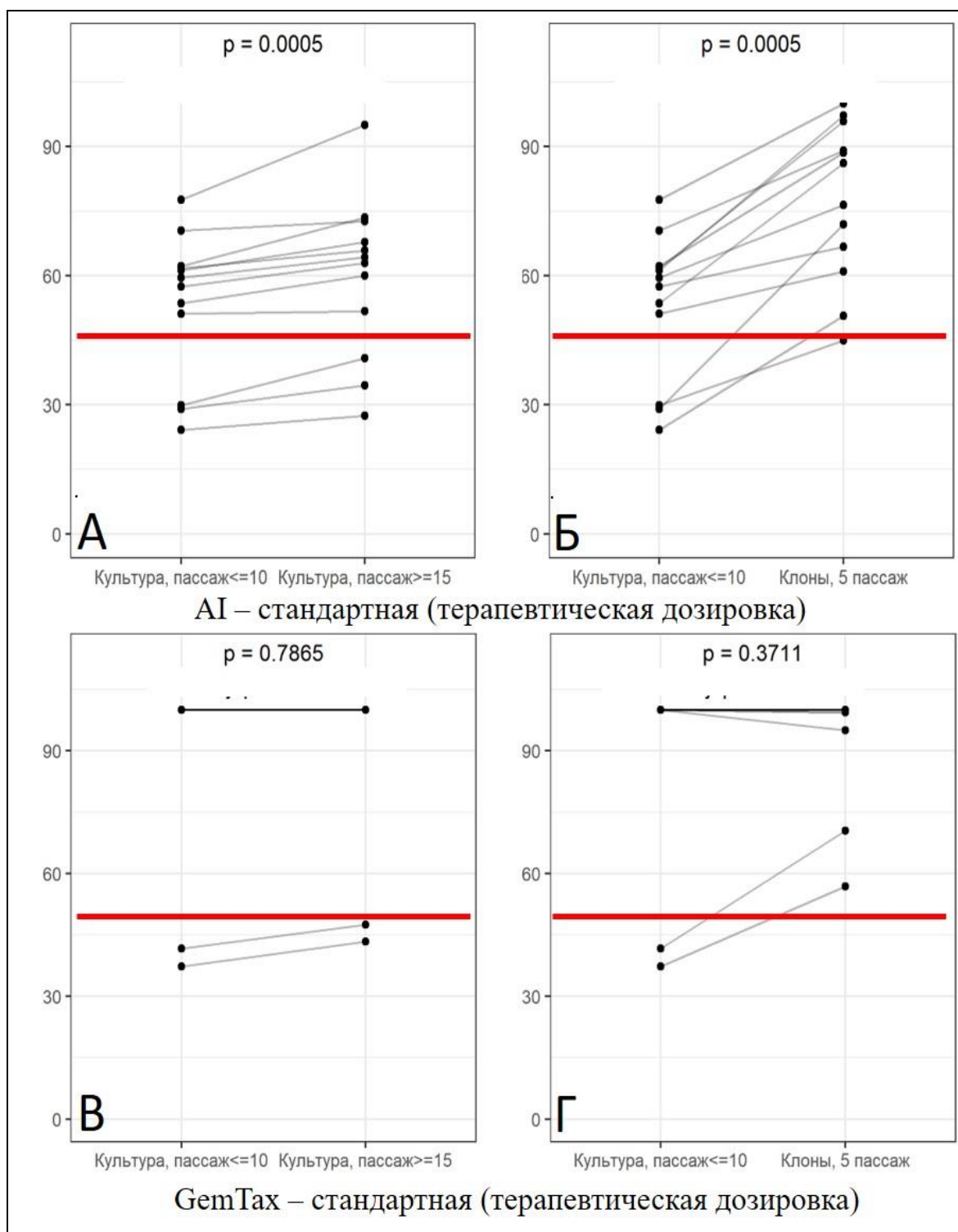


Рисунок 35 – Изменение химиорезистентности клеток сарком в процессе длительного культивирования и при клонировании при использовании различных химиотерапевтических схем в стандартных дозировках:

- А – Доксорубицин+Ифосфамид (AI) в процессе культивирования;  
 Б – Доксорубицин+Ифосфамид (AI) при клонировании; В – Гемцитабин+Доцетаксел (GemTах) в процессе культивирования; Г – Гемцитабин+Доцетаксел (GemTах) при клонировании

### 3.3. Анализ взаимосвязи между клоногенностью клеточных культур и клиническими характеристиками пациентов

В таблице 10 представлены клинические характеристики пациентов, клеточные линии из опухолей которых различались по клоногенности.

Таблица 10 – Клинические характеристики пациентов, клеточные линии из опухолей которых различались по клоногенности

Характеристика		Клоногенные клеточные линии (n=22)		Неклоногенные клеточные линии (n=34)	
		n	%	n	%
Стадия	IV	22/22	100,0	34/34	100,0
Пол	мужчины	12/22	54,5	18/34	46,9
	женщины	10/22	45,5	16/34	53,1
Средний возраст (годы)		38,1 [95% ДИ 29,9–46,3]		37,2 [95% ДИ 31,6–42,8]	
Линий химиотерапии получено	0	2/22	9,1	1/34	2,9
	1	3/22	13,8	8/34	23,5
	2	5/22	22,7	18/34	52,9
	3+	12/22	54,5	7/34	20,6
Локализация первичного очага	конечность	15/22	68,2	23/34	67,6
	другая	7/22	31,8	11/34	32,4

Группы оказались сопоставимыми по полу и возрасту. Чаще определялась IV стадия заболевания. В группе с клоногенными клеточными линиями в большем проценте случаев (54,5%) пациентам проведено более трех линий лекарственного лечения. В группе с неклоногенными клеточными линиями максимальное число пациентов (52,9%) получили 2 линии химиотерапии.

При анализе времени до прогрессирования у пациентов с СМТ и ОС, из образцов опухоли которых были получены клоногенные и неклоногенные клеточные линии (группа 1 и группа 2 соответственно), статистически значимые различия не обнаружены,  $p=0,3$  (рис. 36 А). Однако у пациентов этих групп выявлены значимые различия в показателях общей выживаемости,  $p=0,008$  (рис. 36 Б). В группе с клонируемыми клеточными линиями медиана общей выживаемости (ОВ) составила 9 мес., в группе с неклонируемыми клеточными линиями – 27,3 мес.



через 2 мес от начала лечения зарегистрировано у 87,5% (7/8) пациентов 1-й группы и у 43,8% (7/16) пациентов 2-й группы (таб. 11). Отмечается статистически значимая связь между фактором риска (клоногенностью) и прогрессированием заболевания: Хи-квадрат Пирсона составил 4,2 ( $p = 0,04$ ) (табл. 11).

Таблица 11 – Сравнительная оценка клинической эффективности иммунотерапии в группах с клоногенными и неклоногенными клеточными линиями

RECIST	Клоногенные, n=8	Неклоногенные, n=16
Полный регресс	0	0
Частичный регресс	0	0
Стабилизация заболевания, % (n)	12,5 (1/8)	56,3 (9/16)
Прогрессирование заболевания, % (n)	87,5 (7/8)	43,8 (7/16)

Медиана времени до прогрессирования у пациентов 1-й группы составила 2,5 мес., в группе 2 – 6,7 мес. ( $p=0,3$ ) (рис. 37 А). Медиана ОБ в группе с клоногенными клеточными линиями составила 6,4 мес., против 28,3 мес. в группе с неклоногенными клеточными линиями ( $p=0,046$ ) (рис. 37 Б).

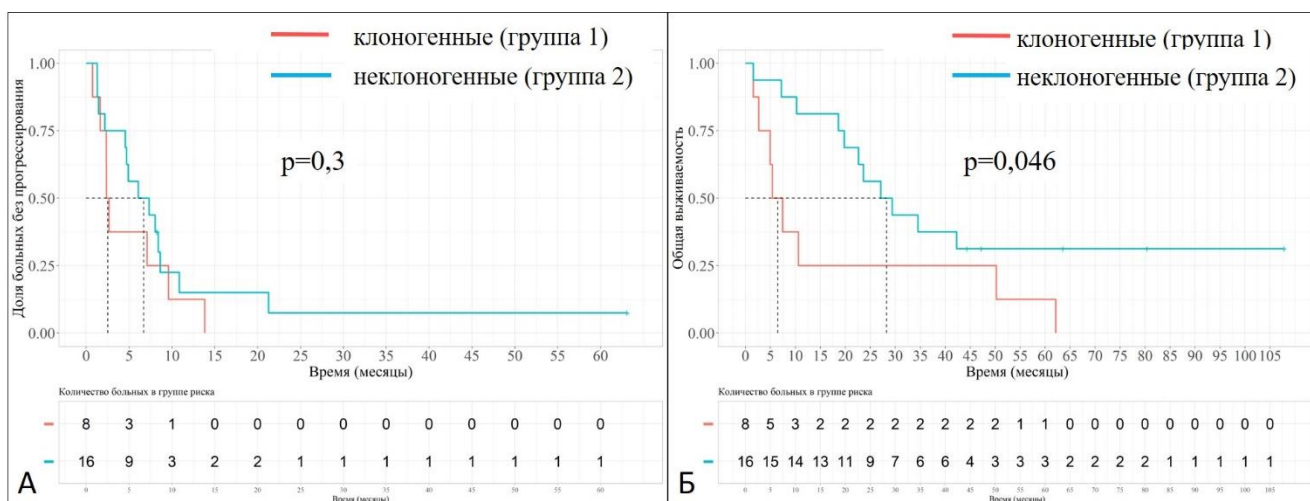


Рисунок 37 – Анализ времени до прогрессирования (А) и общей выживаемости (Б) у пациентов, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в группе 1 и группе 2 (клоногенные и неклоногенные клеточные линии)

**3.5. Анализ субпопуляций иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных с саркомами, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в зависимости от клоногенных характеристик в группах 1 и 2**

При анализе субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных, клеточные линии которых отличались клоногенностью (группа 1), было обнаружено содержание абсолютного и относительного числа: ЦТЛ ( $p < 0,05$ ) (рис. 38 А, Б); активированных ЦТЛ с фенотипом  $CD3+CD8+HLA-DR+$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 38 В, Г); активированных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3+CD8+HLA-DR+$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 38 Д, Е) и увеличенное количество естественных киллеров (НК-клеток) ( $p < 0,05$ ) по сравнению с пациентами группы 2 (неклоногенные клеточные линии) (рис. 38 Ж, З).

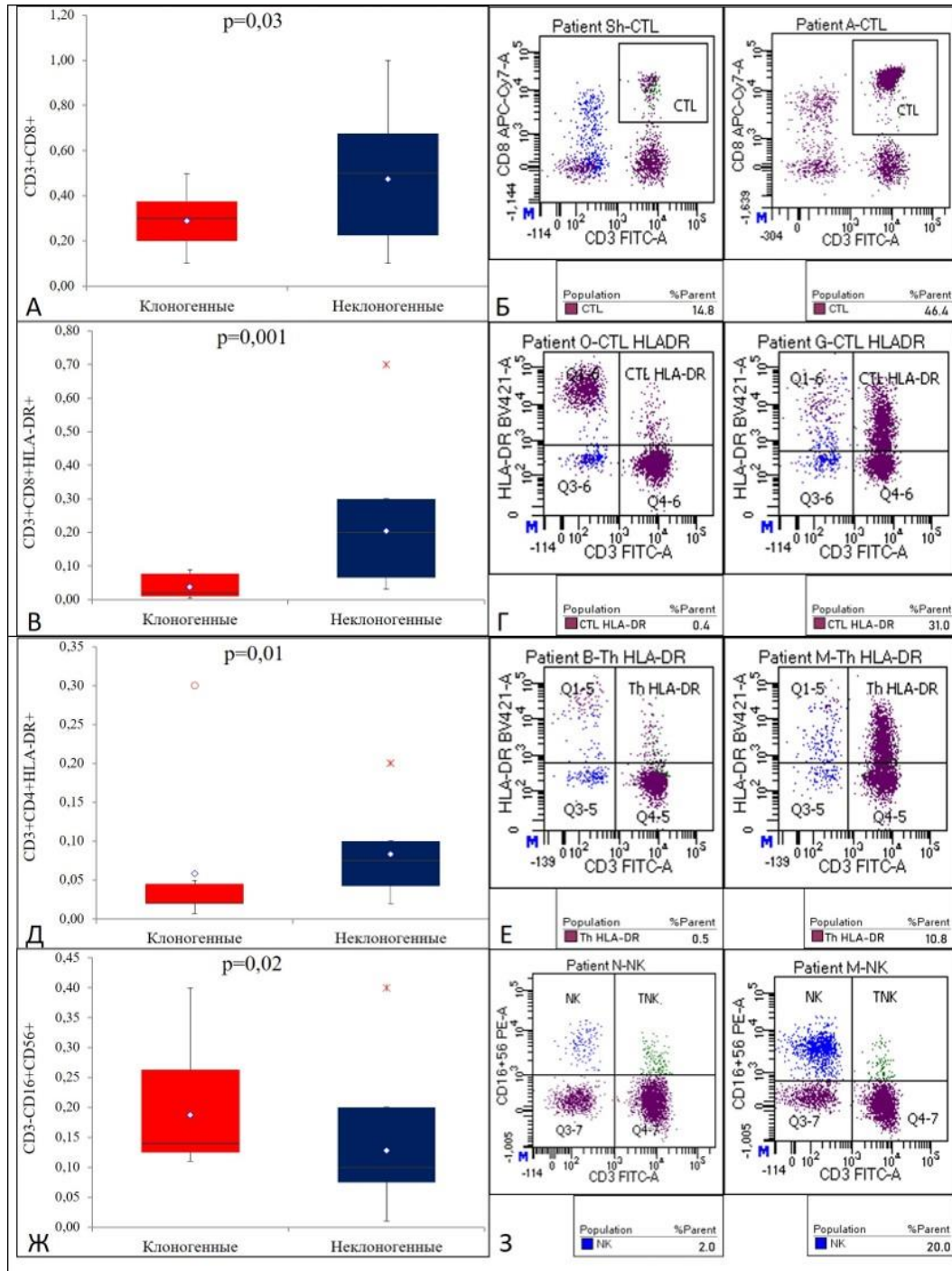


Рисунок 38 – Анализ содержания иммунокомпетентных клеток в периферической крови пациентов с клоногенными и неклоногенными саркомами: активированных Т-лимфоцитов А – различия уровней ЦТЛ; Б – пример min в группе 1 и max в группе 2 уровней ЦТЛ; В – различия в сравниваемых группах по активированным ЦТЛ; Г – пример min в группе 1 и max в группе 2 уровней активированных ЦТЛ; Д – различия уровней активированных Т-лимфоцитов хелперов; Е – пример min в группе 1 и max в группе 2 уровней активированных Т-лимфоцитов хелперов; Ж – различия в сравниваемых группах по НК-клеткам; З – пример min в группе 2 и max в группе 1 уровней НК. Проточный цитометр BD FACS Canto™ II



Также оценивали относительные и абсолютные значения следующих иммунологических показателей периферической крови: содержание В-лимфоцитов (CD3-CD19+), Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), Т-хелперов (CD3+CD4+), регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25brightCD127+), и НКТ-подобных лимфоцитов (CD3+CD16+CD56+).

Пациенты 1-й группы отличались от пациентов 2-й группы сниженным содержанием ЦТЛ и активированных форм ЦТЛ и Т-хелперов, что может свидетельствовать об истощении популяции этих клеток, вызванном высокой гетерогенностью опухоли, в том числе по уровню экспрессии РТГ. Высокое содержание естественных киллеров может отражать снижение экспрессии молекул HLA I класса опухолевыми клетками, что закономерно приводит к уклонению опухоли от Т-клеточного иммунологического надзора и способствует прогрессированию заболевания. По другим исследованным параметрам различия обнаружены не были (табл. 12).

Таблица 12 – Показатели субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток в крови пациентов с клоногенными и неклоногенными саркомами

Характеристика	Количественное значение медиана (min–max)		Тест Манна– Уитни, р
	Клоногенные	Неклоногенные	
В-лимфоциты CD3-CD19+, *10 <sup>9</sup> /л	0,09 (0,004-0,3)	0,1 (0,002-0,5)	0,3
В-лимфоциты CD3-CD19+,%	7,5 (0,4-19,8)	7,8 (0,5-22,5)	0,3
Т-лимфоциты CD3+CD19-, *10 <sup>9</sup> /л	0,9 (0,3-1,4)	1,1 (0,3-1,8)	0,2
Т-лимфоциты CD3+CD19-,%	75,5 (54,1-83)	76,8 (54-87)	0,2
ЦТЛ CD3+CD8+, *10 <sup>9</sup> /л	0,3 (0,1-0,5)	0,5 (0,1-1)	<b>0,03</b>
ЦТЛ CD3+CD8+,%	23,5 (14,8-37)	32,3 (24-46,4)	<b>0,003</b>
Активированные ЦТЛ CD3+CD8+HLA-DR+, *10 <sup>9</sup> /л	0,02 (0,009-0,09)	0,2 (0,03-0,7)	<b>0,001</b>
Активированные ЦТЛ CD3+CD8+HLA-DR+,%	2,7 (0,4-7,7)	11 (4,1-31)	<b>0,0002</b>
Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+, *10 <sup>9</sup> /л	0,6 (0,1-0,8)	0,6 (0,2-0,9)	0,5
Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+%	44 (30,5-49)	39,4 (29,5-48,5)	0,1
Активированные Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+HLA-DR+, *10 <sup>9</sup> /л	0,02 (0,007-0,3)	0,08 (0,02-0,2)	<b>0,01</b>
Активированные Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+HLA-DR+,%	2,2 (0,5-16,1)	5,4 (3,3-10,8)	<b>0,01</b>
Регуляторные Т-лимфоциты	0,04 (0,02-0,07)	0,05 (0,02-0,1)	0,3

CD4+CD25brightCD127+,*10 <sup>9</sup> /л			
Регуляторные Т-лимфоциты CD4+CD25brightCD127+,%	8,2 (5,8-13)	8,8 (5,2-14,9)	0,3
НКТ-клетки, НКТ-подобные лимфоциты CD3+CD16+CD56+,*10 <sup>9</sup> /л	0,07 (0,01-0,1)	0,04 (0,002-0,2)	0,4
НКТ-клетки, НКТ-подобные лимфоциты CD3+CD16+CD56+,%	5,4 (1,1-11,6)	5 (0,3-14,7)	0,4
Естественные киллеры НК-клетки CD3- CD16+CD56+,*10 <sup>9</sup> /л	0,1 (0,1-0,4)	0,1 (0,01-0,4)	<b>0,02</b>
Естественные киллеры НК-клетки CD3- CD16+CD56+,%	13,5 (9,5-20)	8,3 (2-16,6)	<b>0,03</b>

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Создание коллекции клеточных культур сарком мягких тканей и остеогенных сарком

Клетки культуры ткани являются важными инструментами как для изучения фундаментальных процессов, таких как механизмы туморогенеза и опухолевой прогрессии, так и для решения клинических задач: поиска новых таргетных молекул, проведения доклинических исследований новых лекарственных противоопухолевых препаратов и их комбинаций. При этом в мировых клеточных коллекциях представлено лишь ограниченное число хорошо охарактеризованных линий сарком. Кроме того, необходимо учитывать постоянное совершенствование гистологической и иммуногистохимической диагностики опухолей и изменения, которые претерпевает классификация опухолей ВОЗ от издания к изданию, появление новых нозологических единиц, как в рамках прежних рубрик, так и во вновь введенных [90]. Так, биобанки клеточных культур становятся важнейшим источником материала для молекулярно-генетических исследований. Использование культур клеток *in vitro* удобно еще и тем, что, в отличие от образцов опухоли, позволяет изучать непосредственно опухолевые клетки без следового влияния микроокружения, исключая любые неопухолеспецифические белки. Со времени депонирования первой культуры клеток опухоли человека HeLa в 1951 году [124], получены и охарактеризованы десятки тысяч клеточных линий, которые могут быть предоставлены научному сообществу. Основные биобанки мира, в которых представлены опухолевые линии, включая отечественную коллекцию клеточных культур представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Биобанки мира, в которых представлены клеточные линии СМТ и ОС

Биобанк	Электронный ресурс
American Type Culture Collection (ATCC)	<a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
The European Collection of Cell Cultures (ECACC)	<a href="https://www.phe-culturecollections.org.uk">https://www.phe-culturecollections.org.uk</a>
Interlab Cell Line Collection (ICLC)	<a href="http://www.iclc.it/">http://www.iclc.it/</a>
German Collection of Microorganism and Cell Cultures (DSMZ)	<a href="http://www.dsmz.de">http://www.dsmz.de</a>
Cell Resource Center for Biomedical Research (IDAC)	<a href="http://www2.idac.tohoku.ac.jp">http://www2.idac.tohoku.ac.jp</a>
Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)	<a href="http://cellbank.nibio.go.jp">http://cellbank.nibio.go.jp</a>
Riken Biosource Center (BRC)	<a href="https://www.brc.riken.jp">https://www.brc.riken.jp</a>
Российской коллекции клеточных культур	<a href="https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/">https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/</a>

Биобанки обеспечивают оптимальные условия для длительного хранения опухолевых линий, являясь гарантом микробиологической чистоты клеточных линий, отсутствия перекрестного загрязнения другими клеточными культурами. В работе X. Pan с соавт. (2016) были проанализированы клеточные линии сарком, представленных в семи крупнейших иностранных биобанках [125]. Авторами обнаружена всего 121 клеточная линия сарком, представляющих 21 гистологический тип. При этом количество доступных клеточных линий для отдельных гистотипов отражает скорее не их распространенность, а легкость приспособления клеток этих опухолей к культивированию в условиях *in vitro*. Так клинически, липосаркома встречается гораздо чаще, чем остеогенная саркома, хотя количество доступных клеточных линий для липосаркомы – 4, а для остеогенной саркомы – 41. На втором месте по частоте встречаемости в коллекциях биобанков – рабдомиосаркомы (13), далее фибросаркомы – (12), саркомы Юинга (9), лейомиосаркомы (7), хондросаркомы (5), саркомы матки (5), липосаркомы (4), эпителиоидные саркомы (4), гигантоклеточные саркомы (4), хордомы (3), синовиальные саркомы (2), ангиосаркомы (2), злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов (2) и дерматофибросаркомы (2). Такие редкие саркомы, как альвеолярная не были представлены ни в одном из проанализированных биобанков на момент публикации, также многие линии представляли собой клоны одной и той же культуры. Если обратиться к Всероссийской коллекции клеточных культур человека и животных, то в ней представлены 5 клеточных линий остеогенной саркомы, 3 линии рабдомиосаркомы, включая одну эмбриональную и по одной линии лейомиосаркомы и фибросаркомы.

Обращает внимание недостаточная гистологическая характеристика подавляющего большинства клеточных линий как в России, так и за рубежом. Например, 10 из 13 представленных культур рабдомиосаркомы в мировых биобанках и две из трех отечественных не дифференцированы на подтипы (эмбриональная, альвеолярная или плеоморфная), каждый из которых имеет свои клинические особенности, что существенно, ограничивает их дальнейшее использование. Кроме того, диагностические критерии для многих гистологических подтипов сарком существенно изменились за годы, прошедшие со времени получения соответствующих клеточных линий, а отсутствие возможности пересмотра гистологических препаратов первичной опухоли, связанное с тем, что исходные ткани в биобанках обычно не хранятся, не позволяет переклассифицировать эти клеточные линии, снижая их ценность для исследований.

Идеальным решением, позволяющим избежать в дальнейшем появление подобных вопросов, было бы депонирование клеточных линий совместно с образцами первичной опухоли и ее гистологическими препаратами для беспрепятственной возможности проведения дополнительных исследований при необходимости. Такой возможностью обладают биобанки, связанные с крупными клиническими научно-исследовательскими центрами.

Еще одним значимым недостатком большинства клеточных линий, хранящихся в биобанках, можно назвать длительное время, прошедшее со времени их получения. Большинство задепонированных опухолевых культур получены в прошлом веке, пассированы сотни раз и полностью утратили сходство с исходным опухолевым материалом пациента.

Редкость, высокая гетерогенность СМТ и ОС и недостаточная эффективность современных режимов терапии, особенно в случае метастатического процесса, определяют необходимость располагать достаточным количеством доклинических модельных систем для исследований. Такие модели незаменимы для изучения биологических особенностей онкогенеза и опухолевой селекции, для определения новых молекулярных мишеней, оценки эффективности новых лекарственных средств и их комбинаций, выявления и преодоления механизмов химиорезистентности. В качестве материала для проведения доклинических исследований сарком в настоящее время, наряду с ксенотрансплантатами и органоидами [126], по-прежнему широко используются культуры опухолевых клеток.

Несмотря на присущие им недостатки, такие как сложность получения и необходимость адаптации клеток к условиям культивирования, которая может привести к значительным генетическим изменениям, преимущества клеточных линий очевидны. Как только стабильная опухолевая культура получена, она может служить источником бесконечного количества материала для экспериментальных исследований или тестирования новых лекарственных препаратов. Чем больше разнообразных клеточных линий может быть включено в исследование, тем полнее и достовернее его результаты. Для ряда злокачественных новообразований, клеточные культуры которых в достаточном количестве представлены в биобанках, уже разработаны эффективные стратегии лечения. В частности, в том числе и благодаря наличию значительного количества клеточных линий рака легкого удалось определить спектр драйверных мутаций при этом заболевании [127]. Использование клеточных линий позволило оценить распространенность мутации BRAF V600E при меланоме [128].

В то же время данные современных обзоров состояния биобанков свидетельствуют о малом количестве и недостаточном разнообразии гистотипов и представленных в них клеточных линий СМТ и ОС [125; 129]. Так E. Nattory с соавт. (2019) сообщили о наличии в мировых клеточных коллекциях линий 45 гистологических подтипов сарком из 189 перечисленных в современной классификации [129]. Например, сообщалось об отсутствии культур внескелетной миксоидной хондросаркомы. Некоторые клеточные линии сарком были представлены в единственном экземпляре: плеоморфная липосаркома, мелкоклеточная остеосаркома. Также авторы обнаружили клеточные линии, гистологические данные которых не соответствовали современной классификации ВОЗ. Кроме того, существуют существенные различия между пациентами с гистологически сходными опухолями (стадия заболевания,

характер метастазирования, мутационный профиль), поэтому единственная клеточная линия не может полностью отражать характеристики всего гистологического подтипа и нужно больше стабильных опухолевых культур, даже для тех сарком, клеточные линии которых имеются в биобанках.

В результате проведенных исследований нами была создана коллекция из 56 клеточных линий СМТ и ОС 16 гистологических подтипов, насчитывающая 38 культур СМТ и 18 ОС, из них 18 и 9 соответственно были пассированы более 15 раз. Высокий процент выхода в культуру (58,9%) может быть объяснен метастатическим характером и низкой степенью дифференцировки сарком в нашем исследовании. Результаты других исследователей указывают на некоторые трудности в создании культур клеток сарком, пригодных для длительного культивирования. Так, А. Salawu с соавт. (2016) сообщили о создании 7 клеточных линий СМТ из образцов, полученных от 47 пациентов, при этом они отмечали, что в 70% случаев удалось получить культуры, пассированные 4–5 раз, и только в 15% случаев были получены стабильно пролиферирующие клеточные линии [130]. Среди причин, препятствующих культивированию, авторы отмечают низкую пролиферативную активность адгезированных клеток. В работе не указан процент метастатических опухолей в исследовании, но упомянуто, что процент перевода в культуру в этом случае выше. В наше исследование включены только образцы метастатических сарком, с чем связан высокий процент полученных клеточных линий. Кроме низкой пролиферативной активности, среди факторов, препятствующих успешному культивированию, следует отметить контаминацию стромальными элементами, которая приводила к очень медленному росту фибробластоподобных клеток с последующей гибелью культуры.

Следует отметить, что, помимо опухолевых образцов, в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России хранятся гистологические препараты, которые можно оперативно переклассифицировать в соответствии с постоянно изменяющимися критериями. Например, в современной классификации 2020 года изъят ряд нозологических единиц, некоторые добавлены в соответствии с новыми представлениями о биологии опухолей [131]. В частности, подгруппу адипоцитарных СМТ дополнили два новых гистотипа: атипичная веретенноклеточная/плеоморфная липоматозная опухоль и миксоидная плеоморфная липосаркома. Последняя содержит участки, напоминающие как миксоидную липосаркому, так и плеоморфную липосаркому, но без характерных молекулярных изменений, присущих другим генетически определенным липосаркомам (таких, как FUS/EWSR1 перестройка или амплификация MDM2), и теперь рассматривается как отдельное образование. Появление новых сведений о молекулярно-генетических перестройках в различных новообразованиях позволило выделить несколько подгрупп в существующие группы. Так, в настоящее время известно, что

веретеночная/склерозирующая рабдомиосаркома включает в себя по меньшей мере три подгруппы с совершенно разными клинико-патологическими и молекулярными особенностями: опухоли с очаговыми мутациями в MYOD1, со слиянием генов VGLL2, NCOA2 или CITED2 и с отсутствием этих изменений. Группу опухолей неопределенной дифференцировки дополнили NTRK-реарранжированные новообразования [131].

В отношении опухолевых культур, представленных в биобанках, многие из которых были получены в конце прошлого века, не для каждой существует возможность оценить исходную опухоль в соответствии с современной классификацией. Решением проблем может стать создание опухолевых культур на базе крупных НМИЦ, где информация об исходной опухоли и пациентах хранится в полном объеме.

Все полученные в нашем исследовании клеточные линии были охарактеризованы на предмет оценки их морфологических особенностей, пролиферативной активности, миграционных и инвазивных способностей, экспрессии антигенов HLA I класса, транскрипционной активности РТГ, относительного содержания в популяции CD133+ и ALDH1+клеток, способности к спонтанной агрегации, формированию трехмерных структур и инвазивному потенциалу в 3D-системе [132].

Наблюдение за скоростью роста культур СМТ и ОС позволило установить, что клетки миксофибросарком характеризовались наилучшими ростовыми характеристиками, наименьшие параметры пролиферации демонстрировали культуры остеосарком. Длительное культивирование приводило к статистически значимому увеличению пролиферативной активности. В этом отношении интересна работа В. Lohberger с соавт. (2017), которые получили несколько субклонов клеток миксофибросаркомы, выделенных из опухоли одного и того же пациента, отличающиеся по пролиферативной активности, способностям к инвазии и генетическому профилю [133]. В нашем исследовании клоны, в сравнении с исходными клеточными линиями, также отличались по пролиферативной активности и экспрессии РТГ. При этом различались как уровень, так и профиль экспрессии изучаемых генов [134]. Таким образом, получение «родственных» клеточных линий, происходящих из одной опухоли, может быть ценным инструментом для изучения гетерогенности СМТ и ОС на клеточном и молекулярном уровне.

С точки зрения иммунологии опухолей, информация об экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости на клеточных линиях злокачественных новообразований является весьма важной, так как при разработке противоопухолевой иммунотерапии часто необходимо иметь модельные системы, такие как клеточные линии с определенным типом HLA [135]. Кроме того, HLA-типирование является одним из решений для проверки и отслеживания идентичности клеточных линий.

Мы обнаружили экспрессию HLA I класса в клетках всех полученных клеточных линий СМТ и ОС, при этом варианты аллелей антигенов, идентифицируемые в культивируемых малигнизированных клетках, совпадали во всех случаях с выявленными в моноцитах периферической крови больных. При сравнении с контрольной популяцией были обнаружены значимые различия для двух аллелей: A\*02 и A\*32. Учитывая число и разнообразие аллелей HLA I необходимо с осторожностью отнестись к полученным результатам на столь малой выборке, однако несколько исследовательских групп уже продемонстрировали прогностическое и предиктивное влияние HLA генотипа. Так E. Rosenbaum с соавт. (2020) показали связь между HLA-A\*02 и низкой ОБ при синовиальной саркоме [7], а P. Correale с соавт. (2020), напротив, при немелкоклеточном раке легких на фоне иммунотерапии показали худший исход лечения в группе больных негативных по HLA-A\*02 [8]. Таким образом HLA-типирование пациентов может предоставить материал для дальнейших исследований.

Использование модельных систем для изучения миграции и инвазии клеток сарком позволило установить, что все культуры, независимо от их происхождения, обладали миграционным и инвазивным потенциалом. При сравнении миграционных и инвазивных способностей культивируемых клеток СМТ и ОС оказалось, что *in vitro* в полученных культурах СМТ количество подвижных клеток, способных к миграции, статистически значимо больше, чем в культурах ОС, однако в отношении инвазии подобных закономерностей не наблюдалось.

В настоящее время известно множество молекулярно-генетических предиктивных и таргетных молекулярных маркеров для целого ряда злокачественных новообразований, в том числе для СМТ и ОС. К таким маркерам относят раково-тестикулярные антигены семейств MAGE, NY-ESO-1, BAGE, LAGE и других, общие для многих опухолей и отсутствующие в большинстве здоровых тканей [136]. Мы проанализировали в полученных клеточных линиях СМТ и ОС экспрессию 11 РТГ, относящихся к наиболее хорошо изученным семействам, и обнаружили что в 18,9% культур СМТ (7/37) и в 20,0% ОС (3/15) экспрессия полностью отсутствует. В остальных культурах экспрессия РТГ носила гетерогенный характер, при этом гены *PRAME* и *GAGE1* проявляли активность в наибольшем числе случаев и, как правило, наблюдалась их коэкспрессия. Экспрессия гена *SEMG1* не была зарегистрирована. Наибольшее количество активных генов было обнаружено в культурах остеосарком (9/11) и синовиальных сарком (8/11), наименьшее количество – в культурах рабдомиосарком и липосарком (5/11) [134]. J. Roszik с соавт. (2017) обнаружили гиперэкспрессию гена *PRAME* в клеточных линиях синовиальной саркомы и лейомиосаркомы [83]. Функции *PRAME* в нормальных и опухолевых клетках остаются в значительной степени неясными, однако в последние годы стало очевидно, что *PRAME* может способствовать онкогенезу и метастазированию с помощью различных



механизмов [137]. Было показано, что высокие уровни экспрессии белка PRAME коррелируют с худшей общей выживаемостью при остеосаркоме, а экспрессия PRAME чаще встречается в метастазах по сравнению с первичными опухолями [138].

В исследовании К. Iuga с соавт. (2017) иммуногистохимически были оценены уровни экспрессии четырех РТА в 108 образцах синовиальной саркомы [6]. NY-ESO-1, PRAME, MAGEA4 и MAGEA1 определили в 66 (61%), 93 (86%), 89 (82%) и 16 (15%) из 108 образцов, соответственно, и 104 (96%) из 108 синовиальных сарком показали иммуногистохимически наличие по меньшей мере одного из изучаемых РТА. Более того, выраженную экспрессию, по крайней мере, одного из этих антигенов наблюдали в 83% образцов. При этом высокие уровни NY-ESO-1 и MAGEA4 статистически значимо коррелировали с наличием некроза и высокой распространенностью опухоли. Иммуногистохимическое выявление каждого из определяемых РТА не коррелировало с прогнозом, но коэкспрессия NY-ESO-1, PRAME и MAGEA4 была связана с неблагоприятным исходом заболевания. Эти же авторы в другом исследовании оценили методом ПЦР уровни PRAME и NY-ESO-1, в образцах недифференцированной (n=46), высокодифференцированной (n=32) миксоидной липосаркомы и плеоморфной липосаркомы (n=14) [5]. Экспрессию PRAME и NY-ESO-1 наблюдали в образцах 20/46 (43%) и 3/46 (7%) недифференцированной; 3/32 (9%) и 1/32 (3%) высокодифференцированной миксоидной липосаркомы соответственно. Для плеоморфной липосаркомы эти антигены были обнаружены в 7/14 (50%) и 3/21 (21%) случаях соответственно.

Высокие уровни PRAME и/или NY-ESO-1 статистически значимо коррелировали с диаметром опухоли, наличием некроза, степенью злокачественности, распространенностью опухоли и плохим прогнозом. В нашем исследовании кластеризация полученных клеточных линий СМТ и ОС по уровню экспрессии РТГ позволила выделить три группы: с высокой степенью экспрессии *PRAME*, *GAGE1* и наличием экспрессии гена *PASDI* (миксофибросаркомы, синовиальные саркомы, лейомиосаркомы); с высоким уровнем экспрессии гена *SLLP1* (остеосаркомы, миксофибросаркома); с отсутствием или слабо выраженной экспрессией изучаемых генов. Как видно из полученных результатов, каждый гистотип клеточных линий характеризуется гетерогенной транскрипционной активностью, которую нельзя связать с источником происхождения клеточных культур. Есть данные, что экспрессия гена *PASDI* ассоциирована с пролиферативными свойствами клеток глиомы и активацией антиапоптотических белков [139]. *SLLP1* в норме является структурным белком, специфичным для сперматозоидов, его сверхэкспрессия обнаружена при онкогематологических заболеваниях, позволившая рассматривать его как потенциальную мишень для иммунотерапии [140]. Обнаружение гиперэкспрессии генов *PASDI* и *SLLP1* в клетках СМТ представляет значительный интерес и нуждается в дальнейшем изучении.

Мы изучили присутствие в полученных культурах СМТ и ОС маркеров CD133 и ALDH1, которые демонстрируют повышенную активность в различных типах неоплазий и связаны с метастатическим потенциалом опухолей, а также неблагоприятным прогнозом для пациентов [62; 141–143]. В работе I. Zambo с соавт. (2016) иммуногистохимически проанализированы уровни экспрессии Нестина, CD133 и ABCG2 в 24 образцах рабдомиосаркомы, 22 саркомах Юинга и 10 остеосаркомах [144]. Повышенная экспрессия CD133 была связана с низкой выживаемостью у пациентов с рабдомиосаркомой. Аналогично, о корреляции между экспрессией CD133 и низкой общей выживаемостью у 76 пациентов с эмбриональной рабдомиосаркомой сообщали D. Walter с соавт. (2011) [145]. А. He с соавт. (2012) выявили взаимосвязь экспрессии CD133 с появлением легочных метастазов и уменьшением ОВ больных ОС [146]. В работе A. Mardani с соавт. (2020) на гистологической материале 50 пациентов обнаружена связь между экспрессией CD133 и метастазированием остеосаркомы в легкое [147].

В то же время другие исследователи не установили подобной закономерности. Так, Y. Zhou с соавт. (2017) продемонстрировали отсутствие взаимосвязи между экспрессией маркеров CD133, CD29, CD44, Нестина, ALDH1 в опухоли и клиническими характеристиками заболевания при изучении биологического материала 20 больных синовиальной саркомой [148]. В ряде исследований маркеры стволовых опухолевых клеток рассматриваются не только в качестве прогностических маркеров, но и как таргетные молекулы. K. Gui с соавт. (2019) сообщили о высокой эффективности в остеосаркомах липидно-полимерных наночастиц, содержащих препарат трансретиноевой кислоты в сочетании с адресной системой доставки клеткам экспрессирующим CD133 [149]. Однако возможности таргетной терапии, направленной на клетки, несущие маркеры СКО в саркомах, носит дискуссионный характер. По утверждению K.M. Skubitz с соавт. (2019), ALDH1, CD44 и CD133 не являются полезными маркерами СКО при СМТ [11]. Кроме того, в этом исследовании показано, что макрофаги могут внести погрешность в оценку экспрессии маркеров СКО. В нашем исследовании при определении ALDH1 и CD133 в опухолевых клеточных линиях мы анализировали только целевые клетки без погрешностей микроокружения. Тем не менее не обнаружили связи между уровнем маркеров СКО и клиническими характеристиками пациентов, возможно вследствие того, что во всех случаях заболевание имело метастатический характер.

В настоящее время актуальным направлением является исследование свойств опухолевых клеток, выделенных из злокачественных новообразований пациентов, в трехмерных опухолевых культурах с целью воссоздания молекулярной сложности канцерогенных механизмов и повышения чувствительности к фармакологическому лечению [150]. В нашем исследовании все полученные клеточные культуры СМТ и ОС были способны

спонтанно формировать сфероиды, которые были использованы дополнительно для изучения процессов инвазии. Интересно, что клетки одного гистотипа сарком, но выделенные от разных больных, формировали сфероиды различного диаметра, при этом размер сфероида коррелировал со скоростью распространения клеток в матрикеле. По мнению некоторых исследователей, генерация сфероидов особенно важна для изучения сарком, поскольку скорость роста, морфология клеток, межклеточные взаимодействия в сфероидах достаточно хорошо имитируют первичные опухоли [151].

#### **4.2. Обсуждение результатов клонирования опухолевых линий**

Клонирование методом предельных разведений – самый распространенный и эффективный метод выделения изолированных колоний потомков единичных опухолевых клеток. Подвергнутые процедуре клонирования клетки оказываются в достаточно неблагоприятных для них условиях: с одной стороны – отсутствуют межклеточные контакты, с другой стороны – в среде нет достаточного количества необходимых сигнальных молекул (факторов кондиционирования).

Мы использовали кондиционированные среды метаболически активных клеточных линий СМТ и ОС для обеспечения пролиферативной активности опухолевых клонов. Клетки помещали в одинаковые условия, однако клоногенный потенциал реализовали только часть из них. Таким образом, можно предположить, что эти клеточные культуры обладали более агрессивным потенциалом за счет возможного преобладания аутокринной регуляции метаболизма и отсутствия необходимости в межклеточном взаимодействии. Такие клетки получают конкурентное преимущество, оказавшись изолированными и в условиях организма.

Образцы опухолей были получены от пациентов, составляющих достаточно однородную группу по типу и характеру опухолевого процесса. Во всех случаях это были новообразования с высокой степенью злокачественности и низкой степенью дифференцировки. Тем не менее не все полученные опухолевые культуры обладали клоногенным потенциалом и только 39,3% из них обладали способностью к формированию колоний при использовании метода предельных разведений. Способность только единичных клеток давать начало опухолевому клону связана с высокой динамической клональной гетерогенностью клеток и подтверждена в многочисленных исследованиях на моделях рака молочной железы [20; 39]. Поликлональный характер опухолевой популяции сарком был продемонстрирован в работе R. Macklin с соавт. (2016), которые показали существование в культуре остеогенной саркомы клеток с различным метастатическим потенциалом [152]. S. Gambera с соавт. (2018) обнаружили, что эволюционный процесс в культуре этих клеток может иметь нейтральный поликлональный характер с последующим клональным доминированием [101]. В их работе приведены

доказательства того, что эволюция в остеогенных саркомах следует нейтральной модели, в которой различные клоны сосуществуют и размножаются одновременно. Y.J. Tang с соавт. (2019) на модели недифференцированной плеоморфной саркомы продемонстрировали, что рост первичной опухоли связан со снижением клональной гетерогенности, местный рецидив опухоли после операции или лучевой терапии обусловлен формированием множества клонов, а метастатические опухоли образуются в результате отбора единственного метастатического клона [102]. При этом исследователи заключили, что метастатический клон мог быть как доминирующим, так и минорным в исходной опухоли, и преимущество роста в первичной локализации не всегда связано с повышенной метастатической способностью. Не все клетки, активно растущие в опухолевом очаге, обладают способностью к автономному существованию, и это отражается на эффективности клонирования методом предельных разведений.

Способность образовывать колонии из одной клетки предполагает высокую метаболическую активность и возможность полностью автономной аутокринной регуляции, в отличие от неклоногенных опухолей, где, по-видимому, важную роль играют межклеточные взаимодействия и паракринная регуляция. A. Bernat-Peguera с соавт. (2019) показали, что аутокринная сигнализация PDGFR/SDF-1 играет существенную роль в эпителиально-мезенхимальном переходе (EMT), способствует пролиферации и инвазии. [153]. Наличие в опухолевой популяции большого числа клеток, способных к аутокринной стимуляции, обуславливает агрессивный рост и повышенную способность к метастазированию. Напротив, если необходимым для пролиферации фактором являлось межклеточное взаимодействие и паракринная регуляция, опухоли отличались меньшей способностью к метастазированию в ксенографтах [154].

Продemonстрированное нами увеличение пролиферативной активности опухолевых культур в процессе длительного культивирования можно связать как с адаптацией к росту в монослое, так и с последовательными изменениями в опухолевых клетках, характерными для линейного эволюционного процесса. При этом в отсутствии тормозящего влияния иммунной системы организма преимущества получают клетки с максимальной скоростью роста. За время длительного культивирования (10–18 мес.) скорость пролиферации и клеточный индекс увеличивались постепенно и не более чем на 17% от исходного значения. Полученные *in vitro* клоны СМТ и ОС в нашем исследовании показали значимые различия в пролиферативной активности, которая в ряде случаев была в 2 раза выше, чем у исходных клеточных культур. Это говорит о резком ускорении эволюционных процессов в процессе клонирования, а также отражает характеристики клетки, от которой был получен клон.

В нашем исследовании в группе клоногенных сарком медиана уровня экспрессии ALDH1 была выше, чем в группе неклоногенных опухолей ( $p < 0.05$ ). Это позволяет

предположить важность участия ALDH1<sup>+</sup>-клеток в процессах независимого клеточного роста и активации пролиферативного потенциала. В последние десятилетия все больше исследований подтверждают роль ALDH1 в качестве биологического маркера СКО, а также индикатора неблагоприятного клинического исхода, как в экспериментальных моделях, так и клинических исследованиях. Существуют предположения, что опухолевые клетки с подобными способностями ответственны, по крайней мере, частично, за внутриопухолевую гетерогенность на метастатическом уровне [155]. В настоящее время доказана способность ALDH1 к антиоксидантной и субстрат-специфической инактивации лекарственных препаратов, стимуляции пролиферативной активности опухолевых клеток путем влияния на сигнальный путь рецептора ретиноевой кислоты. Т. Namekawa с соавт. (2019) создали 3D-культуры клеток рака мочевого пузыря, полученных от пациента. Ингибирование ALDH1A1 подавляло пролиферацию и сфероидообразование, добавление ретиноевой кислоты восстанавливало пролиферацию при нокдаунах ALDH1A1 [156]. Показана взаимосвязь между высокой активностью ALDH1 и метастатическим потенциалом для различных солидных новообразований, в том числе для остеогенной саркомы [63].

В настоящее время CD133 рассматривается в качестве универсального маркера СКО [157]. В то же время роль данной субпопуляции клеток в процессах метастазирования и формирования лекарственной устойчивости носит дискуссионный характер. С одной стороны, считается, что высокая экспрессия этого маркера связана с метастатическим потенциалом опухоли и устойчивостью к терапии. Кроме того, CD133 может усиливать ангиогенез за счет активации сигнального пути Wnt и увеличения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A) и интерлейкина-8 [158]. Показано, что CD133<sup>+</sup>субпопуляция в клеточной линии синовиальной саркомы обладала свойствами СКО, включая самообновление и устойчивость к химиотерапии [159]. В другом исследовании Y. Xie с соавт. (2018) сообщили о связи экспрессии CD133, выявленной в 28 образцах метастатических остеогенных сарком, и клинической картиной заболевания, что позволяло рассматривать возможность применения этого биомаркера для прогнозирования исхода заболевания у данной категории больных [68]. Медиана безрецидивной выживаемости в этом исследовании составила 21 и 32 мес. для больных остеосаркомой с CD133-позитивной популяцией клеток и без нее соответственно ( $p < 0,05$ ). Однако медиана общей выживаемости в этих группах составила 46 и 49 месяцев без статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ).

С другой стороны, некоторые исследователи оспаривают клиническую полезность маркера CD133 при саркомах. Так, исследование К.М. Skubitz с соавт. (2019), в котором изучали маркеры СКО (ALDH1, CD44, CD133) в образцах СМТ до и после химиотерапии, не выявило существенных различий [11]. Эти авторы обнаружили высокую экспрессию маркеров

СКО в инфильтрирующих опухоль макрофагах, что может снижать диагностическую и прогностическую ценность предыдущих исследований, выполненных на иммуногистохимически окрашенных срезах опухолей. Изучение экспрессии CD133 в нашем исследовании позволило выявить вариабельность содержания CD133+клеток в пределах от 0,2% до 17,7%. При этом опухолевые культуры не демонстрировали взаимосвязь между количеством CD133+клеток и клоногенностью. Не было выявлено корреляции между экспрессией CD133 и клиническими характеристиками пациентов.

Необходимо также отметить, что ЭК в нашем исследовании, которую мы определяли как процентное отношение числа клеток, сформировавших колонии к общему числу адгезированных одиночных клеток, не соответствовала уровню экспрессии маркеров СКО. Так, например, в клоногенной клеточной линии миксофибросаркомы #678 с минимальным числом ALDH+клеток (1,4%) ЭК составила 26,1%, а в клеточной линии клоногенной миксофибросаркомы #982 с экспрессией CD133 в 0,5% клеток – 41,9% опухолевых клеток обладали способностью к пролиферации при клонировании. Таким образом, можно предположить, что ценность маркеров СКО, по крайней мере для СМТ и ОС, либо несколько преувеличена, либо, что более вероятно, в настоящее время не определены релевантные маркеры СКО для этой группы опухолей.

В ряду различных типов опухолевых антигенов раково-тестикулярные антигены выделяются рядом привлекательных качеств: они aberrантно экспрессируются в малигнизированных клетках и практически не экспрессируются соматическими клетками. При этом экспрессия РТА клетками опухоли может служить как маркером малигнизации, так и выполнять роль потенциальной терапевтической мишени. В настоящее время 276 РТА и соответствующих им генов были зарегистрированы в онлайн-банке данных, основанном Институтом исследования рака им. Людвига (<http://www.cta.lncc.br>) [71]. Выбор исследуемых РТГ был основан на опубликованных ранее данных об их участии в процессах прогрессирования и метастазирования. Большинство из выбранных нами генов относятся к крупным семействам. Поскольку контроль их экспрессии подчинен одинаковым промоторам, из каждого семейства было выбрано по одному гену, максимально его характеризующего [80].

Среди РТГ, экспрессия которых оценивалась в нашем исследовании, пять семейств (MAGE, NY-ESO-1, PRAME, GAGE и SSX1) достаточно хорошо изучены при саркомах [72]. Другие шесть РТГ (HAGE, PASD1, SCP1, SEMG1, SLLP1, SPANXA1), роль которых в метастатических процессах в настоящее время активно обсуждается, по литературным данным, широко представлены в различных злокачественных новообразованиях, но в саркомах до последнего времени не были достаточно исследованы.

Мы проанализировали характер экспрессии комбинации РТГ (*MAGE, NY-ESO-1, PRAME, GAGE, SSX1, HAGE1, PASD1, SCP1, SEMG1, SLLP1, SPANXA1*) в 52 культурах метастатических опухолей и в 83 клонированных опухолевых культурах. Оценивали не только уровень транскрипционной активности изучаемых генов, но и динамические колебания его интенсивности в процессе длительного непрерывного культивирования, и изменения, которые претерпевал профиль РТГ в культурах, выделенных методом клонирования.

В процессе длительного культивирования обнаружили тенденцию к увеличению частоты встречаемости и интенсивности экспрессии РТГ, что может быть объяснено клональной опухолевой селекцией при отсутствии элиминирующего влияния иммунной системы на опухолевые клетки, несущие эти высокоиммуногенные антигены в условиях *in vitro*. Рост разнообразия экспрессии РТГ и увеличение транскрипционной активности в клоногенных саркомах и их клонах может рассматриваться, как дополнительное основание считать высокоагрессивные метастатические саркомы перспективным кандидатом для проведения иммунотерапии, направленной против РТА.

При анализе зависимости частоты экспрессии РТГ от клоногенного потенциала, мощности исследования было недостаточно, чтобы выявить статистические закономерности, однако можно отметить, что отсутствие минимальной транскрипционной активности всех 11 генов было выявлено в 26,7% сарком с низким клоногенным потенциалом (8/30), 9,1% сарком с высоким клоногенным потенциалом (2/22) и всего в 1,2% клонов (1/82) ( $p < 0,05$ ). Таким образом, в процессе длительного культивирования происходит медленный, а при клонировании – быстрый рост транскрипционной активности РТГ в клетках, связанный с ростом пролиферативной активности и отсутствием элиминирующего воздействия иммунной системы в условиях *in vitro*. Ранжирование опухолевых культур, по результатам кластерного анализа экспрессии РТГ, также позволило выделить кластер с низкой или отсутствующей транскрипционной активностью РТГ, практически полностью состоящий из опухолевых культур, и два кластера со средним и высоким уровнем экспрессии РТГ, представленных клонами. Интересно появление экспрессии новых РТГ, которые не были активны в исходных культурах, коррелирующее с активной пролиферацией и химиорезистентностью клонов. Это может отражать дальнейшую эволюцию метастатических образований с усилением экспрессии эмбриональных РТГ, что подтверждает возможность возникновения у одного пациента метастатических новообразований с индивидуальными биологическими особенностями и может стать дополнительным обоснованием применения иммунотерапии при метастатических саркомах, даже при исходно низкой иммуногенности опухоли.

Клоногенные культуры СМТ и ОС в нашем исследовании отличались ожидаемо высокой химиорезистентностью. При этом чувствительность клеток к режимам, рутинно используемым

в клинике, оказалась различной. Если к терапевтическим дозировкам схемы А1 продемонстрировали чувствительность 27,3% культур СМТ, то к таким же концентрациям препаратов схемы GemTax – 18,2%. Для ОС только Доксорубин продемонстрировал токсическое действие на опухолевые клетки в терапевтической концентрации. Он оказался действенным в 33,3% случаев. По разным данным, чувствительность МТТ-теста для оценки химиорезистентности опухолевых клеток составляет более 90% при специфичности не более 50% [116]. Таким образом, опухолевые клетки, резистентные в условиях *in vitro*, будут проявлять подобные свойства *in vivo*, но химиопрепараты, оказавшие цитотоксическое воздействие на клетки в условиях эксперимента, лишь в 50% случаев действуют аналогично в реальных клинических условиях. Это затрудняет подбор препаратов для терапии с использованием культур опухолевых клеток пациентов. При длительном культивировании мы наблюдали рост химиорезистентности опухолевых клеток, что сопровождалось изменением экспрессии РТГ и увеличением пролиферативной активности. Наши наблюдения согласуются с результатами M.G. Francipane с соавт. (2019), которые продемонстрировали, что клональный отбор приводит к образованию более агрессивных и химиорезистентных опухолевых культур с иным паттерном экспрессии генов [154]. Y. Kang с соавт. (2015), сравнивая клеточные линии аденокарциномы на ранних (<5) и поздних (>20) пассажах, также показали их различия по пролиферативной активности, генетическим мутациям, инвазивному потенциалу и химиорезистентности [25].

При клонировании мы наблюдали увеличение химиорезистентности как в опухолевых культурах, полученных от пациентов после химиотерапии, так и в клетках нелеченых больных. Это подтверждает предположение о том, что в изначально гетерогенных опухолях существуют клетки, обладающие резистентностью к химиопрепаратам, которые получают конкурентные преимущества в процессе химиотерапевтического воздействия. U. Ben-David с соавт. (2018) методом предельных разведений получили 27 штаммов из опухолевой культуры рака молочной железы, оценили генетическую изменчивость и исследовали чувствительность клонов к 321 противоопухолевому соединению [160]. Была обнаружена значительная гетерогенность ответа на химиопрепараты: 75% химических соединений ингибировали одни штаммы, будучи полностью неактивными в других.

Саркомы неоднородны на генетическом, эпигенетическом и онкогенном уровнях. Эти параметры не статичны, а постоянно изменяются в ходе клональной эволюции опухоли. Обнаруженные нами различия в функциональных свойствах клеток сарком, проявляющиеся в процессе длительного непрерывного культивирования, их клонов, полученных методом предельных разведений, и культур опухолевых клеток, выделенных из метастатических очагов, позволяют судить о данных злокачественных новообразованиях, как о сложной, постоянно



изменяющейся структуре. Эти наблюдения указывают на необходимость дальнейших исследований в этой области.

Анализ исходов заболевания у пациентов с клоногенными и неклоногенными клеточными линиями выявил различия в общей выживаемости, как в общей группе больных ( $p=0,008$ ), так и в группе пациентов, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» ( $p=0,046$ ). Этому, несомненно, способствовала выявленная высокая химиорезистентность, пролиферативная активность и миграционная способность клеток их опухолей. В случае иммунотерапии обнаруженная экспрессия различных РТГ, с одной стороны, создает потенциал для эффективной иммунотерапии, направленной против РТА, но, с другой стороны, гетерогенность экспрессии РТГ в опухолевой популяции приводит к быстрому истощению иммунной системы.

Для того чтобы оценить влияние клоногенности опухолевых клеток, обнаруженной экспериментально, на иммунологические характеристики, мы выделили группу пациентов, получавших после хирургического этапа иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac». При анализе субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных, клеточные линии которых отличались клоногенностью, было обнаружено сниженное содержание ЦТЛ с фенотипом  $CD3+CD8+HLA-DR+$  и увеличенное количество естественных киллеров (NK-клеток) ( $p<0,05$ ) по сравнению пациентами с неклоногенными клеточными линиями. Vgenopoulou с соавт. (2003) связали внутри- и перитуморальную инфильтрацию опухоли NK-клетками с неблагоприятным прогнозом при карциноме молочной железы [161].

Позднее, M.F. Wedekind с соавт. (2018) было продемонстрировано, что изначально невысокие уровни присутствия ЦТЛ в опухолевых инфильтратах синовиальных и десмопластических сарком еще более снижаются при прогрессировании заболевания [162]. В этой работе был показан рост в динамике уровня NK при этих гистотипах опухолей, согласующийся со снижением экспрессии молекул гистосовместимости HLA I класса. Кроме того, M.F. Santos с соавт. (2014) показана прямая корреляционная связь между высоким уровнем циркулирующих опухолевых клеток и NK-клеток в крови [163]. Мы наблюдали аналогичные изменения показателей периферической крови у пациентов с наиболее агрессивными клоногенными клеточными линиями [164]. Пациенты с клоногенными клеточными линиями имели в крови меньшее количество активированных форм ЦТЛ, что может быть связано с истощением популяции этих клеток, вызванном высокой гетерогенностью опухолевой популяции, в частности, по экспрессии РТА. Высокое содержание NK может быть объяснено снижением экспрессии молекул HLA I класса опухолевыми клетками, что закономерно приводит к уклонению опухоли от иммунологического надзора и

прогрессированию заболевания [165]. Одним из возможных путей для повышения эффективности иммунотерапии у пациентов с клоногенными клеточными линиями может стать сочетание иммунотерапии с метрономными режимами химиотерапии, которые воздействуют на микроокружение опухоли и уже показали свое иммуномодулирующее действие в клинике [166].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможности изучения метастатических СМТ и ОС ограничены недостаточным количеством материала для исследований, и клеточные линии, полученные нами, могут существенно расширить возможности будущих изысканий. Злокачественные опухоли представлены гетерогенным пулом клеток, которые отличаются по морфологии, фенотипу, экспрессии генов, метаболизму, иммуногенности, пролиферации и метастатическому потенциалу. Еще одной ценной характеристикой опухолевых клеток в культуре, может стать клоногенность. Этот параметр, впервые определенный в нашем исследовании, выделяет группу опухолей, отличающуюся высокой пролиферативной и миграционной способностью и метаболической активностью ALDH1 (маркера СКО). Клоногенные опухолевые культуры в нашей работе также характеризовала высокая транскрипционная активность РТГ *GAGE1*, *SLLP1*. При этом кластерный анализ показал, что клоногенные саркомы и их клоны демонстрируют повышенную экспрессию РТГ различных классов. Факт экспрессии высокоиммуногенных РТА в опухолевых клетках может свидетельствовать о наличии определенных перспектив для иммунотерапии у этой группы пациентов, особенно учитывая то обстоятельство, что клоногенные клеточные линии сарком в нашем исследовании демонстрировали крайне высокую резистентность к химиотерапевтическим агентам как в стандартных (эквивалентных терапевтическим), так и десятикратно превышающих терапевтические дозировки концентрациях.

Анализ общей выживаемости и времени до прогрессирования показал достоверное снижение общей выживаемости в группе пациентов, клеточные линии опухолей которых демонстрировали клоногенные характеристики ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о важности определения клоногенности в клинике. При оценке субпопуляционного состава клеток иммунной системы в периферической крови пациентов с клоногенными клеточными линиями отмечен высокий уровень NK-клеток и сниженное количество ЦТЛ и активированных форм ЦТЛ и Т-лимфоцитов хелперов, что может говорить о процессах ускользания от иммунного ответа и являться причиной недостаточной эффективности иммунотерапии в этой группе.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют об установлении клоногенности как новой характеристики опухолевых клеток СМТ и ОС, характеризующей

саркомы способные к изолированному росту в системе *in vitro*, отличающиеся высокой пролиферативной и миграционной способностью, химиорезистентностью к стандартным терапевтическим композициям, повышенным содержанием ALDH1+ клеток, транскрипционной активностью генов высокоиммуногенных РТА (*GAGE1*, *SLLP1*). Пациенты, опухолевые клетки которых демонстрируют клоногенные характеристики отличаются низкой общей выживаемостью как при использовании стандартных терапевтических подходов, так и с применением иммунотерапии аутологичной вакциной «CaTeVac». Субпопуляционный состав клеток в этой группе характеризуется низким содержанием ЦТЛ, активированных ЦТЛ с фенотипом CD3+CD8+HLA-DR+, активированных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3+CD4+HLA-DR+, высоким уровнем NK-клеток CD3-CD16+CD56+.

## ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция из 56 охарактеризованных клеточных линий метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком.
2. Выявлено 2 типа клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком: клоногенные (39,3%; 22/56) и неклоногенные (60,7%; 34/56).
3. Обнаружено, что в процессе селекции появляются значимые различия биологических свойств клеток СМТ и ОС: пролиферативной, миграционной способности, относительного содержания ALDH1+клеток, транскрипционной активности генов высокоиммуногенных раково-тестикулярных антигенов *GAGE1*, *SLLP1* ( $p < 0,05$ ). Селекция клеток СМТ и ОС приводит к увеличению химиорезистентности по сравнению с исходными клеточными линиями ( $p < 0,05$ ).
4. Установлен наиболее часто встречающийся высокоиммуногенный гаплотип HLA-A\*02 (75,9%) и A\*32 (18,5%) в клетках СМТ и ОС по сравнению с таковым в общей популяции ( $p < 0,05$ ).
5. Установлены значимые различия общей выживаемости пациентов с клоногенными и неклоногенными клеточными линиями СМТ и ОС как в общей группе (медиана ОВ составила 9 и 27,3 мес., соответственно,  $p = 0,008$ ), так и среди пациентов, получавших иммунотерапию вакциной «СаТеVac» (6,4 и 28,3 мес., соответственно,  $p = 0,046$ ).
6. Обнаружены различия динамики иммунологических показателей периферической крови пациентов с СМТ/ОС в зависимости от клоногенности опухолевых клеток. В группе больных с клоногенными клеточными линиями отмечено низкое содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов CD3+CD8+HLA-DR+, активированных Т-лимфоцитов хелперов CD3+CD4+HLA-DR+, высокий уровень NK-клеток CD3-CD16+CD56+,  $p < 0,05$ ).

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Получение клеточных культур сарком из операционных образцов пациентов и оценка их клоногенности могут быть использованы для выявления неблагоприятных факторов прогноза заболевания.

Клоногенные клеточные линии могут быть использованы как модели резистентности для разработки новых способов лечения сарком.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ**

Целесообразно дальнейшее получение опухолевых культур из образцов метастатических СМТ и ОС для формирования групп, содержащих клеточные линии отдельных гистологических подтипов с последующим изучением клоногенных характеристик и экспрессии маркеров стволовых клеток опухоли на более однородном материале.

Необходимо продолжение исследований, направленных на поиск иммунологических маркеров с целью расширения показаний для иммунотерапии, в том числе и на более ранних этапах противоопухолевого лечения.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ДК – дендритная клетка

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ – интерлейкин

МНПК – моноклеары периферической крови

МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

ОВ – общая выживаемость

ОС – остеогенная саркома

ПЦР/SSP – полимеразная цепная реакция с праймерами, специфичными к конкретным аллелям

ППС – полная питательная среда

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТА/РТГ – раково-тестикулярные антигены/гены

СКО – стволовые клетки опухоли

СМТ – саркома мягких тканей

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты (CTL)

ЭК – эффективность клонирования

ALDH1 – альдегиддегидрогеназа 1, маркер стволовых клеток опухоли

CD133 – проминин-1, маркер стволовых клеток опухоли

HLA – группа антигенов гистосовместимости (Human Leukocyte Antigens)

НК – естественные киллеры

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Sarcoma treatment in the era of molecular medicine / T.G. Grünewald, M. Alonso, S. Avnet [et al.] // *EMBO Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 12, No 11. – P. e11131. – DOI: 10.15252/emmm.201911131.
2. Sarcomas in the United States: Recent trends and a call for improved staging / M.M. Gage, N. Nagarajan, J.M. Ruck [et al.] // *Oncotarget*. – 2019. – Vol. 10, No 25. – P. 2462–2474. – DOI: 10.18632/oncotarget.26809.
3. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с.
4. Heterogeneity and cancer / K.H. Allison, G.W. Sledge // *Oncology*. – 2014. – Vol. 28, No 9. – P. 772–778.
5. Cancer-testis antigens PRAME and NY-ESO-1 correlate with tumour grade and poor prognosis in myxoid liposarcoma / K. Iura, K. Kohashi, Y. Hotokebuchi [et al.] // *The journal of Pathology. Clinical Research*. – 2015. – Vol. 1, No 3. – P. 144–159. – DOI: 10.1002/cjp2.16.
6. Cancer-testis antigen expression in synovial sarcoma: NY-ESO-1, PRAME, MAGEA4, and MAGEA1 / K. Iura, A. Maekawa, K. Kohashi [et al.] // *Human Pathology*. – 2017. – Vol. 61. – P. 130–139. – DOI: 10.1016/j.humpath.2016.12.006.
7. HLA Genotyping in synovial sarcoma: identifying HLA-A\*02 and its association with clinical outcome / E. Rosenbaum, K. Seier, C. Bandlamudi [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 26, No 20. – P. 5448. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0832.
8. Distinctive germline expression of class I human leukocyte antigen (HLA) alleles and DRB1 heterozygosity predict the outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade / P. Correale, R.E. Saladino, D. Giannarelli [et al.] // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. – 2020. – Vol. 8, No 1. – P. e000733. – DOI: 10.1136/jitc-2020-000733.
9. Cancer stem cell marker glycosylation: nature, function and significance / B.W. Mallard, J. Tiralongo // *Glycoconjugate Journal*. – 2017. – Vol. 34. – P. 441–452. – DOI: 10.1007/s10719-017-9780-9.
10. Prognostic value of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in invasive breast carcinomas / H. Demir, O. Dulgar, B.T. Gulle, H. Turna, S. Ilvan // *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2018. – Vol. 18, No 4. – P. 313–319. – DOI: 10.17305/bjbms.2018.3094.



11. Effect of chemotherapy on cancer stem cells and tumor-associated macrophages in a prospective study of preoperative chemotherapy in soft tissue sarcoma / K.M. Skubitz, J.D. Wilson, E.Y. Cheng [et al.] // *J Transl Med.* – 2019. – Vol. 17, No 1. – P. 130. – DOI: 10.1186/s12967-019-1883-6.
12. Intratumoral immune-biomarkers and mismatch repair status in leiomyosarcoma – potential predictive markers for adjuvant treatment: a pilot study / J.E. Cohen, F. Eleyan, A. Zick [et al.] // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, No 56. – P. 30847–30854. – DOI: 10.18632/oncotarget.25747.
13. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in osteosarcomas of the jaws: a multicenter study / P.M. Alves, J.A.A. de Arruda, D.A.C. Arantes [et al.] // *Virchows Archiv.* – 2019. – Vol. 474, No 2. – P. 201–207. – DOI: 10.1007/s00428-018-2499-6.
14. The adequacy of tissue microarrays in the assessment of inter- and intra-tumoural heterogeneity of infiltrating lymphocyte burden in leiomyosarcoma / A.T.J. Lee, W. Chew, C.P. Wilding [et al.] // *Scientific Reports.* – 2019. – Vol. 9, No 1. – P. 14602. – DOI: 10.1038/s41598-019-50888-5.
15. Immune checkpoint inhibitors in treatment of soft-tissue sarcoma: A systematic review and meta-analysis / M. Saerens, N. Brusselsaers, S. Rottey [et al.] // *European Journal of Cancer.* – 2021. – Vol. 152. – P. 165–182. – DOI: 10.1016/j.ejca.2021.04.034.
16. Systemic blood immune cell populations as biomarkers for the outcome of immune checkpoint inhibitor therapies / C. Hernandez, H. Arasanz, L. Chocarro [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – Vol. 21, No 7. – P. 2411. – DOI: 10.3390/ijms21072411.
17. Advances for studying clonal evolution in cancer / L. Ding, B.J. Raphael, F. Chen, M.C. Wendl // *Cancer Letters.* – 2013. – Vol. 340, No 2. – P. 212–219. – DOI: 10.1016/j.canlet.2012.12.028.
18. The clonal evolution of tumor cell populations / P.C. Nowell // *Science.* – 1976. – Vol. 194, No 4260. – P. 23–28. – DOI: 10.1126/science.959840.
19. Evolution of the cancer stem cell model / A. Kreso, J.E. Dick // *Cell Stem Cell.* – 2014. – Vol. 14, No 3. – P. 275–291. – DOI: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
20. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care / R.E. Ellsworth, H.L. Blackburn, C.D. Shriver [et al.] // *Seminars in Cell and Developmental Biology.* – 2017. – Vol. 64. – P. 65–72. – DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.08.025.
21. Cancer stem cells: A product of clonal evolution? / G.V. Niekerk, L.M. Davids, S.M. Hattingh, A.M. Engelbrecht // *Int J Cancer.* – 2017. – Vol. 140. – No 5. – P. 993–999. – DOI: 10.1002/ijc.30448.
22. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing / L.R. Yates, M. Gerstung, S. Knappskog [et al.] // *Nature Medicine.* – 2015. – Vol. 21, No 7. – P. 751–759. – DOI: 10.1038/nm.3886.
23. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer / P.C. Boutros, M. Fraser, N.J. Harding [et al.] // *Nature Genetics.* – 2015. – Vol. 47, No 7. – P. 736–745. – DOI: 10.1038/ng.3315.

24. Multiregion whole-exome sequencing uncovers the genetic evolution and mutational heterogeneity of early-stage metastatic melanoma / K. Harbst, M. Lauss, H. Cirenajwis [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76, No 16. – P. 4765–4774. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3476.
25. Many private mutations originate from the first few divisions of a human colorectal adenoma / H. Kang, M.P. Salomon, A. Sottoriva [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2015. – Vol. 237, No 3. – P. 355–362. – DOI: 10.1002/path.4581.
26. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer / S. Yachida, S. Jones, I. Bozic [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 467, No 7319. – P. 1114–1117. – DOI: 10.1038/nature09515.
27. Single-cell sequencing analysis characterizes common and cell-lineage-specific mutations in a muscle-invasive bladder cancer / Y. Li, X. Xu, L. Song [et al.] // *GigaScience*. – 2012. – Vol. 1, No 1. – P. 12. – DOI: 10.1186/2047-217X-1-12.
28. Intratumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas Delineated by Multi-region Sequencing HHS Public Access / J. Zhang, J. Fujimoto, J. Zhang [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346, No 6206. – P. 256–259. – DOI: 10.1126/science.1256930.
29. Signatures of mutational processes in human cancer / L.B. Alexandrov, S. Nik-Zainal, D.C. Wedge [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 500, No 7463. – P. 415–421.
30. Tumor evolution: linear, branching, neutral or punctuated? / A. Davis, R. Gao, N. Navin // *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*. – 2017. – Vol. 1867, No 2. – P. 151–161. – DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.01.003.
31. Divergent modes of clonal spread and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer / A. McPherson, A. Roth, E. Laks [et al.] // *Nature Genetics*. – 2016. – Vol. 48, No 7. – P. 758–767. – DOI: 10.1038/ng.3573.
32. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing / M. Gerlinger, S. Horswell, J. Larkin [et al.] // *Nature Genetics*. – 2014. – Vol. 46, No 3. – P. 225–233. – DOI: 10.1038/ng.2891.
33. The clonal evolution of osteosarcomas TT – Die klonale Evolution des Osteosarkoms / D. Baumhoer // *Der Pathologe*. – 2016. – Vol. 37, Suppl. 2. – P. 163–168. – DOI: 10.1007/s00292-016-0200-x.
34. Different patterns of clonal evolution among different sarcoma subtypes followed for up to 25 years / J. Hofvander, B. Viklund, A. Isaksson [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9, No 1. – P. 3662. – DOI: 10.1038/s41467-018-06098-0.
35. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers / S.P. Shah, A. Roth, R. Goya [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 486, No 7403. – P. 395–399. – DOI: 10.1038/nature10933.

36. Genomic profiling of dedifferentiated liposarcoma compared to matched well-differentiated liposarcoma reveals higher genomic complexity and a common origin / H.C. Beird, C.C. Wu, D.R. Ingram [et al.] // *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*. – 2018. – Vol. 4, No 2. – P. a002386. – DOI: 10.1101/mcs.a002386.
37. Identification of neutral tumor evolution across cancer types / M.J. Williams, W. Benjamin, C.P. Barnes [et al.] // *Nature genetics*. – 2016. – Vol. 48, No 3. – P. 238–244. – DOI: 10.1038/ng.3489.
38. Genomics and the immune landscape of osteosarcoma / C.C. Wu, J.A. Livingston // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2020. – Vol. 1258. – P. 21–36. – DOI: 10.1007/978-3-030-43085-6\_2.
39. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing / Y. Wang, J. Waters, M.L. Leung [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 512, No 7513. – P. 155–160. – DOI: 10.1038/nature13600.
40. A temporal shift of the evolutionary principle shaping intratumor heterogeneity in colorectal cancer / T. Saito, A. Niida, R. Uchi [et al.] // *Nature communications*. – 2018. – Vol. 9, No 1. – P. 2884. – DOI: 10.1038/s41467-018-05226-0.
41. Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER2+ breast tumors present addresses / I.H. Rye, A. Trinh, A.B. Saetersdal [et al.] // *Molecular Oncology*. – 2018. – Vol. 12. – P. 1838–1855. – DOI: 10.1002/1878-0261.12375.
42. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency / M. Kovac, C. Blattmann, S. Ribi [et al.] // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 8940. – DOI: 10.1038/ncomms9940.
43. Теоретические основы селекции / Н.И. Вавилов. – М.: Наука, 1987. – 510 с.
44. Tumour Cell Heterogeneity / L. Gay, A.-M. Baker, T.A. Graham // *F1000 Research*. – 2016. – Vol. 5. – P. F1000 Faculty Rev-238. – DOI: 10.12688/f1000research.7210.1.
45. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei / C.-Z. Zhang, A. Spektor, H. Cornils [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 522, No 7555. – P. 179–184. – DOI: 10.1038/nature14493.
46. Single-cell analyses of transcriptional heterogeneity during drug tolerance transition in cancer cells by RNA sequencing / M.-C.W. Lee, F.J. Lopez-Diaz, S.Y. Khan [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111, No 44. – P. E4726–E4735. – DOI: 10.1073/pnas.1404656111.
47. Clonal evolution models of tumor heterogeneity / L.I. Shlush, D. Hershkovitz // *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. – 2015. – Vol. 35. – P. e662–e665. – DOI: 10.14694/EdBook\_AM.2015.35.e662.

48. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival / A.I. Phipps, P.J. Limburg, J.A. Baron [et al.] // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 148, No 1. – P. 77–87.e2. – DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.038.
49. Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity / G. Stanta, S. Bonin // *Frontiers in Medicine*. – 2018. – Vol. 5. – P. 85. – DOI: 10.3389/fmed.2018.00085.
50. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes / M.S. Lawrence, P. Stojanov, P. Polak [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 499, No 7457. – P. 214–218. – DOI: 10.1038/nature12213.
51. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia / D.A. Landau, S.L. Carter, P. Stojanov [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 152, No 4. – P. 714–726. – DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.019.
52. Application of evolutionary principles to cancer therapy / P.M. Enriquez-Navas, J.W. Wojtkowiak, R.A. Gatenby // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75, No 22. – P. 4675–4680. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1337.
53. Cancer stem cells: an evolving concept / L. V Nguyen, R. Vanner, P. Dirks [et al.] // *Nature Reviews. Cancer*. – 2012. – Vol. 12, No 2. – P. 133–143. – DOI: 10.1038/nrc3184.
54. Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? / D.R. Pattabiraman, R.A. Weinberg // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2014. – Vol. 13, No 7. – P. 497–512. – DOI: 10.1038/nrd4253.
55. Cancer stem cells: the promise and the potential / J.A. Ajani, S. Song, H.S. Hochster [et al.] // *Seminars in Oncology*. – 2015. – Vol. 42, Suppl. 1. – P. S3–S17. – DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.01.001.
56. Tumorigenic cell reprogramming and cancer plasticity: interplay between signaling, microenvironment, and epigenetics / V. Poli, L. Fagnocchi, A. Zippo // *Stem Cells International*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 4598195. – DOI: 10.1155/2018/4598195.
57. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting / K. Eun, S.W. Ham, H. Kim // *BMB Reports*. – 2017. – Vol. 50, No 3. – P. 117–125. – DOI: 10.5483/bmbrep.2017.50.3.222.
58. Trabectedin and camptothecin synergistically eliminate cancer stem cells in cell-of-origin sarcoma models / L. Martinez-Cruzado, J. Tornin, A. Rodriguez [et al.] // *Neoplasia*. – 2017. – Vol. 19, No 6. – P. 460–470. – DOI: 10.1016/j.neo.2017.03.004.
59. Sarcoma stem cell heterogeneity / J. Hatina, M. Kripnerova, K. Houfkova [et al.] // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2019. – Vol. 1123. – P. 95–118. – DOI: 10.1007/978-3-030-11096-3\_7.

60. Cancer Stem Cell Markers in Rhabdomyosarcoma in Children / J. Radzikowska, A.M. Czarnecka, T. Klepacka. [et al.] // *Diagnostics (Basel)*. – 2022. – Vol. 12, No 8 – P. 1895. – DOI: 10.3390/diagnostics12081895.
61. Aldh1 expression and activity increase during tumor evolution in sarcoma cancer stem cell populations / L. Martinez-Cruzado, J. Tornin, L. Santos [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 27878. – DOI: 10.1038/srep27878.
62. ALDH as a stem cell marker in solid tumors / M.E. Toledo-Guzmán, M.I. Hernández, Á.A. Gómez-Gallegos, E. Ortiz-Sánchez // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 14, No 5. – P. 375–388. – DOI: 10.2174/1574888X13666180810120012.
63. Retinal targets ALDH positive cancer stem cell and alters the phenotype of highly metastatic osteosarcoma cells / X. Mu, S. Patel, D. Mektepbayeva [et al.] // *Sarcoma*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 784954. – DOI: 10.1155/2015/784954.
64. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is a potential marker for cancer stem cells in embryonal rhabdomyosarcoma / K. Nakahata, S. Uehara, S. Nishikawa [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, No 4. – P. e0125454. – DOI: 10.1038/s41423-019-0306-1.
65. Liposarcoma cells with aldefluor and CD133 activity have a cancer stem cell potential / E.W. Stratford, R. Castro, A. Wennerstrøm [et al.] // *Clinical Sarcoma Research*. – 2011. – Vol. 1, No 1. – P. 8. – DOI: 10.1186/2045-3329-1-8.
66. The role of ALDH in the metastatic potential of osteosarcoma cells and potential ALDH targets / R. Belayneh, K. Weiss // *Adv Exp Med Biol*. – 2020. – Vol. 1258. – P. 157–166. – DOI: 10.1007/978-3-030-43085-6\_10.
67. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker / A.B. Behrooz, A. Syahir, S. Ahmad // *J Drug Target*. – 2019. – Vol. 27, No 3. – P. 257-269. – DOI: 10.1080/1061186X.2018.1479756.
68. Expression of CD133 protein in osteosarcoma and its relationship with the clinicopathological features and prognosis / Y. Xie, J. Huang, M. Wu [et al.] // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. – 2018. – Vol. 14, No 4. – P. 892–895. – DOI: 10.4103/jcrt.JCRT\_461\_17.
69. Humoral immune responses against cancer-testis antigens in human malignancies / M. Astaneh, S. Dashti, Z.T. Esfahani // *Human Antibodies*. – 2019. – Vol. 27, No 4. – P. 237–240. – DOI: 10.3233/HAB-190377.
70. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening / Y.T. Chen, M.J. Scanlan, U. Sahin [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94, No 5. – P. 1914–1918. – DOI: 10.1073/pnas.94.5.1914.

71. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens // L.G. Almeida, N.J. Sakabe, A.R. deOliveira [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. D816-819. – DOI: 10.1093/nar/gkn673.
72. Cancer testis antigens in sarcoma: Expression, function and immunotherapeutic application / R. Wei, D.C. Dean, P. Thanindrarn [et al.] // *Cancer Letters.* – 2020. – Vol. 479. – P. 54–60. – DOI: 10.1016/j.canlet.2019.10.024.
73. X-хромосомные раково-тестикулярные гены / Мисюрин В.А. // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 3–10.
74. Аутосомные раково-тестикулярные гены / Мисюрин В.А. // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 77–82.
75. Emerging contributions of cancer/testis antigens to neoplastic behaviors / Z.A. Gibbs, A.W. Whitehurst // *Trends Cancer.* – 2018. – Vol. 4, No 10. – P. 701–712. – DOI: 10.1016/j.trecan.2018.08.005.
76. Cancer/testis antigens: expression, regulation, tumor invasion, and use in immunotherapy of cancers / A. Salmaninejad, M.R. Zamani, M. Pourvahedi [et al.] // *Immunological Investigations.* – 2016. – Vol. 45, No 7. – P. 619–640. – DOI: 10.1080/08820139.2016.1197241.
77. Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis / Y.-H. Cheng, E.W. Wong, C.Y. Cheng // *Spermatogenesis.* – 2011. – Vol. 1, No 3. – С. 209–220. – DOI: 10.4161/spmg.1.3.17990.
78. Regulation of cancer germline antigen gene expression: implications for cancer immunotherapy / S.N. Akers, K. Odunsi, A.R. Karpf // *Future Oncology.* – 2010. – Vol. 6, No 5. – P. 717–732. – DOI: 10.2217/fon.10.36.
79. Cancer testis antigens and genomic instability: More than immunology / A. Jay, D. Reitz, S.H. Namekawa, W.D. Heyer // *DNA Repair (Amst).* – 2021. – Vol. 108. – P. 103214. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2021.103214.
80. Expression of cancer-testis genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 in patients with multiple myeloma, their influence on overall survival and relapse rate / A.A. Solodovnik, H.S. Mkrtychyan, V.A. Misyurin [et al.] // *Advances in Molecular Oncology.* – 2018. – Vol. 5, No 2. – P. 62–70. – DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-62-70.
81. Cancer/testis antigens expression during cultivation of melanoma and soft tissue sarcoma cells / A. Danilova, V. Misyurin, A. Novik [et al.] // *Clinical Sarcoma Research.* – 2020. – Vol. 10, No 1. – P. 3. – DOI: 10.1186/s13569-020-0125-2.
82. Cancer-testis antigens expressed in osteosarcoma identified by gene microarray correlate with a poor patient prognosis / C. Zou, J. Shen, Q. Tang [et al.] // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118, No 7. – P. 1845–1855. – DOI: 10.1002/cncr.26486.

83. Overexpressed PRAME is a potential immunotherapy target in sarcoma subtypes / J. Roszik, W.-L. Wang, J.A. Livingston [et al.] // *Clinical Sarcoma Research*. – 2017. – Vol. 7. – P. 11. – DOI: 10.1186/s13569-017-0077-3.
84. NY-ESO-1: a promising cancer testis antigen for sarcoma immunotherapy and diagnosis / S.M. Smith, O.H. Iwenofu // *Chin Clin Oncol*. – 2018. – Vol. 7, No 4. – P. 44. – DOI: 10.21037/cco.2018.08.11. PMID: 30173534.
85. Targeting cancer testis antigens in synovial sarcoma / G. Mitchell, S.M. Pollack, M.J. Wagner // *Immunother Cancer*. – 2021. – Vol. 9, No. 6. – P. e002072. – DOI: 10.1136/jitc-2020-002072.
86. First-in-class, first-in-human study evaluating LV305, a dendritic-cell tropic lentiviral vector, in sarcoma and other solid tumors expressing NY-ESO-1 / N. Somaiah, M.S. Block, J.W. Kim [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25, No 19. – P. 5808–5817. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1025.
87. Antitumor activity associated with prolonged persistence of adoptively transferred NY-ESO-1c259T cells in synovial sarcoma / S.P. D’angelo, L. Melchiori, M.S. Merchant [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2018. – Vol. 8, No 8. – P. 944–957. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1417.
88. Molecular mechanisms underpinning sarcomas and implications for current and future therapy / V. Damerell, M.S. Pepper, S. Prince // *Signal Transduct Target Ther*. – 2021. – Vol. 6, No 1. – P. 246. – DOI: 10.1038/s41392-021-00647-8.
89. Mechanisms of sarcomagenesis / I. Matushansky, R.G. Maki // *Hematol Oncol Clin North*. – 2005. – Vol. 19, No 3. – P. 427–449. – DOI: 10.1016/j.hoc.2005.03.006.
90. The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities / J.H. Choi, J.Y. Ro // *Adv Anat Pathol*. – 2021. – No 1. – P. 44–48. – DOI: 10.1097/PAP.0000000000000284.
91. Managing sarcoma: where have we come from and where are we going? / J.S. Bleloch, R.D. Ballim, S. Kimani [et al.] // *Ther Adv Med Oncol*. – 2017. – Vol. 9, No 10. – P. 637–659. – DOI: 10.1177/1758834017728927.
92. Cancer evolution: Darwin and beyond / R. Vendramin, K. Litchfield, C. Swanton // *EMBO J*. – 2021. – Vol. 40, No 18. – P. e108389. – DOI: 10.15252/embj.2021108389.
93. Genetic heterogeneity in rhabdomyosarcoma revealed by SNP array analysis / C. Walther, M. Mayrhofer, J. Nilsson [et al.] // *Genes Chromosomes and Cancer*. – 2016. – Vol. 55, No 1. – P. 3–15. – DOI: 10.1002/gcc.22285.
94. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas / A. Abeshouse, C. Adebamowo, S.N. Adebamowo [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171, No 4. – P. 950–965.e28. – DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.014.

95. Lineage-defined leiomyosarcoma subtypes emerge years before diagnosis and determine patient survival / N.D. Anderson, Y. Babichev, F. Fuligni [et al.] // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12, No 1. – P. 4496. – DOI: 10.1038/s41467-021-24677-6.
96. Практические рекомендации по лечению первичных злокачественных опухолей костей (остеосаркомы, саркомы Юинга). Рекомендации восточно-европейской группы по изучению сарком / А.А. Феденко, А.Ю. Бохан, В.А. Горбунова, А.Н. Махсон, В.В. Тепляков // *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2.* – 2021. – Т. 1. – 17 с.
97. Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma / J.A. Perry, A. Kiezun, P. Tonzi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2014. – Vol. 111, No 51. – P. E5564-5573. – DOI: 10.1073/pnas.1419260111.
98. Digital expression profiling identifies RUNX2, CDC5L, MDM2, RECQL4, and CDK4 as potential predictive biomarkers for neo-adjuvant chemotherapy response in paediatric osteosarcoma / J.W. Martin, S. Chilton-Macneill, M. Koti [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9, No 5. – P. 95843. – DOI: 10.1371/journal.pone.0095843.
99. Genetic and clonal dissection of osteosarcoma progression and lung metastasis / H. Xu, X. Zhu, H. Bao [et al.] // *International J of Cancer.* – 2018. – Vol. 143, No 5. – P. 1134–1142. – DOI: 10.1002/ijc.31389.
100. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors / М.К. Ibragimova, М.М. Tsyganov, N.V. Litviakov // *Biochemistry.* – 2017. – Vol. 82, No 4. – P. 413–425. – DOI: 10.1134/S0006297917040022.
101. Clonal dynamics in osteosarcoma defined by RGB marking / S. Gambera, A. Abarrategi, F. González-Camacho [et al.] // *Nature Communications.* – 2018. – Vol. 9, No 1. – P. 3994. – DOI: 10.1038/s41467-018-06401-z.
102. Tracing Tumor Evolution in Sarcoma Reveals Clonal Origin of Advanced Metastasis / Y.J. Tang, J. Huang, H. Tsushima [et al.] // *Cell Reports.* – 2019. – Vol. 28, No 11. – P. 2837-2850.e5. – DOI: 10.1016/j.celrep.2019.08.029.
103. Multiregion sequencing reveals the genetic heterogeneity and evolutionary history of osteosarcoma and matched pulmonary metastases / D. Wang, X. Niu, Z. Wang [et al.] // *Cancer Research.* – 2019. – Vol. 79, No 1. – P. 7–20. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1086.
104. The clonal evolution of metastatic osteosarcoma as shaped by cisplatin treatment / S.W. Brady, X. Ma, A. Bahrami [et al.] // *Molecular Cancer Research.* – 2019. – Vol. 17, No 4. – P. 895–906. – DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0620.
105. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition / R.I. Freshney // *John Wiley and Sons.* – 2011. – P. 732. – DOI: 10.1002/9780470649367.



106. Genetic Methods of HLA Typing / M. Witt // *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2012. – P. 325–339. – DOI: 10.1007/978-3-642-29467-9\_21
107. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery / S. Breslin, L. O’Driscoll // *Drug Discovery Today*. – 2013. – Vol. 18, No 5–6. – P. 240–249. – DOI: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
108. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells / N.-E. Ryu, S.-H. Lee, H. Park // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, No 12. – P. 1620. – DOI: 10.3390/cells8121620.
109. Single-cell cloning of hybridoma cells by limiting dilution / E.A. Greenfield // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2019. – Vol. 2019, No 11. – P. 726–728. – DOI: 10.1101/pdb.prot103192.
110. Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening / C.H. Chiu, K.F. Lei, W.L. Yeh [et al.] // *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. – 2017. – Vol. 12, No 1. – P. 149. – DOI: 10.1186/s13018-017-0652-6.
111. Evaluation and isolation of cancer stem cells using ALDH activity assay / L. Mele, D. Liccardo, V. Tirino // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 1692. – P. 43–48. – DOI: 10.1007/978-1-4939-7401-6\_4.
112. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource]. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 23.05.2020).
113. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1, No 2. – P. 581–585. – DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
114. Cloning of Human tumor stem cells: background and overview / S.E. Salmon // *Progress in Clinical and Biological Research*. – 1980. – Vol. 48. – P. 3–13.
115. Cancer biology / I.A. Cree // *Methods in molecular biology* Clifton, New York, USA: Springer Science+Business Media LLC. – 2011. – Vol. 731. – P. 518. – DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5\_1.
116. Методы подбора *in vitro* химиопрепаратов для индивидуальной химиотерапии злокачественных новообразований пациентов неонатология и педиатрия / А.Н. Чернов, Е.П. Баранцевич, В.Н. Калюнов [и др.] // *Трансляционная медицина*. – 2018. – Т. 5, № 3. – С. 45–65. – DOI: 10.18705/2311-4495-2018-5-3-45-65.
117. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток: дисс. ... кандидата мед. наук: 14.01.12/14.03.09 / Нехаева Татьяна Леонидовна. – СПб., 2014. – 174 с.
118. Дендритные клетки, активированные раковотестикулярными антигенами (рта+), в лечении метастатических сарком мягких тканей / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, А.В. Новик [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2014. – Т. 60, № 6. – С. 700–706.

119. NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a Data Set / M. Charrad, N. Ghazzali, V. Boiteau [et al.] // *Journal of Statistical Software*. – 2014. – Vol. 61, No 6. – P. 1–36. – DOI: 10.18637/jss.v061.i06.
120. The Allele Frequency Net Database – Allele, haplotype and genotype frequencies in Worldwide Populations [Electronic resource]. – URL: <http://www.allelefrequencies.net/> (дата обращения: 23.05.2020).
121. Correlation of HLA-A02\* genotype and HLA class I antigen down-regulation with the prognosis of epithelial ovarian cancer / E. Andersson, L. Villabona, K. Bergfeldt [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2012. – Vol. 61, No 8. – P. 1243–1253. – DOI: 10.1007/s00262-012-1201-0.
122. Human leukocyte antigen class I and class II polymorphisms and serum cytokine profiles in cervical cancer / L. Bahls, R. Yamakawa, K. Zanão [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, No 9. – P. 1478. – DOI: 10.3390/ijms18091478.
123. Distribution of HLA antigens in breast cancer / B. Bayraktar, E. Yilmaz, O. Bayraktar [et al.] // *Bratislava Medical Journal*. – 2012. – Vol. 113, No 6. – P. 372–375. – DOI: 10.4149/bll\_2012\_084.
124. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium / G.O. Gey, W.D. Coffman, M.T. Kubicek // *Cancer Research*. – 1952. – Vol. 12. – P. 264–265.
125. Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies / X. Pan, A. Yoshida, A. Kawai [et al.] // *Expert Review of Proteomics*. – 2016. – Vol. 13, No 2. – P. 227–240. – DOI: 10.1586/14789450.2016.1132166.
126. Organoids in cancer research / J. Drost, H. Clevers // *Nature Reviews Cancer*. – 2018. – Vol. 18, No 7. – P. 407–418. – DOI: 10.1038/s41568-018-0007-6.
127. Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? / A.F. Gazdar, B. Gao, J.D. Minna // *Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 68, No 3. – P. 309–318. – DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.12.005.
128. Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models / K.M. Vincent, L.M. Postovit // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, No 6. – P. 10498–10509. – DOI: 10.18632/oncotarget.14443.
129. Systematic Review of the Current Status of Human Sarcoma Cell Lines / E. Hattori, R. Oyama, T. Kondo // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, No 2. – P. 157. – DOI: 10.3390/cells8020157.
130. Establishment and molecular characterisation of seven novel soft-tissue sarcoma cell lines / A. Salawu, M. Fernando, D. Hughes [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 115, No 9. – P. 1058–1068. – DOI: 10.1038/bjc.2016.259.
131. Updates from the 2020 World Health Organization Classification of Soft Tissue and Bone Tumours / W.J. Anderson, L.A. Doyle // *Histopathology*. – 2021. – Vol. 78, No 5. – P. 644–657. – DOI: 10.1111/his.14265.

132. Получение и характеристика новых клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком для трансляционных исследований / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, В.А. Мисюрин [и др.] // *Гены & клетки*. – 2020. – Т. 15, № 3. – С. 92–107. – DOI: 10.23868/202011014.
133. Establishment of a novel cellular model for myxofibrosarcoma heterogeneity / B. Lohberger, N. Stundl, A. Leithner [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 44700. – DOI: 10.1038/srep44700.
134. 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 [et al.] // *Pathology – Research and Practice*. – 2021. – Vol. 2017. – P. 153214. – DOI: 10.1016/j.prp.2020.153214.
135. A catalog of HLA type, HLA expression, and neoepitope candidates in human cancer cell lines / S. Boegel, M. Löwer, T. Bukur [et al.] // *OncoImmunology*. – 2014. – Vol. 3, No 8. – P. e954893. – DOI: 10.4161/21624011.2014.954893.
136. Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy / O. Gordeeva // *Seminars in Cancer Biology*. – 2018. – Vol. 53. – P. 75–89. – DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.006.
137. Cancer testis antigens and immunotherapy: Where do we stand in the targeting of PRAME? / G. Al-Khadairi, J. Decock // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, No 7. – P. 984. – DOI: 10.3390/cancers11070984.
138. Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma / P. Tan, C. Zou, B. Yong [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2012. – Vol. 419, No 4. – P. 801–808. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.110.
139. PAS Domain Containing Repressor 1 (PASD1) promotes glioma cell proliferation through inhibiting apoptosis in vitro / R. Li, M. Guo, L. Song // *Medical Science Monitor*. – 2019. – Vol. 25. – P. 6955–6964. – DOI: 10.12659/MSM.916308.
140. Cancer-testis antigen SLLP1 represents a promising target for the immunotherapy of multiple myeloma / S. Yousef, J. Heise, N. Lajmi [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13. – P. 197. – DOI: 10.1186/s12967-015-0562-5.
141. Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma / F. Zhou, Y.D. Mu, J. Liang [et al.] // *Oncology Letters*. – 2014. – Vol. 7, No 2. – P. 507–512. – DOI: 10.3892/ol.2013.1723.
142. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells / G.Y. Liou // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2019. – Vol. 106. – P. 1–7. – DOI: 10.1016/j.biocel.2018.10.013.
143. Clinical implications of cancer stem cells in digestive cancers: acquisition of stemness and

- prognostic impact / R. Tsunedomi, K. Yoshimura, N. Suzuki [et al.] // *Surg Today*. – 2020. – Vol. 50, No 12. – P. 1560–1577. – DOI: 10.1007/s00595-020-01968-x.
144. Expression of nestin, CD133 and ABCG2 in relation to the clinical outcome in pediatric sarcomas / I. Zambo, M. Hermanova, D. Zapletalova [et al.] // *Cancer Biomarkers*. – 2016. – Vol. 17, No 1. – P. 107–116. – DOI: 10.3233/CBM-160623.
145. CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres / D. Walter, S. Satheesha, P. Albrecht [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, No 5. – P. e19506. – DOI: 10.1371/journal.pone.0019506.
146. CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study / A. He, W. Qi, Y. Huang [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2012. – Vol. 4, No 3. – P. 435–441. – DOI: 10.3892/etm.2012.603.
147. Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers CD133 and CXCR4 in Osteosarcomas / A. Mardani, E. Gheytauchi, S.H. Mousavie [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2020. – Vol. 21, No 1. – P. 67–73. – DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.1.67.
148. Evaluation of expression of cancer stem cell markers and fusion gene in synovial sarcoma: Insights into histogenesis and pathogenesis / Y. Zhou, D. Chen, Y. Qi [et al.] // *Oncology Reports*. – 2017. – Vol. 37, No 6. – P. 3351–3360. – DOI: 10.3892/or.2017.5617.
149. Lipid-polymer nanoparticles with CD133 aptamers for targeted delivery of all-trans retinoic acid to osteosarcoma initiating cells / K. Gui, X. Zhang, F. Chen [et al.] // *Biomed Pharmacother*. – 2019. – Vol. 111. – P. 751–764. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.118.
150. 3D culture modelling: An emerging approach for translational cancer research in sarcomas / V. Heredia-Soto, A. Redondo, J.J.P. Kreilinger [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 27, No 29. – P. 4778–4788. – DOI: 10.2174/0929867326666191212162102.
151. Sarcoma spheroids and organoids – promising tools in the era of personalized medicine / G. Colella, F. Fazioli, M. Gallo [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, No 2. – P. 615. – DOI: 10.3390/ijms19020615.
152. Extracellular vesicles secreted by highly metastatic clonal variants of osteosarcoma preferentially localize to the lungs and induce metastatic behaviour in poorly metastatic clones / R. Macklin, H. Wang, D. Loo [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, No 28. – P. 43570–43587. – DOI: 10.18632/oncotarget.9781.
153. PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma / A. Bernat-Peguera, P. Simón-Extremera, V. da Silva-Diz [et al.] // *Oncogene*. – 2019. – Vol. 38, No 25. – P. 5021–5037. – DOI: 10.1038/s41388-019-0773-y.
154. Establishment and characterization of 5-fluorouracil-resistant human colorectal cancer stem-like cells: tumor dynamics under selection pressure / M.G. Francipane, D. Bulanin, E. Lagasse [et al.] //

- International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, No 8. – P. 1817. – DOI: 10.3390/ijms20081817.
155. ALDH activity correlates with metastatic potential in primary sarcomas of bone / N. Greco, T. Schott, X. Mu [et al.] // *Journal of Cancer Therapy*. – 2014. – Vol. 5, No 4. – P. 331–338. – DOI: 10.4236/jct.2014.54040.
156. ALDH1A1 in patient-derived bladder cancer spheroids activates retinoic acid signaling leading to TUBB3 overexpression and tumor progression / T. Namekawa, K. Ikeda, K. Horie-Inoue [et al.] // *International J Cancer*. – 2020. – Vol. 146, No 4. – P. 1099–1113. – DOI: 10.1002/ijc.32505.
157. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker / A. Barzegar Behrooz, A. Syahir, S. Ahmad // *Drug Target*. – 2019. – Vol. 27, No 3. – P. 257–269. – DOI: 10.1080/1061186X.2018.1479756.
158. Cancer stem cell (a)symmetry & plasticity: tumorigenesis and therapy relevance / M. Najafi, K. Mortezaee, R. Ahadi // *Life Sciences*. – 2019. – Vol. 231. – P. 116520. – DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.076.
159. The CD133+ subpopulation of the SW982 human synovial sarcoma cell line exhibits cancer stem-like characteristics / A. Liu, B. Feng, W. Gu [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2013. – Vol. 42, No 4. – P. 1399–1407. – DOI: 10.3892/ijo.2013.1826.
160. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response / U. Ben-David, B. Siranosian, G. Ha [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 560, No 7718. – P. 325–330. – DOI: 10.1038/s41586-018-0409-3.
161. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type / S. Vgenopoulou, A.C. Lazaris, C. Markopoulos [et al.] // *Breast*. – 2003. – Vol. 12, No 3. – P. 172–178. – DOI: 10.1016/s0960-9776(03)00004-3.
162. Immune profiles of desmoplastic small round cell tumor and synovial sarcoma suggest different immunotherapeutic susceptibility upfront compared to relapse specimens / M.F. Wedekind, K.B. Haworth, M. Arnold [et al.] // *Pediatric Blood and Cancer*. – 2018. – Vol. 65, No 11. – P. e27313. – DOI: 10.1002/pbc.27313.
163. Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells / M.F. Santos, V.K.R. Mannam, B.S. Craft [et al.] // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2014. – Vol. 96, No 3. – P. 367–374. – DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.04.001.
164. Clinical and immunological characteristics of sarcomas patients with clonogenic tumors / N.A. Avdonkina, A.B. Danilova, T.L. Nekhaeva [et al.] // *Immunobiology*. – 2021. – Vol. 226, No 4. – P. 152094. – DOI: 10.1016/j.imbio.2021.152094.
165. Molecular mechanisms of HLA class I-mediated immune evasion of human tumors and their role

in resistance to immunotherapies / B. Seliger // HLA. – 2016. – Vol. 88, No 5. – P. 213–220. – DOI: 10.1111/tan.12898.

166. Иммунологические аспекты метрономных режимов химиотерапии / Н.А. Ефремова, А.В. Новик, А.Ю. Зозуля [и др.] // Фарматека. – 2021. – Т. 28, № 7. – P. 81–86. – DOI: 10.18565/pharmateca.2021.7.81-86.