

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Петрова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Пипиа  
Нино Петровна**

**Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в  
опухолевом микроокружении *in vitro***

Специальность: 14.01.12 – онкология (медицинские науки)  
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология  
(медицинские науки)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата  
медицинских наук

**Научный руководитель: д.м.н. И.А. Балдуева**

Санкт-Петербург

2018 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ: .....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Глава 1 Современные представления о биологии сарком мягких тканей их роль в развитии опухоли и причины резистентности к различным видам лечения .....	13
1.1 Современная концепция опухолевого роста. Роль опухолевого микроокружения.....	13
1.1.1 Понятие и роль опухолевого микроокружения.....	13
1.1.2 Стромальные клетки опухоли, внеклеточный матрикс, ангиогенез .....	13
1.1.3 Иммунное опухолевое микроокружение .....	14
1.1.4 Механизмы ускользания от иммунного надзора, иммуносупрессия.....	16
1.1.5 Биологические молекулы в иммунном микроокружении опухоли.....	19
1.1.6 Опухолевое микроокружение сарком мягких тканей.....	25
1.2 Сведения об эпидемиологии сарком мягких тканей.....	27
1.2.1 Эпидемиология сарком мягких тканей .....	27
1.2.2 Классификация сарком мягких тканей.....	27
1.2.3 Локализация, рецидивирование и метастазирование сарком мягких тканей.....	28
1.3 Современное представление о лечении сарком мягких тканей.....	29
1.3.1 Хирургическое лечение .....	29
1.3.2 Лучевая терапия .....	29
1.3.3 Химиотерапия.....	30
1.3.4 Недостатки стандартной терапии сарком мягких тканей .....	32
1.4 Место иммунотерапии для лечения сарком мягких тканей.....	33
1.4.1 Цитокины .....	34
1.4.2 Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа .....	34
1.4.3 Адоптивная Т-клеточная терапия.....	35
1.4.4 Вакциноterapia.....	35
1.5 Заключение .....	37
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	38
2.1 Материалы .....	38
2.1.1 Характеристика пациентов, которые были включены в исследование .....	38
2.2 Методы .....	42
2.2.1 Приготовление аутологичной дендритноклеточной вакцины.....	42

2.2.2 Изучение клеток иммунной системы у больных с саркомами мягких тканей методом проточной цитометрии. ....	45
2.2.3 Получение клеточных культур сарком мягких тканей.....	49
2.2.4 Иммуноферментный анализ содержания хемокинов в супернатантах клеточных культур сарком мягких тканей .....	50
2.2.5 Мультиплексный анализ панели онкомаркеров в супернатантов культур опухолевых клеток .....	50
2.2.6 Изучение пролиферативной активности и индивидуальной химиочувствительности культур клеток сарком мягких тканей в аналитической системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ.....	52
2.2.7 Моделирование опухолевого микроокружения <i>in vitro</i> путем воздействия зрелых дендритных клеток, мононуклеаров и различных цитокинов на первичные культуры и клеточные линии сарком мягких тканей в аналитической системе xCELLigence® .....	56
2.2.8 Статистическая обработка результатов .....	59
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	60
3.1 Прогнозирование реакции метастатических сарком мягких тканей на химиотерапевтические агенты в аналитической системе долговременной фазово-контрастной микроскопии CELL-IQ	60
3.2 Моделирование опухолевого микроокружения <i>in vitro</i> путем воздействия зрелых дендритных клеток, мононуклеаров и различных цитокинов на первичные культуры и клеточные линии сарком мягких тканей в аналитической системе xCELLigence® RTCA DP.....	77
3.3 Аутологичная дендритно-клеточная вакцина «CaTeVac» на основе раково-тестикулярных антигенов для лечения больных саркомами мягких тканей .....	89
3.4 Изучение иммуносупрессивного потенциала Т-регуляторных лимфоцитов в процессе опухолевой прогрессии у больных саркомами мягких тканей.....	107
3.5 Мультиплексный анализ панели онкомаркеров в супернатантах клеточных культур больных саркомами мягких тканей.....	116
Заключение.....	137
Выводы.....	139
Список литературы .....	141

**ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

АПК – антиген-презентирующие клетки  
ВБП – выживаемость без прогрессирования  
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа  
ГИСО – гастроинтестинальная стромальная опухоль  
ДИ – доверительный интервал  
ДК – дендритные клетки  
ЗНО – злокачественные новообразования  
ИКР – интерквартильный размах  
ИРХ - изолированная регионарная химиоперфузия  
ИС – иммунный статус  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КТ – компьютерная томография  
ПЭТ-КТ – позитронно-эмиссионная томография  
ЛИ - летальный исход  
ЛТ – лекарственная терапия  
мг – миллиграмм  
МЕ – международные единицы  
мкл – микролитр  
мл – миллилитр  
млн – миллион  
МНК – мононуклеары периферической крови  
НЯ – нежелательные явления  
ОАА – опухлеассоциированные антигены  
ОАМ – опухлеассоциированные макрофаги  
ОАН – опухлеассоциированные нейтрофилы  
ОВ – общая выживаемость  
ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты  
ОР – отношение рисков  
пг – пикограмм  
ПЗ – прогрессирование заболевания  
ПР – полный регресс  
РМ - ремиссия  
РТА – раково-тестикулярные антигены  
СВ – средний возраст

СЗ – стабилизация заболевания

СКХ – саркома костей и хрящей

СМТ – саркома мягких тканей

ХТ – химиотерапия

ХТ «А» (+) – антрациклинсодержащие схемы химиотерапии

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЧР – частичный регресс

АI – схема химиотерапии, включающая доксорубицин и ифосфамид

АКТ – протеинкиназы В (protein kinase B)

АР – схема химиотерапии, включающая доксорубицин с цисплатином

ССL – С-С-хемокиновый лиганд (С-С motif ligand)

ССР – С-С-хемокиновый рецептор (С-С motif receptor)

CD – кластер дифференцировки

СМ – схема химиотерапии, включающая циклофосфамид с метотрексатом в метронном режиме

СОР – схема химиотерапии, включающая циклофосфамид, цисплатин и винкристин

СР – схема химиотерапии, включающая карбоплатин и паклитаксел

СТLА-4 – антиген цитотоксических Т-лимфоцитов-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

СХСL – С-Х-С-хемокиновый лиганд (С-Х-С motif ligand)

СХСR – С-Х-С-хемокиновый рецептор (С-Х-С motif receptor)

СуVADIC – схема химиотерапии, включающая циклофосфамид, винкристин, доксорубицин, дакарбазин

EGF – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

ESFT – опухоль из семьи саркомы Юинга

FAS – антиген апоптоза 1 (apoptosis antigen 1)

FGFb – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

FOXP3 – ядерный фактор транскрипции Forkhead P3

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony stimulating factor)

GemTаx – схема химиотерапии, включающая гемцитабин и доцетаксел

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)

НВ-EGF – гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (heparin-binding EGF-like growth factor)

HGF – фактора роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor)  
HIF – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor)  
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigen)  
IDO – индоламин 2,3-диоксигеназа (indoleamine-2,3-dioxygenase)  
IE – схема химиотерапии, включающая ифосфамид и этопозид  
IFN – интерферон  
IGFBP-1 – белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor-binding protein 1)  
IL – интерлейкин  
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (inducible nitric oxide synthase)  
LAG-3 – белок, ассоциированный с геном активации лимфоцитов-3 (Lymphocyte-activation gene 3)  
LAK – лимфокин-активированные киллеры (lymphokine-activated killers)  
mAB – моноклональные антитела (monoclonal antibodies)  
MAGE-1 – антиген меланомы 1 (melanoma antigen-1)  
MAID – ифосфамид, доксорубин, дакарбазин  
M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор (macrophage colony stimulating factor)  
MDSC – супрессорные клетки миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells)  
MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)  
MIP1 $\alpha$  – макрофагальный воспалительный белок 1 альфа (macrophage inflammatory protein 1 alpha)  
MMP – матриксная металлопротеиназа (matrix metalloproteinase)  
NKG2D – рецептор NK-клеток группы 2D (natural killer group 2D receptor)  
NK-клетки – естественные киллеры (natural killer)  
PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена-1 (plasminogen activator inhibitor-1)  
PD-1 – белок запрограммированной гибели клеток-1 (programmed cell death protein 1)  
PDGF-AB/BB - тромбоцитарный фактор роста AB/BB  
PD-L1 – лиганд PD-1  
PECAM-1 – молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов 1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1)  
PGE2 – простагландин E2 (prostaglandin E2)  
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (phosphoinositide 3-kinase)  
PLGF – плацентарный фактор роста (placental growth factor)  
sCD40L – растворимый лиганд CD40

SCF – фактор стволовых клеток (stem cell factor)

sEGFR – растворимый рецептор EGF

sFASL – растворимый лиганд FAS

sHER2-neu – растворимый рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (soluble human epidermal growth factor receptor 2)

sIL-6Ra – растворимая  $\alpha$ -субъединица рецептора IL-6

STAT – сигнальный белок и активатор транскрипции (signal transducer and activator of transcription)

sVEGFR-1, -2 – растворимый рецептор VEGF

TCR – T cell receptor

TDO – триптофан-2,3-диоксигеназа (tryptophan 2,3-dioxygenase)

TGF – трансформирующий ростовой фактор (transforming growth factor)

TIE-2 – рецептор ангиопоэтина-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2)

TIM-3 – Т-клеточный иммуноглобулин-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain 3)

TNFR – рецептор фактора некроза опухоли

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor)

Treg – регуляторные Т-лимфоциты

Th – Т-хелперы

uPA – урокиназный активатор плазминогена (urokinase-type plasminogen activator)

VEGF-A, -C, -D – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Саркомы мягких тканей (СМТ) представляют собой редкие гетерогенные опухоли мезенхимального происхождения, в начале заболевания часто локализованные, для которых хирургическая резекция является основным методом лечения. Однако, несмотря на оптимальное хирургическое лечение, у значительной части пациентов развиваются рецидивирующие и метастатические формы заболевания. Для этих пациентов, имеющиеся варианты лечения довольно-таки ограничены [247]. Это связано с гистологической гетерогенностью, генетическими абберациями, которые запускают опухолевый процесс, локализацией СМТ в организме человека, что создает трудности в классификации и разработке новых методов лечения.

Стандартная терапия метастатических СМТ основана на химиотерапии (доксорубин, ифосфамид, дакарбазин, гемцитабин/доцетаксел), которая сопровождается нежелательными явлениями (токсичностью), угнетает иммунную систему и редко приводит к излечению. При стандартной химиотерапии медиана общей выживаемости у этой категории больных составляет в среднем от 1,5 до 2 лет.

Недавно в США FDA (Food and drug administration) зарегистрировали новый препарат пазопаниб [147], трабектидин [85] и эрибулин [148, 225] для лечения метастатической формы СМТ. Эти лекарственные препараты увеличивают время до прогрессирования и общую выживаемость больных метастатическими СМТ, но не приводят к длительным ремиссиям и излечению.

Значительный прогресс в изучении биологии солидных опухолей (меланома кожи, рак почки, рак предстательной железы, рак легкого и др.) распространяется и на СМТ, однако до настоящего времени прогноз при этом заболевании остается неблагоприятным. В связи с этим актуальным становится изучение иммунобиологических феноменов, которые наблюдаются у пациентов СМТ в процессе стандартной химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии, а также определение значимых мишеней для терапии на молекулярном уровне не только при воздействии на опухолевые клетки, но и на компоненты опухолевого микроокружения [187].

Таким образом, мировые достижения в области лекарственного лечения СМТ в настоящее время оставляют широкую нишу для изучения взаимоотношения опухоли, иммунной системы и опухолевого микроокружения, и разработки обоснованных иммунотерапевтических подходов с целью элиминации выживших клонов опухолевых клеток после стандартного лечения метастатических СМТ.



### **Степень разработанности темы**

Впервые взаимоотношения между опухолью и микроокружением были описаны S. Paget (1889). G. Klein (1960) определил роль противоопухолевого иммунного ответа, положив начало изучению иммунного микроокружения опухоли. В настоящее время интерес вызывает определение субпопуляций эффекторных и супрессорных иммунокомпетентных клеток, их значение в элиминации опухоли, а также в ее «ускользании» от иммунного надзора. Существенный вклад в развитие этой темы внесли T. Boon (1991), O.J. Finn (2003), S.A. Rosenberg (2005), R.D. Schreiber (2011) и другие.

С момента первых попыток вакцинотерапии сарком, предпринятых Вильямом Коли (William B. Coley) в 1891 году, в этой области накоплен значительный практический опыт. Разработкой противоопухолевых вакцин для лечения сарком занимались R.C. Marcove (1970), J.D. Geiger (2001), R. Dagher (2004), C.L. Mackall (2008), S.E. Finkelstein (2012), S. Xie (2014) и др. В Научном отделе онкоиммунологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова под руководством д.м.н. И.А. Балдуевой уже более 20 лет активно изучается применение ДК-вакцин для лечения солидных опухолей, в том числе СМТ.

### **Цель исследования**

Экспериментальное и клиническое обоснование создания моделей опухолевого микроокружения *in vitro* для разработки способов повышения эффективности и индивидуализации лечения больных метастатическими формами СМТ.

### **Задачи исследования**

1. Изучить взаимодействие лимфоцитов, цитокинов, аутологичных дендритноклеточных вакцин (ДК-вакцин), цитостатиков в моделируемом микроокружении опухолевых клеток больных СМТ в экспериментальных аналитических системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence.
2. Произвести поиск взаимосвязи биологических маркеров, продуцируемых опухолевыми клетками СМТ при культивировании *in vitro* в системе мультиплексного анализа Bioplex Pro 200.
3. Изучить рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) в зависимости от продукции опухолевыми клетками метастатических СМТ ростовых факторов и хемокинов в условиях *in vitro*.
4. Изучить цитотоксическую и супрессорную активность основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных СМТ в зависимости от активности опухолевого процесса.

5. Изучить влияние противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac» на эффекторную функцию лимфоцитов у больных метастатическими формами СМТ.

#### **Научная новизна в диссертационной работе**

- Созданы экспериментальные модели опухолевого микроокружения *in vitro* на основе изучения взаимодействия метастатических культур СМТ с клетками иммунной системы в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence.
- Определены взаимосвязи биологических маркеров, продуцируемых опухолевыми клетками СМТ при культивировании *in vitro*.
- Изучена цитотоксическая и супрессорная активность лимфоцитов, рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов периферической крови больных СМТ в зависимости от активности опухолевого процесса и применения противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac».

#### **Научная и практическая значимость работы**

1. Выявлены сложные взаимосвязи клеток иммунного микроокружения СМТ, опухолевых клеток, продуцируемых ими биологически активных веществ *in vitro*, что получило отражение в формировании иммунного ответа и эффективности иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» собственного производства *in vivo*.
2. Результаты работы позволили оптимизировать лечение метастатических форм СМТ, прогрессирующих после стандартной химиотерапии «первой линии», и увеличить общую выживаемость с помощью индивидуализации иммунотерапии «второй» и последующих линий терапии.

#### **Материалы и методы исследования**

Материалом для исследования служили образцы лимфоцитов периферической крови, метастатические культуры СМТ, клеточные линии СМТ, цитостатики, ДК-вакцины, цитокины.

Культуральные методы: автоматизированная дезагрегация образцов аутологичной опухоли, получение культуры опухолевых клеток, культивирование *in vitro* для получения клеточных линий, использование аналитических систем для длительного наблюдения за живыми клетками *in vitro* xCELLigence и автоматизированного анализа множественных параметров клеток с применением технологий машинного видения (распознавания образов) Cell-IQ.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием IBM SPSS 19.0, R и Microsoft Excel 2010. Этап предварительного анализа осуществлялся при помощи модуля Описательные статистики.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Моделирование опухолевого микроокружения *in vitro* в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence отражает развитие событий максимально приближенных к событиям *in vivo*.
2. Посредством описательных статистик и корреляционного анализа продемонстрирована сложная взаимосвязь клеток иммунного микроокружения СМТ, опухолевых клеток, продуцируемых ими биологически активных веществ.
3. Изучение дендритноклеточной вакцины «CaTeVac» в экспериментальных моделях опухолевого микроокружения СМТ позволило экстраполировать противоопухолевую активность ДК-вакцины *in vivo* и усилить цитотоксический эффект лимфоцитов в присутствии IL-2 *in vitro*.
4. Увеличение общей выживаемости больных распространенными или метастатическими формами СМТ с 25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес) до 34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес) в группе «CaTeVac» (Log-Rank  $p=0,036$ , Breslow  $p=0,006$ ) зарегистрировано при использовании противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac» во «второй» и последующих линиях лекарственного лечения.

### **Степень достоверности и апробации результатов**

Основные положения диссертации представлены на II Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи—2016» (Санкт-Петербург, 20-24 июня 2016 г.), VI Всероссийском конкурсе научных работ молодых ученых (Санкт-Петербург, 23 марта 2016 года), VII Всероссийском конкурсе научных работ молодых ученых (Санкт-Петербург, 22 марта 2017 г.), International Scientific and Practical Conference “Innovative technologies in traumatology and orthopedics. New opportunities in oncoorthopedics and oncology” II EAFO Musculoskeletal & Secondary Tumors Forum/XXIX EAFO Oncopathology Seminar “Bone, Soft Tissue & Metastatic Tumors” In Collaboration with Skolkovo Foundation (Moscow Region, 26-28 may, 2017), III Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи—2017» (Санкт-Петербург, 23-25 июня 2017 г.), XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (29-30 марта 2018 г.), The

Second International Conference “Cell Technologies At The Edge: Research & Practice” (CTERP) Translational Research In Cell Therapy (Moscow, April 11-13, 2018), “Annual Congress of The European Society for Medical Oncology” ESMO 2018 (Munich, Germany 19-23 October 2018).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 168 страницах и состоит из 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 272 источников, из них 29 отечественных и 243 зарубежных изданий. Диссертация содержит 17 таблиц и иллюстрирована 62 рисунками.

## Глава 1

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОЛОГИИ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ, ПРИЧИНЫ РЕЗИСТЕНТОСТИ К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ ЛЕЧЕНИЯ

### 1.1 Современная концепция опухолевого роста. Роль опухолевого микроокружения

#### 1.1.1 Понятие и роль опухолевого микроокружения

Опухолевый метаморфизм – сложный динамический процесс, включающий рост, эволюцию и диссеминацию злокачественного новообразования за счет приобретения характерных признаков (постоянная пролиферация, избегание супрессоров роста, репликативное бессмертие, индукция ангиогенеза, способность к инвазии и метастазированию) [121]. В настоящее время редукционистский подход, рассматривающий опухоль как совокупность злокачественных клеток, уступил место современной концепции опухолевого роста, которая подразумевает тесное взаимодействие опухолевых клеток с окружающей средой [120]. Не подвергаясь злокачественному перерождению, клетки, непосредственно взаимодействующие с опухолью, меняют свой фенотип, помогая ей получать необходимые питательные вещества, защищая от уничтожения иммунной системой, а также привлекая новых членов микроокружения путем выработки сигнальных молекул.

В опухолевом микроокружении выделяют опухолеассоциированные фибробласты и внеклеточный матрикс, составляющие строму опухоли, эндотелиоциты и перициты, формирующие кровеносные сосуды, а также иммунные и воспалительные клетки [52, 91, 104, 135]. Оно представляет собой сложную динамическую среду, в которой злокачественные и неопухолевые клетки взаимодействуют между собой непосредственно и с помощью растворимых факторов. Накопленные данные свидетельствуют о том, что эти взаимодействия играют важную роль в развитии опухоли, ее поведении и ответе на противоопухолевую терапию [104, 135].

#### 1.1.2 Стромальные клетки опухоли, внеклеточный матрикс, ангиогенез

Опухолеассоциированные фибробласты (ОАФ) играют важную роль в росте опухоли, стимулируя пролиферацию злокачественных клеток путем продукции ростовых факторов и цитокинов [52, 84, 104]. Среди секретируемых веществ фактор роста гепатоцитов (HGF), факторы роста фибробластов (FGFs) и СХС-хемокиновый лиганд-12 (CXCL12), которые не только способствуют росту и выживанию опухоли, но и являются хемоаттрактантами для других клеток [84, 122]. Кроме того, для стромальных клеток опухоли характерна аутофагия, которая

связана с резистентностью опухоли к химиотерапии (ХТ) [268]. Также ОАФ могут влиять на свойства внеклеточного матрикса в первичных опухолях, способствуя их метастазированию [52]. Внеклеточный матрикс опухоли состоит из фибриллярных белков (коллагена, эластина, фибронектина и др.), протеогликанов (хондроитинсульфата, кератинсульфата, гиалуроновой кислоты и др.) и ряда других молекул. Как и в нормальной ткани, он формирует жесткий каркас, обеспечивает пролиферацию, рост, адгезию и миграцию клеток [52]. Также внеклеточный матрикс способствует поддержанию необходимого уровня ростовых факторов в опухоли и передаче сигналов, важных для роста и выживания опухоли [135].

Фолькман Д.М., американский цитолог и онколог, в 1971 г. впервые сформулировал гипотезу, о необходимости формирования кровеносных сосудов для роста солидных опухолей [103]. Сегодня показано, что кровоснабжение растущей опухоли осуществляется за счет ангиогенеза, который заключается в формировании новых кровеносных сосудов из существующих, и васкулогенеза – образования новых сосудов путем привлечения циркулирующих эндотелиальных предшественников [182]. Регулятором ангиогенеза является фактор, индуцируемый гипоксией (HIF), также задействованы такие молекулы, как факторы роста эндотелия сосудов (VEGFs), FGFs, тромбоцитарный фактор роста  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ), ангиопэтин, нейропинин и другие [52]. Показано, что опухолеассоциированные фибробласты способны стимулировать ангиогенез путем продукции FGFb и VEGF-A [52, 182].

### 1.1.3 Иммунное опухолевое микроокружение

В опухолевом микроокружении можно обнаружить все типы клеток врожденного и специфического иммунитета, включая макрофаги, дендритные клетки (ДК), естественные киллеры (НК-клетки), В-лимфоциты, а также различные субпопуляции эффекторных Т-лимфоцитов, включая Т-хелперы 1, 2 и 17 (Th1, Th2, Th17), регуляторные Т-лимфоциты (Treg) и цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) [52, 104, 118, 184, 208, 253]. Присутствие клеток иммунной системы в опухоли обеспечивает противоопухолевый неспецифический и антигенспецифический адаптивный иммунный ответ, который направлен на ее уничтожение [104].

#### *1.1.3.1 Клетки врожденного иммунитета*

Антиген-независимый иммунный ответ опосредован НК-клетками. Естественные киллеры привлекаются в опухоль различными сигналами, среди которых лиганды NKG2D рецептора [181, 236]. Первичной задачей НК-клеток является уничтожение клеток, которые утратили экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС) I класса, что часто связано с злокачественной

трансформацией [236]. Также они способны атаковать опухолевые клетки при активации рецепторов естественной цитотоксичности, некоторые из которых стимулируются ИЛ-2 [157, 175], а также к антителозависимой цитотоксичности [175]. Для многих опухолей обнаружение НК-клеток в опухолевом микроокружении связано с благоприятным прогнозом [67]. Однако содержание этих клеток повышается главным образом на ранних стадиях заболевания [13] снижается при отдаленных метастазах [9]. Также неспецифический иммунный ответ осуществляется фагоцитирующими клетками, такими как макрофаги и нейтрофилы [236].

#### *1.1.3.2 Клетки адаптивного иммунитета*

Основным компонентом иммунного опухолевого микроокружения являются опухолеинфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ), включающие CD3+CD4+ Т-хелперы и CD3+CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты, а также CD20+ В-лимфоциты [43, 118]. Существуют работы, показывающие связь инфильтрации опухоли В-клетками с улучшением безрецидивной выживаемости [235]. Однако большинство исследований сфокусировано на Т-лимфоцитах как основных эффекторах противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что инфильтрация новообразования Т-клетками является благоприятным прогностическим фактором при меланоме, раке яичника, почечноклеточном раке, раке мочевого пузыря и некоторых других солидных опухолях [118]. В мета-анализе, изучающем клиническое значение ОИЛ, наличие в опухоли CD3+ Т-лимфоцитов, а также CD8+ клеток было ассоциировано с улучшением выживаемости [111]. Инфильтрация ЦТЛ связана с благоприятным прогнозом при различных первичных и метастатических злокачественных новообразованиях [104]. Также выявлена корреляция содержания в опухоли CD4+ Т-хелперов 1 типа (Th1) с благоприятным прогнозом при многих злокачественных новообразованиях [208].

#### *1.1.3.3 Противоопухолевый иммунный ответ*

Адаптивный противоопухолевый иммунный ответ осуществляется Т-лимфоцитами благодаря наличию опухолеассоциированных антигенов (ОАА) – уникальных пептидов, которые появляются в результате злокачественной трансформации [65, 104, 187]. ОАА захватываются антиген-презентирующими клетками (АПК), наиболее эффективными из которых являются дендритные клетки (ДК), и в результате процессинга представляются на их поверхности в контексте молекул МНС I и/или II классов. ДК, захватив опухолевые антигены, мигрируют в дренирующие лимфатические узлы или третичные лимфоидные структуры в пределах опухоли, где они сенсibiliзируют и активируют Т-лимфоциты против этих антигенов [104]. Активированные ЦТЛ способны напрямую уничтожать злокачественные клетки, экспрессирующие ОАА, а также секретировать IFN- $\gamma$ , наиболее значимый цитокин для

подавления опухолевого роста [208]. CD4<sup>+</sup> Th1 принимают участие в индукции и регуляции антиген-специфических ЦТЛ, также секретируя IFN- $\gamma$ , при этом Th2 играют роль в развитии гуморального иммунного ответа [107]. Роль других Т-хелперов в настоящее время активно изучается [19, 107]. В дополнение к локальному противоопухолевому ответу некоторые Т- и В-лимфоциты становятся клетками памяти, которые циркулируют в организме, накапливаются в лимфоидных органах и контролируют появление метастазов опухоли [104].

#### *1.1.3.4 Иммуноредактирование*

Динамический процесс изменения иммуногенности опухоли и стимуляции опухолевой прогрессии называют иммуноредактированием, он включает 3 фазы - элиминация, равновесие и ускользание [181, 184]. В фазу элиминации клетки иммунной системы способны отличать злокачественные клетки от здоровых и уничтожать их. Гибель опухолевых клеток ведет к высвобождению опухолевых антигенов и их презентации Т-лимфоцитам, что инициирует опухолеспецифический адаптивный иммунный ответ. В фазу равновесия постоянное взаимодействие между опухолью и клетками иммунной системы препятствует росту опухоли. Однако оно способствует отбору и выживанию новых клонов опухолевых клеток со сниженной иммуногенностью. Это приводит к наступлению следующей фазы развития опухоли, в которой малигнизированные клетки ускользают от иммунной системы [181]. Данная способность считается одним из признаков злокачественного новообразования [121].

#### *1.1.4 Механизмы ускользания от иммунного надзора, иммуносупрессия*

Множественные тормозные механизмы могут быть ответственны за неспособность иммунной системы устранить опухоль. Опухолевые клетки могут потерять экспрессию целевого антигена и, таким образом, избежать обнаружения. Несоответствующее представление антигена или отсутствие соответствующих сигналов активации от ДК могут приводить к толерантности Т-клеток. Иммуносупрессивные цитокины (TGF- $\beta$ , IL-10) и различные клетки лимфоидного и миелоидного происхождения, присутствующие в микроокружении опухоли, могут ингибировать противоопухолевый иммунный ответ. Также активированные Т-клетки в норме экспрессируют ингибирующие рецепторы, известные как молекулы контрольных точек иммунной системы, взаимодействие с которыми ослабляет иммунный ответ. Лиганды к этим рецепторам могут обнаруживаться на злокачественных клетках и клетках опухолевого микроокружения [247].



#### *1.1.4.1 Контрольные точки иммунного ответа*

Развитие противоопухолевого иммунного ответа требует активации цитотоксических Т-лимфоцитов, а также баланса положительных и отрицательных сигналов. Отрицательные сигналы часто генерируются молекулами на поверхности клеток, такими как антиген цитотоксических Т-лимфоцитов-4 (CTLA-4), белок запрограммированной гибели клеток-1 (PD-1), белок, ассоциированный с геном активации лимфоцитов-3 (LAG-3), Т-клеточный иммуноглобулин-3 (TIM-3) и некоторые другие [52, 213, 229, 248]. Взаимодействие этих молекул с их лигандами приводит к истощению Т-лимфоцитов и снижению противоопухолевого иммунного ответа [52, 248].

CTLA-4 способствует супрессии Т-лимфоцитов благодаря связыванию с сигнальными молекулами CD80/86 вместо CD28, эффективно блокируя ко-стимулирующие сигналы CD28, необходимые для активации Т-клеток [73]. Ингибирующий рецептор PD-1 является частью семейства CD28 и играет важную роль в ускользании опухоли от иммунного ответа [213]. PD-L1, лиганд для PD-1, экспрессируется на различных клетках, в том числе, на клетках опухоли и микроокружения, при этом экспрессия PD-L1 может быть усилена воспалительными цитокинами, например, интерферонами [242]. Взаимодействие PD-L1 и PD1 приводит к развитию толерантности Т-лимфоцитов, снижению их пролиферации и секреции цитокинов [213]. Высокий уровень PD-1 и/или PD-L1 может коррелировать с неблагоприятным прогнозом при разных злокачественных новообразованиях, ассоциация экспрессии CTLA-4 с прогнозом заболевания неясна [229]. Роль других ингибирующих рецепторов и их лигандов в настоящее время активно изучается [52, 213, 248].

#### *1.1.4.2 Регуляторные Т-лимфоциты*

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) – это особая субпопуляция Т-лимфоцитов, выполняющая функцию медиаторов иммунологической толерантности, наиболее характерным маркером для этих клеток является ядерный фактор транскрипции Forkhead P3 (FOXP3), который играет важную роль в их развитии [4, 27, 73]. Повышенное содержание Treg в периферической крови онкологических больных ассоциировано со многими опухолями [1, 14, 73]. На сегодняшний день существует мнение, что накопление Treg в опухоли происходит вследствие их привлечения малигнизировавшими клетками и клетками опухолевого микроокружения. Опухлеассоциированные Т-регуляторные лимфоциты экспрессируют белки CCR4, CCR10, нейропиплин-1 (CD304) и VEGFR-2 и могут привлекаться опухолевыми клетками с помощью лигандов CCL2, CCL22, CCL28 и VEGF-A на их поверхности, что способствует образованию иммунотолерантного микроокружения и развитию внутриопухолевого ангиогенеза [72, 105, 154]. В опухоли Treg секретируют иммуносупрессирующие цитокины

(TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35), экспрессируют молекулы контрольных точек иммунного ответа CTLA-4, PD-1, LAG-3 и TIM-3, а также снижают активность эффекторных Т-клеток путем потребления IL-2 и активации толерогенных ДК [73]. Установлено, что соотношение количества опухолеассоциированных Treg и цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов может служить прогностическим фактором течения заболевания при ряде злокачественных новообразований [118]. Высокая степень инфильтрация опухоли FOXP3<sup>+</sup> Treg лимфоцитами коррелирует с неблагоприятным прогнозом согласно данным метаанализа [230].

#### *1.1.4.3 Миелоидные иммуносупрессирующие клетки, дендритные клетки, опухолеассоциированные макрофаги и нейтрофилы в опухолевом микроокружении*

В настоящее время показана роль опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) в формировании иммуносупрессирующего опухолевого микроокружения. Противоопухолевый цитокин IFN- $\gamma$  индуцирует поляризацию ОАМ в M1 макрофаги, которые способны к презентации антигена, секретируют TNF, IL-6, IL-1 и IL-12 и стимулируют Th1 опосредованный иммунный ответ. Однако в присутствии IL-4, IL-10 и TGF- $\beta$  ОАМ приобретают M2 фенотип и экспрессируют IL-10. Эти макрофаги подавляют активность эффекторных Т-клеток и способствуют ангиогенезу, а также росту и метастазированию опухоли [52, 69, 236]. Кроме того, M2 клетки вербуют Treg, экспрессируя CCL2, CCL17 и CCL18, и активируют их с помощью PGE2, IL-10 и индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO) [52]. Согласно данным M.J. Savenkov и соавт. (2013), поляризация ОАМ зависит от активности онкогена KIT опухолевых клеток [70]. Наличие в опухоли M2 макрофагов ассоциировано с неблагоприятным прогнозом при многих злокачественных новообразованиях, при этом обнаружение M1 макрофагов является благоприятным прогностическим фактором [104].

Помимо макрофагов в опухоль привлекаются нейтрофилы путем локальной продукции ее микроокружением IL-8 и MIP-1 $\alpha$ . Выделяют опухолеассоциированные нейтрофилы (ОАН) с фенотипами N1 (противоопухолевый) и N2 (проопухолевый). N1 нейтрофилы цитотоксичны, облегчают инфильтрацию ЦТЛ и их активацию путем продукции хемокинов (CCL3, CXCL9 и CXCL10) и провоспалительных цитокинов (IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF) [227, 236]. Преобладающий N2 фенотип связан с продукцией IL-1 $\beta$ , VEGF, FGFb, TGF- $\alpha$ , HGF и ангиопоэтина 1, которые способствуют иммуносупрессии, а также стимулируют ангиогенез и метастазирование опухоли [33, 227, 236]. Также эти клетки вырабатывают матриксную металлопротеиназу 9 (MMP-9), что приводит к реорганизации внеклеточного матрикса и опухолевой прогрессии [33, 227], а также способствуют развитию резистентности к химиотерапии [236]. Выявление ОАН связано с неблагоприятным прогнозом у пациентов глиобластомой, почечно-клеточным раком, меланомой, колоректальным раком и другими опухолями [208].

В опухолевом микроокружении обнаружены супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), которые также способствуют подавлению иммунного ответа. Дифференцируясь в опухоли из миелоидных предшественников, они ингибируют пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов путем истощения L-аргинина и L-цистеина и ингибируют экспрессию CD62L на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетках, чем препятствуют миграции этих клеток в лимфатические узлы [24]. Также миелоидные супрессоры секретируют TGF- $\beta$  и IL-10, привлекая Treg и подавляя NK-клетки, [182, 227, 236], и могут экспрессировать PD-L1 [191].

Также показана роль субпопуляций дендритных клеток в развитии иммуносупрессии [231, 271]. Незрелые ДК способны захватывать антиген, но слабо экспрессируют ко-стимулирующие молекулы и продуцируют недостаточно цитокинов, с чем связана низкая способность стимулировать Т-лимфоциты. Они вызывают толерантность путем деплеции Т-клеток и индукции их анергии, также показана способность незрелых ДК к активации Treg [227]. Кроме того, выделяют субпопуляцию регуляторных ДК, причем разные исследователи приписывают этим клеткам разный фенотип и функции наряду с общей способностью ингибировать CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты [231, 271]. Регуляторные ДК могут потреблять L-аргинин, необходимый Т-клеткам, продуцировать IL-10 или TGF- $\beta$ , экспрессировать ингибирующие молекулы PD-L1 и PD-L2 и использовать другие механизмы иммуносупрессии, часто зависящие от типа опухоли [231]. Среди факторов, способствующих приобретению толерогенного фенотипа ДК, IL-6, IL-10 и VEGF [58].

Таким образом, многообразие иммуносупрессирующих клеточных компонентов опухолевого микроокружения обеспечивает комплексное подавление иммунного ответа и выживание опухоли. Однако знание механизмов ускользания от иммунного надзора и применение новейших иммунотерапевтических подходов позволяет активировать специфический противоопухолевый иммунный ответ для достижения клинических результатов в лечении злокачественных новообразований.

Во взаимодействии клеток иммунной системы со злокачественными клетками и между собой участвуют разнообразные молекулы, которые присутствуют в микроокружении в растворимом виде или связаны с клеточными мембранами. Эти биологические соединения могут способствовать как иммуносупрессии, так и противоопухолевому иммунному ответу.

### 1.1.5 Биологические молекулы в иммунном микроокружении опухоли

#### 1.1.5.1 Цитокины

Цитокины играют важную роль во взаимодействиях опухоли и ее иммунного микроокружения. Выделяют противоопухолевые цитокины, присутствие которых способствует элиминации опухоли (например, IL-2, IL-12p70), и иммуносупрессирующие цитокины, такие

как IL-10 и IL-4. Однако для большинства цитокинов характерны разнонаправленные эффекты в зависимости от клеток-мишеней, комбинации с другими биологически активными веществами, дозы и других факторов.

Примером может служить IL-6, который при наличии растворимого рецептора sIL-6Ra может воздействовать на различные клетки [101, 218]. Помимо аутокринной стимуляции опухолевых клеток [101, 218] и активации ангиогенеза [155], IL-6 способствует дифференцировке миелоидных предшественников в иммуносупрессирующие клетки (ОАМ или MDSC) и блокирует дифференцировку в ДК [71, 101, 218]. Также было показано, что IL-6 играет роль в приобретении толерогенного фенотипа ДК [58]. Однако недавно была обнаружена противоопухолевая активность этого цитокина: он способствует дифференцировке, активации и пролиферации Т-лимфоцитов, а также миграции ЦТЛ в лимфатические узлы и в опухоль и повышению их цитолитической активности [100, 101, 165]. Кроме того, IL-6 блокирует дифференцировку CD4<sup>+</sup> клеток в Treg [57].

Другой цитокин, IL-8 в физиологических условиях способствует хемотаксису и дегрануляции нейтрофилов, а также ангиогенезу [82]. В опухоли IL-8 играет роль в эпителиально-мезенхимальном переходе, который связан с приобретением устойчивости к лучевой и химиотерапии, а также к цитотоксичности Т-лимфоцитов путем нарушения формирования иммунологического синапса и защиты от лизиса, опосредованного перфорином/гранзимом и взаимодействием FAS/FASL [83, 119]. Кроме того, IL-8 является хемоаттрактантом для нейтрофилов, макрофагов и MDSC, которые подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов [34, 166].

Еще один цитокин, IL-18, вместе с IL-12 или IL-15 способствует продукции IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитами и NK-клетками, благодаря чему играет важную роль в Th1 Т-клеточном противоопухолевом иммунном ответе [94, 192]. Кроме того, NK-клетки под действием IL-18 способствуют миграции в опухоль незрелых ДК, стимулируют продукцию IL-12 и привлекают цитотоксические ЦТЛ [259]. Однако без IL-12 или IL-15 IL-18 проявляет провоспалительную активность [192], индуцирует поляризацию «наивных» Т-лимфоцитов в Th2-клетки и способствует секреции IL-13 и/или IL-4 NK-клетками [94, 95], а также участвует в приобретении макрофагами M2 фенотипа и усиливает ангиогенез [151].

#### *1.1.5.2 Хемокины*

В миграции иммунокомпетентных клеток в опухоль ключевую роль играют хемотаксические цитокины. Хемокины представляют собой группу небольших структурно связанных белков, которые играют фундаментальную роль в развитии, гомеостазе и функционировании иммунной системы [19, 114]. Хемокины регулируют миграцию иммунных

клеток в опухоль, а также участвуют в прогрессировании и ангиогенезе [76]. Было показано, что при меланоме присутствие ОИЛ коррелирует с экспрессией CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 и CXCL10 [125, 221]. Хемокины CXCL9 и CXCL10, индуцируемые IFN- $\gamma$ , могут секретироваться опухолевыми и стромальными клетками и рекрутировать CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки [55, 76, 242]. Также экспрессия этих хемокинов связана с Th1-иммунным ответом [76, 115] и с благоприятным исходом химиотерапии и иммунотерапии [222]. С хемокином CCL21 связана миграция ДК и Т-клеток в лимфоузлы и нелимфоидные ткани, показана его роль в инфильтрации опухоли лимфоцитами [242]. Другой хемокин, CCL2, задействован в рекрутинге НК-клеток [181] и моноцитов, которые дифференцируются в макрофаги [58]; эти клетки обеспечивают неспецифический иммунный ответ. Однако этот же хемокин привлекает в опухоль различные клетки, связанные с иммуносупрессией [24, 72, 154].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что экспрессия определенных хемокинов злокачественными клетками и клетками микроокружения может влиять на инфильтрацию опухоли иммунными клетками и модулировать специфический и неспецифический ответ.

#### *1.1.5.3 Компоненты сигнальных путей апоптоза*

Функционирование эффекторных клеток регулируется апоптозом, опосредованным различными сигнальными путями. FASL – трансмембранный белок, взаимодействующий с FAS-рецептором (FASR) на поверхности клеток, что приводит к их апоптозу. Показано образование опухолью функционально активной растворимой формы лиганда, sFASL, которое является механизмом «контратаки», так как может приводить к апоптозу антиген-специфических Т-лимфоцитов, экспрессирующих FASR [179, 193]. Однако sFASL – более слабый индуктор апоптоза, чем мембранный лиганд [21], поэтому он может защищать от апоптоза злокачественные клетки, блокируя FASR [179, 193].

Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) – член суперсемейства TNF, рецептор которого, TNFR2, обнаружен на опухолевых клетках, а также на Treg, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторах [223, 266]. Антиапоптотические или проапоптотические эффекты TNF- $\alpha$  могут зависеть от его дозы [189]. TNF- $\alpha$  является основным воспалительным цитокином онкогенеза, он привлекает нейтрофилы, моноциты и лимфоциты в очаг воспаления [165]. Взаимодействие с TNFR2 снижает порог активации CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-лимфоцитов и является ранним ко-стимулирующим сигналом, а также играет роль в выживании активированных ЦТЛ, продукции IFN- $\gamma$  и цитолитической активности [266]. Однако длительная стимуляция приводит к подавлению передачи сигнала от Т-клеточного рецептора, к истощению Т-лимфоцитов или их элиминации [223]. Кроме этого, TNF- $\alpha$  может способствовать экспансии Treg, повышению их стабильности и, возможно, увеличению активности [45, 74, 223], хотя в литературе существуют

противоречивые данные на этот счет [263]. Другим механизмом иммуносупрессии, вызванной TNF- $\alpha$ , является стимуляция MDSC [131].

#### *1.1.5.4 Факторы ангиогенеза*

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), к которому относятся VEGF-A, -C, -D и плацентарный ростовой фактор (PLGF), играет ключевую роль в опухолевом ангиогенезе. Кроме того, оно участвует в регуляции иммунного микроокружения.

VEGF-A секретируется практически всеми опухолевыми клетками, а его рецепторы, VEGFR-1 и -2, экспрессируются некоторыми клетками иммунной системы [251]. VEGF-A повышает содержание MDSC [185], участвует в привлечении моноцитов в опухоль и в развитии ОАМ [164]. Показано, что VEGF-A может индуцировать пролиферацию Treg [244], а взаимодействие с ко-рецептором нейропилином-1 играет роль в инфильтрации опухоли этими клетками [105, 124]. Кроме того, VEGF-A ингибирует созревание ДК [88] и нарушает их способность стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов [132]. Воздействие этого ростового фактора вместе с IL-6 и IL-10 способствует приобретению ДК толерогенного фенотипа [58]. В работе А. Basu и соавт. (2010) VEGF-A повышал продукцию IFN- $\gamma$  и IL-2 активированными Т-клетками памяти с фенотипом CD4+CD45RO+ и способствовал их миграции [49]. Однако было показано, что он снижает эффекторные функции Т-лимфоцитов [106] и повышает экспрессию PD-1, TIM-3 и CTLA-4, что говорит об истощении этих клеток под действием VEGF-A [252]. Другие факторы роста эндотелия сосудов, VEGF-C и VEGF-D, связываются с VEGFR-3 и участвуют в опухолевом лимфоангиогенезе [33, 212], опосредованно влияя на опухолевое микроокружение.

Плацентарный фактор роста также продуцируется злокачественными клетками и взаимодействует с VEGFR-1 [86, 251]. Он ингибирует созревание ДК [88], участвует в привлечении в опухоль макрофагов и их иммуносупрессивной M2-поляризации, а также в мобилизации костномозговых миелоидных предшественников [86, 138].

Растворимый рецептор сосудистого фактора роста 1 (sVEGFR-1) является эндогенным селективным ингибитором VEGF-A [30] и может взаимодействовать с PLGF [86]. sVEGFR-1 подавляет ангиогенез [110, 250], снижает проницаемость сосудов и предотвращает миграцию и активацию моноцитов и макрофагов [30]. Влияние sVEGFR-1 на иммунный ответ противоположно эффекту VEGF-A. В. Li и соавт. (2006) описали применение аденовирусного вектора, экспрессирующего sVEGFR-1, на модели меланомы, которое существенно снижало содержание Treg в опухоли и улучшало результаты иммунотерапии [161]. sVEGFR-2, не связывает VEGF-A и является эндогенным селективным ингибитором VEGF-C, в связи с чем ингибирует лимфоангиогенез [170].

Тромбоцитарный фактор роста PDGF-AB/BB экспрессируется различными опухолевыми клетками [128], его рецепторы обнаружены на ДК и Т-лимфоцитах [31]. PDGF ингибирует созревание ДК и индуцирует секрецию IL-10, а также способствует поляризации Т-лимфоцитов в направлении Treg [31].

Наконец, ангиопоэтин-2, также активно участвующий в ангиогенезе, оказывает некоторый эффект на иммунное микроокружение опухоли. Показано, что он привлекает TIE-2+ моноциты в опухоль [160]. При этом sTIE-2, растворимый рецептор ангиопоэтина-2, блокирует его эффект.

#### *1.1.5.5 Гормоны*

Активно участвуют в модуляции иммунного ответа гормоны фоллистатин и лептин. Фоллистатин специфически связывает активин А, который продуцируется ДК, блокирует их аутокринную стимуляцию этим соединением и повышает подавляемую ей продукцию IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , CXCL10, CCL5 и CCL2. Более того, показано, что ингибирование активина А усиливало пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и цитолитическую активность антиген-специфических CD8+ Т-лимфоцитов при их ко-культивировании с ДК, что повышало эффективность вакцинации [127, 216]. Кроме того, добавление фоллистатина в совместную культуру НК-клеток и незрелых ДК увеличивало продукцию IFN- $\gamma$  и снижало секрецию IL-10 естественными киллерами [217]. Показано, что активин А способствует развитию CD4+CD25+FOXP3+ Treg [124] и повышает содержание иммуносупрессивных M2 ОАМ [127]. Можно предположить, что фоллистатин будет блокировать эти эффекты.

Лептин является иммунорегулятором и функционирует как провоспалительный цитокин [162, 206, 224]. Рецептор лептина экспрессируется Т-лимфоцитами после активации, взаимодействие с ним способствует их пролиферации, защите от FAS-опосредованного апоптоза [188, 199] и стимулирует эффекторную функцию [224]. Кроме того, лептин повышает секрецию IL-2 и IFN- $\gamma$  и снижает продукцию IL-4 и IL-10, способствуя Th1 Т-клеточному ответу [206]. Также этот адипокин повышает продукцию IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  и макрофагального воспалительного белка 1 альфа (macrophage inflammatory protein 1 alpha, MIP1 $\alpha$ ) ДК и способствует активации Th1 и ЦТЛ [196, 206]. Более того, он участвует в развитии и выживании НК-клеток, повышает фагоцитарную активность макрофагов [196, 206], а также подавляет Treg [255]. Однако он также участвует в иммуносупрессии, повышая количество MDSC в опухоли [77].

#### *1.1.5.6 Другие биологически активные вещества*

Показано значение фактора роста гепатоцитов (HGF) в иммунном микроокружении опухоли. Он играет роль в развитии моноцитов и макрофагов, в миграции В-лимфоцитов в лимфоузлы [133], а также, возможно, в развитии Т-лимфоцитов в тимусе [137]. Показано, что HGF способствует приобретению ДК толерогенного фенотипа, стимулируя аутокринную секрецию IL-10, индукции иммуносупрессии Treg и снижению количества противоопухолевых Th1-клеток [133, 137]. Однако есть данные о миграции отдельных типов ДК в лимфатические узлы под действием HGF [44]. Кроме того, этот ростовой фактор способствует миграции моноцитов и секреции ими провоспалительных цитокинов (IL-4, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, MIP-1 $\beta$ ) [123], а также индуцирует противоопухолевую активность ОАН [97].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) и фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF) иногда секретируются различными ЗНО [123, 186, 241]. Помимо аутокринной стимуляции роста опухоли, опосредованной G-CSF [36] и SCF [241], показано участие этих ростовых факторов в модуляции иммунного микроокружения опухоли путем влияния на дифференцировку MDSC [227, 256].

Важную роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа играет CD40L. Его взаимодействие с CD40 на поверхности ДК приводит к ее созреванию, экспрессии ко-стимулирующих молекул, секреции IL-12p70 и Th1-клеточному иммунному ответу [171, 238]. Растворимая форма, sCD40L, сохраняет способность индуцировать созревание ДК [269]. Кроме того, sCD40L может взаимодействовать с CD40 на поверхности MDSC, что приводит к секреции иммуносупрессивных IL-10 и IL-6 и экспансии Treg. Более того, показана индукция экспрессии PD-1 Т-лимфоцитами под действием sCD40L [42].

Ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), главный регулятор системы активации плазминогена, также может косвенно влиять на иммунное микроокружение опухоли, активируя макрофаги [117, 272]. Добавление PAI-1 при культивировании опухолевых линий приводило к повышению уровня цитокинов, связанных с ОАМ (CCL17, CCL22 и IL-6) и иммуносупрессией [272].

Таким образом, на сегодняшний момент накоплен огромный массив знаний об иммунном микроокружении опухоли, о его клеточных компонентах и о сложной сети биологически активных молекул, которые обеспечивают коммуникацию между этими клетками. Несмотря на выявление общих закономерностей развития злокачественного новообразования во взаимодействиях с иммунной системой, для различных типов опухолей свойственны специфические особенности этих взаимодействий, которые определяют характер роста и распространения опухоли, а также ее ответ на лечение. Изучение особенностей микроокружения конкретных ЗНО позволит увеличить эффективность существующих



терапевтических подходов и разработать новые, в том числе, иммунотерапевтические стратегии.

#### 1.1.6 Опухолевое микроокружение сарком мягких тканей

Саркомы мягких тканей – гетерогенная группа злокачественных новообразований мезенхимального происхождения. Уже в 1960 г. были описаны механизмы, с помощью которых первичная саркома может обойти противоопухолевый иммунный ответ путем создания иммунозащищенной микросреды [142, 150]. Опухолевое микроокружение для многих подтипов сарком плохо изучено и охарактеризовано, поэтому требует дальнейших исследований.

Саркомы считаются иммуногенными злокачественными новообразованиями. Была показана экспрессия опухолеассоциированных антигенов клетками СМТ *in vitro*: 66,6% культур опухолевых клеток на 20-30 пассажах экспрессировали MAGE, 80% - BAGE, 100% - GAGE и NY-ESO-1 [11]. Также для СМТ характерна экспрессия специфических слитых белков [65, 187]. Наличие опухолевых антигенов делает возможным формирование специфического иммунного ответа против злокачественных клеток.

При изучении образцов сарком было показано, что эти опухоли часто инфильтрированы лимфоцитами. В ранней работе С.М. Valch и соавт. (1990) выявили ОИЛ у 36% пациентов с саркомами [48]. В настоящее время из всех мезенхимальных новообразований инфильтрация Т-лимфоцитами наиболее подробно изучена в гастроинтестинальных стромальных опухолях и саркоме Юинга. В группе из 91 больных с гастроинтестинальными стромальными опухолями (ГИСО) с помощью иммуногистохимии и проточной цитометрии было показано, что инфильтрация CD3<sup>+</sup> лимфоцитами коррелирует с лучшей выживаемостью без прогрессирования (ВБП) [220]. Также для PD-L1/IDO-позитивных ГИСО выявлена ассоциация между количеством CD3<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> ОИЛ и размерами опухоли [60]. В работе D. Berghuis и соавт. (2011) у пациентов с саркомой Юинга опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты преимущественно были представлены CD8<sup>+</sup> Т-клетками, что свидетельствует о миграции этой субпопуляции в опухолевый очаг. ЦТЛ экспрессировали рецепторы CXCR3 и CCR5, в то время в опухолевых клетках был повышен уровень экспрессии генов соответствующих хемокинов (лиганды CXCL9, CXCL10 и CCL5). Инфильтрация опухоли цитотоксическими лимфоцитами коррелировала с улучшением выживаемости по сравнению с инфильтрацией только стромы [55]. Наблюдаемое воздействие опухоль-инфильтрирующих CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов согласуется с ролью адаптивного противоопухолевого иммунитета в профилактике прогрессии саркомы Юинга.

Также есть данные, что инфильтрация CD20<sup>+</sup> В-клетками была связана с улучшением безрецидивной выживаемости при саркомах мягких тканей, однако дополнительным

обязательным условием было радикальное иссечение опухоли [235]. Кроме того, исследования выявили инфильтрацию ГИСО НК-клетками, которая коррелировала с благоприятным прогнозом [67]. Однако помимо инфильтрации клетками, осуществляющими противоопухолевый иммунный ответ, при СМТ формируется иммуносупрессивное микроокружение.

Интерес для исследователей представляет инфильтрация сарком Трег и ее значение для опухолевой прогрессии. В исследовании, включавшем 163 случая СМТ, инфильтрация Трег достоверно ассоциировалась со стадией и степенью злокачественности опухоли [209]. Были наблюдения, где инфильтрация опухоли FOXP3+ клетками уменьшалась после лечения иматинибом, ингибитором тирозиновой протеинкиназы, у больных с метастатической формой ГИСО [220]. V.P. Balachandran и соавт. (2011) в своем исследовании показали, что применение иматиниба приводит к снижению уровня IDO1, что способствует апоптозу Трег и усилению функции эффекторных Т-лимфоцитов [47]. Также активно изучается роль контрольных точек иммунного ответа для СМТ. Показано, что экспрессия PD-L1 клетками ГИСО была ассоциирована с увеличением размера опухоли, количеством митозов и наличием очага некроза [60]. Также обнаружена связь экспрессии PD-L1 с высокой степенью злокачественности СМТ. В этом исследовании инфильтрация FOXP3+ и PD-L1 клетками были независимыми прогностическими факторами, ассоциированными с общей выживаемостью (ОВ) и выживаемостью без признаков заболевания [209].

Иммуносупрессирующие клетки миелоидного происхождения также заслуживают внимания исследователей. В микроокружении метастатической альвеолярной саркомы обнаружены CD14+ CD163+ M2 макрофаги, для которых была показана способность к VEGF-опосредованному васкулогенезу [69]. Содержание миелоидных супрессоров в крови пациентов с СМТ, у которых не наблюдалось противоопухолевого иммунного ответа, было выше, чем у здоровых добровольцев [98]. Однако накопленных данных недостаточно, чтобы охарактеризовать роль различных миелоидных иммуносупрессирующих субпопуляций в прогрессии СМТ.

Для понимания биологии СМТ и для разработки новых стратегий их лечения необходимо детальное изучение микроокружения данных опухолей. Эти исследования помогут повысить эффективность естественных иммунных реакций и адоптивных иммунотерапевтических подходов для лечения СМТ.

## **1.2 Сведения об эпидемиологии сарком мягких тканей**

### 1.2.1 Эпидемиология сарком мягких тканей

Саркомы мягких тканей (СМТ) - редкие злокачественные новообразования соединительной ткани [61, 159, 198]. СМТ составляют около 60% всех сарком [26] и до 1% от всех онкологических заболеваний у взрослых [247, 258]. Среди всех случаев злокачественных новообразований у детей СМТ насчитывают 6% [232]. В популяции детей и взрослых до 20 лет СМТ входят в пятерку самых распространенных причин смерти от онкологических заболеваний [109]. В Европе общая ежегодная заболеваемость саркомами равна 5,6 случаев на 100 000 взрослых человек, из них 84% случаев составляют СМТ [237]. В США расчетное количество новых случаев новообразований мягких тканей в 2018 г. составило 13040, при этом число летальных исходов, связанных с этими нозологиями, на 2018 год прогнозируется на уровне 5150 случаев [232].

На территории Российской Федерации в 2016 г. опухоли соединительной и других мягких тканей находились среди наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований в группе больных до 30 лет (3,6%) [16]. Летальность больных СМТ в течение 2016 г. с момента установления диагноза (из числа больных, впервые взятых на учет в предыдущем году) составила 19,3 на 100 000 населения. Летальность на первом году с момента установления диагноза для сарком мягких тканей составила 19,3% [15]. Смертность от новообразований мезотелиальной и мягких тканей в РФ в 2016 году была равна 1,40 на 100 000 [16]. В Северо-западном регионе заболеваемость новообразованиями соединительной и других мягких тканей в 2016 году составила 1,67 на 100 000 населения, а смертность от опухолей мезотелиальной и мягких тканей - 1,41 на 100 000 человек [16].

### 1.2.2 Классификация сарком мягких тканей

Саркомы мягких тканей – это гетерогенная группа опухолей мезенхимального происхождения, включающая более 80 подтипов согласно классификации ВОЗ 2013 года [102], которые выделены на основании морфологических, иммуногистохимических и генетических особенностей [20, 141, 200, 234]. При этом классификация постоянно обновляется и дополняется новыми подтипами этих новообразований [29, 141]. В основе гетерогенности СМТ лежит их генетическое многообразие. К генетическим нарушениям, вызывающим образование этих опухолей, относят транслокации, мутации с приобретением функции, амплификацию генов и потерю генов-супрессоров опухолевого роста [61]. Молекулярные характеристики и происхождение СМТ определяют клиническое поведение опухоли и ответ на терапию.

Стадирование СМТ осуществляют по системе TNM [26]. Также новая классификация ВОЗ рекомендует определение злокачественности (G) по системе FNCLCC с учетом

дифференцировки опухоли, митотического индекса и количества некрозов, при этом сохраняется деление сарком на опухоли низкой степени злокачественности (low grade) и высокозлокачественные (high grade) [20, 26]. Биологические характеристики сарком варьируют от доброкачественных новообразований, не способных к метастазированию, до злокачественных опухолей с высоким метастатическим потенциалом [26]. Например, в пределах липосаркомы (опухоли из адипоцитов), распознаются 3 подтипа: 1) высоко и недифференцированные, 2) миксоидные и 3) плеоморфные [63, 246]. Высокодифференцированные липосаркомы – это опухоли с низкой степенью злокачественности, которые никогда не метастазируют, если не имеются признаки недифференцировки. При этом они имеют высокую частоту локального рецидива и устойчивы к химиотерапии и лучевой терапии. Напротив, миксоидные липосаркомы могут метастазировать в легкие, кости, а также в жировую ткань других областей тела [40, 116], однако эти опухоли, как правило, очень чувствительны к химиотерапии и лучевой терапии. Плеоморфные липосаркомы почти одинаково агрессивны своим клиническим поведением и практически не отвечают на все формы терапии [247].

Наиболее распространенные подтипы СМТ включают недифференцированную плеоморфную саркому, лейомиосаркому, синовиальную саркому, злокачественную опухоль из оболочек периферических нервов, липосаркому и ГИСО у взрослых. У детей преобладающим подтипом является рабдомиосаркома (до половины всех случаев СМТ) [91, 109, 139, 232].

### 1.2.3 Локализация, рецидивирование и метастазирование СМТ

СМТ способны образовываться во всех частях тела человека [20, 102, 109]. Конечности (43%), туловище (10%), висцеральные органы (19%), забрюшинное пространство (15%), голова и шея (9%) являются наиболее распространенными первичными локализациями СМТ [177]. СМТ нижних конечностей возникают в 3 раза чаще, чем верхних конечностей, около 75% этих опухолей локализуются в области коленного сустава [26].

Анатомический участок, где возникла первичная опухоль, влияет на рецидивирование, метастазирование и исход заболевания, а также на выбор лечения [26, 63, 177]. Забрюшинные и внутрибрюшинные опухоли склонны к развитию раннего локального рецидива: 50% СМТ этой локализации рецидивируют в течение 5 лет. Среди СМТ конечностей и висцеральных органов частота возникновения локального рецидива в течение 10 лет составляет 20-25% [63].

Более чем у 50% пациентов с высокозлокачественными СМТ развиваются метастазы [109]. У пациентов с метастатическим заболеванием 3-летняя выживаемость составляет 20–30% [145], а медиана выживаемости в настоящее время равна 15-18 месяцам [143]. В целом, для СМТ наиболее характерно метастазирование в легкое [177]. Особенно это свойственно для

первичной локализации опухоли в области верхних конечностей, а также для лейомиосаркомы матки [63]. СМТ, возникающие в брюшной полости, например, ГИСО, чаще всего метастазируют в печень и брюшину. [63, 177]. Метастазирование в лимфатические узлы при СМТ наблюдается редко за исключением некоторых гистологических подтипов [63, 68]. При изолированном поражении лимфоузлов возможно излечение некоторых пациентов, однако сочетание с метастазированием в другие органы является неблагоприятным прогностическим фактором [63].

Гистологическая гетерогенность, генетические aberrации, которые запускают опухолевый процесс, локализация СМТ в организме человека создают трудности в классификации и в разработке новых методов лечения этих опухолей. Несмотря на значительный прогресс в изучении биологии злокачественных новообразований, прогноз при СМТ остается неблагоприятным в связи с развитием рецидивов и частым метастазированием. Поэтому существует необходимость увеличения эффективности существующих методов лечения СМТ, а также определения подходящих мишеней для терапии на молекулярном уровне не только в злокачественных клетках, но и в опухолевом микроокружении.

### **1.3 Современное представление о лечении сарком мягких тканей**

#### **1.3.1 Хирургическое лечение**

Золотым стандартом медицинской помощи при местно-распространенных СМТ является хирургическое лечение [26, 68, 177]. Как правило, выполняется широкое иссечение опухоли в пределах здоровой ткани с учетом онкологических принципов футлярности, блочности, абластичности и зональности [26]. В исследовании S.W. Sorbye и соавт. (2011) в группе пациентов с неширокими полями резекции было зафиксирована 5-летняя выживаемость, равная 33%, против 62% в группе радикально прооперированных больных [235]. Хирургическое лечение также возможно при IV стадии опухолевого процесса и включает удаление операбельных легочных метастазов путем торакотомии или видеоторакоскопии. Это может обеспечить продолжительную безрецидивную выживаемость, а в случае изолированных легочных метастазов возможно излечение [26].

При СМТ стратегией выбора может быть калечащая операция, но возможно и выполнение радикального органосохраняющего хирургического вмешательства при сочетанном использовании лучевой и/или химиотерапии [68].

#### **1.3.2 Лучевая терапия**

После радикального хирургического лечения местно-распространенных СМТ в случае отсутствия опухолевых клеток в краях резекции нет необходимости в проведении

послеоперационной лучевой терапии [26, 68]. Однако в связи с локализацией опухоли и трудностью достижения полной резекции с адекватными краями лучевая терапия является широко используемым методом лечения высокозлокачественных СМТ (6308 из 10 290 случаев) и ассоциирована с достоверно лучшей выживаемостью [130]. Хирургическое удаление опухоли с последующей лучевой терапией в качестве стандартного лечения применяется для СМТ высокой степени злокачественности G2-3 и при размере опухоли >5 см [51], хотя в некоторых случаях может быть рекомендовано и при меньших размерах новообразования [68].

Иногда выполняется предоперационная лучевая терапия с целью уменьшения размеров опухоли и объема хирургического вмешательства [26]. По данным работы O'Sullivan В. хирургическое лечение после неoadъювантной лучевой терапии в комбинации с химиотерапией – лучший вариант для увеличения времени до прогрессирования [194]. Эта опция особенно важна и ее стоит рассматривать при вероятности калечащей операции, несмотря на повышенный риск инфекционных осложнений в послеоперационном периоде [26].

У пациентов с распространенным заболеванием лучевая терапия может использоваться как паллиативный метод лечебного пособия [68].

### 1.3.3 Химиотерапия

Консенсус о проведении адъювантной химиотерапии при локализованной СМТ до сих пор не достигнут [23, 68]. Небольшие клинические исследования утверждают об увеличении общей и безрецидивной выживаемости после проведения адъювантной химиотерапии, тогда как масштабные исследования демонстрируют отсутствие разницы в выживаемости в обеих группах больных [201]. Таким образом, адъювантная химиотерапия не является стандартным лечением для местно-распространенных СМТ [68]. В некоторых случаях для сохранения конечности, когда ампутация является обычным хирургическим подходом, возможно применение изолированной химиоперфузии с использованием мелфалана или мелфалана в комбинации с фактором некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ). Другим подходом может быть локальная гипертермия [7, 12, 68].

В отличие от локализованного заболевания, при метастатической СМТ химиотерапия является основным методом лечения [26]. В недавних исследованиях медиана общей выживаемости при метастатических СМТ была 15-18 мес. по сравнению с 12 мес. в более ранних исследованиях [143], что свидетельствует об улучшении подходов к лечению этого заболевания, хотя значительной клинической эффективности не зарегистрировано.

Хирургическое лечение является стандартом при метакронных резектабельных метастазах в легкое, но при условии увеличения выживаемости без прогрессирования (ВБП) более 1 года [59, 68]. При этом следует обязательно исключить экстрапульмональные метастазы

с помощью компьютерной томографии (КТ) брюшной полости и сканирования костей или позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ-КТ) всего тела с фтордезоксиглюкозой (FDG). Не исключено проведение ХТ после полной циторедукции, принимая во внимание прогностические факторы заболевания (короткий интервал предыдущей ВБП и большое количество опухолевых очагов), однако отсутствуют официальные доказательства улучшения исхода заболевания [59, 68]. Проводить ХТ предпочтительно перед операцией, чтобы оценить реакцию опухоли и таким образом модулировать лечение.

Если вторичные изменения в легких синхронные, и в то же время отсутствуют внелегочные метастазы, стандартом лечения остается ХТ [59, 68]. Хирургическое лечение полностью резектабельных остаточных метастазов в легкие можно рассматривать в случае регресса опухоли на фоне проводимой терапии. Стандартом лечения внелегочной метастатической болезни является системная лекарственная терапия [59, 68].

У большинства пациентов с СМТ терапия «первой линии» состоит из доксорубицина или доксорубицин-содержащей комбинации, часто с ифосфамидом [26, 68, 109]. Ответ СМТ на доксорубицин, применяемый в качестве единственного препарата, составил около 14% по сравнению с 26% для доксорубицина и ифосфамида. Достоверных различий в общей выживаемости не наблюдалось (12,8 и 14,3 месяца), однако медиана выживаемости без прогрессирования при комбинированной терапии составляла 7,4 мес. по сравнению с 3,6 мес. для доксорубицина [143]. Монотерапия ифосфамидом приводила к клиническому ответу в 20-25% случаев, но прослеживалась четкая зависимость «доза-эффект», которая ограничивалась выраженной токсичностью [163]. «Свободный период от болезни» продолжительностью более 12 мес. и появление метастазов не ранее этого срока являются благоприятными прогностическими факторами при терапии «первой линии» в сочетании с метастазэктомией. Неблагоприятные факторы включают гистологические варианты липосаркомы и злокачественной опухоли периферических нервов, а также возраст пациента старше 50 лет на момент лечения метастатической болезни [145].

Недавно в небольшом исследовании II фазы была изучена эффективность комбинации доксорубицина с оларатумабом, моноклональным антителом, направленным против PDGFRA. Показана статистически значимое увеличение ОВ в исследуемой группе по сравнению с пациентами, которые получали доксорубицин, но с более низким и не статистически значимым преимуществом в показателе ВБП и скорости клинического ответа [243]. Оларутумаб доступен в некоторых странах, а также ожидаются результаты последующего исследования III фазы, так что препарат, возможно, будет более широко применяться в Европе и России.

Несмотря на представленные данные, необходимо отметить преимущество комбинации доксорубицина с оларатумабом по сравнению комбинацией доксорубицина с ифосфамидом. В

III фазе исследования, где проведено сравнение доксорубицин в комбинации с гемцитабином и доцетакселом в качестве «первой линии» терапии при распространенных формах СМТ, двухкомпонентной схеме не удалось показать какое-либо улучшение ВБП и частоты объективного ответа, и она обычно не рекомендуется в качестве терапии «первой линии» метастатической СМТ [228].

«Доксорубицин плюс дакарбазин» - оптимальный вариант в «первой линии» ХТ лейомиосаркомы, поскольку активность ифосфамида менее убедительна по данным ретроспективных исследований, что распространяется и на солитарную фиброзную опухоль [167].

Рандомизированное многоцентровое исследование III фазы показало превосходство эрибулина по сравнению с дакарбазином у больных липосаркомой и лейомиосаркомой. Различия в медиане ОВ составила 2 мес., но анализ в подгруппах показал, что этот показатель достигал 7 мес. при липосаркоме [225], что и способствовало регистрации эрибулина для лечения липосаркомы во «второй линии» ХТ.

В рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании II фазы регорафениб улучшил показатели ВБП у пациентов с метастатической формой СМТ после прогрессирования заболевания на фоне терапии доксорубицином. Исключением оказались больные с липосаркомой. Пост-хок анализ показал увеличение ОВ с лучшим качеством жизни у больных СМТ по сравнению с плацебо. Поэтому регорафениб можно рассматривать как препарат выбора после прогрессирования на доксорубицин-содержащей схеме для больных СМТ не адипоцитарной гистологической формы [56, 178].

«Вторая линия» терапии СМТ чаще всего представлена гемцитабином в комбинации с доцетакселом, которые демонстрируют активность при неэффективности доксорубицина и ифосфамида [26, 35, 109, 210]. Трабектедин может применяться в качестве терапии «второй» и последующих линий при синовиальной и экстраоссальной форме саркомы Юинга, а также при лейомиосаркоме и липосаркоме [26, 198, 210]. Для лечения большинства подтипов СМТ, за исключением адипогенных сарком и ГИСО, возможно применение пазопаниба [26, 68]. Этот ингибитор тирозинкиназных рецепторов получил одобрение для лечения СМТ на основе улучшения выживаемости без прогрессирования на 3 мес. по сравнению с плацебо [112].

#### 1.3.4 Недостатки стандартной терапии СМТ

Несмотря на многообразие химиотерапевтических препаратов, их применение редко приводит к излечению, а также связано с выраженной токсичностью [187]. Существенной проблемой в лечении СМТ является резистентность к стандартной химиотерапии. Микроокружение опухоли за счет своей специфической архитектуры формирует условия для



сохранения некоторых злокачественных клеток недоступными для химиотерапевтических препаратов. Выживание этих клеток приводит к появлению вторичных генетических изменений и развитию фармакологической резистентности [135, 168]. Невосприимчивость к лекарственной терапии также может быть связана с растворимыми факторами и межклеточными взаимодействиями с компонентами микроокружения [168]. Так, например, известно, что стромальные клетки опухоли связаны с лекарственной устойчивостью за счет активации аутофагии [268], а также благодаря взаимодействию с опухолевыми клетками посредством внеклеточных везикул [62]. Для оценки индивидуальной чувствительности к химиотерапии возможно использование моделирования пролиферативной активности опухолевых клеток СМТ в присутствии химиотерапевтических агентов *in vitro* [5]. Однако более информативным будет изучение злокачественных клеток в комплексе с их микроокружением для выявления взаимодействий, влияющих на чувствительность к лекарственной терапии. Резистентность злокачественных клеток к химиотерапии, диктует необходимость разработки принципиально иных терапевтических подходов, одним из которых может быть иммунотерапия.

#### **1.4 Место иммунотерапии для лечения СМТ**

Несмотря на оптимальное лечение, у значительной части пациентов СМТ развиваются рецидивирующие и метастатические заболевания. Для этих пациентов существующие варианты лечения довольно ограничены. Достигнутый прогресс в иммунотерапевтическом лечении ЗНО, таких как рак предстательной железы, меланома, рак легкого, рак головы и шеи, лимфома, лимфолейкоз, рак почки, рак мочевого пузыря, вселяет надежду на успех в лечении больных саркомами.

Доктор Вильям Коли в 1891 году впервые продемонстрировал регресс опухолевых очагов при саркоме после введения вакцины на основе *Streptococcus pyogenes* [78]. Механизм действия «вакцины Коли» был основан на активации иммунной системы и формировании противоопухолевого ответа. В настоящее время накопленные данные о биологических закономерностях роста и развития СМТ привели к разработке иммунотерапевтических методов их лечения. Было показано, что благодаря специфическим геномным изменениям, например, транслокациям, саркомы способны экспрессировать опухолеассоциированные антигены, что формирует благоприятные условия для иммунотерапии этих опухолей [65, 187]. Специфический противоопухолевый иммунный ответ приводит к выборочному разрушению злокачественного новообразования без причинения вреда нормальной ткани, а наличие долговременной иммунологической памяти дает возможность предотвратить рецидив опухолевого заболевания. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что иммунная система может адаптироваться к сдвигам в экспрессии антигена во времени.

Таким образом, иммунотерапевтические подходы потенциально могут обеспечить длительный одновременно локальный и отдаленный контроль заболевания как на макроскопическом, так и микроскопическом уровне [99]. Эти характеристики делают иммунотерапию идеальной стратегией для лечения солидных опухолей и, в частности, СМТ, для которых в большинстве случаев характерны частые рецидивы, затрудняющие контроль заболевания при ограниченных доступных методах лечения. Терапевтические подходы, усиливающие противоопухолевый иммунный ответ при саркомах, включают применение цитокинов, ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, НК-клеток, Т-лимфоцитов, противоопухолевых вакцин [37, 159, 187].

#### 1.4.1 Цитокины

IL-2 – один из первых цитокинов, для которого была показана способность стимулировать рост и пролиферацию Т-лимфоцитов и который успешно был использован для противоопухолевой иммунотерапии [87]. Однако при саркомах этот подход оказался неэффективным. Согласно данным S.A. Rosenberg и соавт. (1989), у 6 больных саркомой не было получено ответа на применение IL-2 и лимфокин-активированных киллеров (ЛАК-клеток) [219]. В другом исследовании с участием 12 пациентов СМТ, резистентных к химиотерапии, только у одного пациента наблюдался частичный ответ на высокие дозы IL-2, что свидетельствует о низкой эффективности применения этого цитокина для лечения этих опухолей [113]. Применение других цитокинов, например, интерферонов, также не привело к существенному улучшению выживаемости больных с различными подтипами саркомам [215, 249].

#### 1.4.2 Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа

Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа PD-1 и CTLA-4 на сегодняшний день также не продемонстрировали эффективности при лечении сарком различных подтипов [61]. Клиническое исследование II фазы, в котором ипилимумаб, моноклональное антитело направленное против CTLA-4, использовался для лечения больных с синовиальной саркомой (NCT00140855), было остановлено в связи с отсутствием объективного ответа на терапию [174]. Также неудачу потерпели клинические испытания ингибиторов PD-1, в частности, ниволумаба [53]. Более того, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа в сочетании с химиотерапевтическими препаратами (NCT02406781) также демонстрировали низкую активность при СМТ [245], а результаты одновременного использования ипилимумаба и ниволумаба (NCT02500797) были сравнимы с результатами применения стандартной химиотерапии [79]. Среди возможных механизмов, связанных с неэффективностью этих

препаратов при саркомах, называют низкий уровень экспрессии PD-L1 и повышенную экспрессию IDO, а также низкую степень инфильтрации опухолей цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами на фоне выраженной инфильтрации иммуносупрессирующей субпопуляцией M2 макрофагов [245] в сочетании со значительной молекулярной гетерогенностью этих опухолей [61].

#### 1.4.3 Адоптивная Т-клеточная терапия

Относительно новым подходом к лечению СМТ является применение опухолеспецифических Т-лимфоцитов. Адоптивная терапия аутологичными Т-лимфоцитами с генноинженерным Т-клеточным рецептором направленным против NY-ESO-1 у больных с синовиальной саркомой привела к клиническому ответу у 4 из 6 пациентов. У одного пациента ответ наблюдался в течение 18 мес. [214]. В исследовании применения Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором к HER2 при саркомах костей, экспрессирующих этот антиген, у 4 из 17 обследованных пациентов зарегистрирована стабилизация заболевания. У пациентов, которым была выполнена биопсия, у троих она показала некроз более 90% опухоли. Средняя общая выживаемость в этом исследовании составила 10,3 мес. [32].

#### 1.4.4 Вакцинотерапия

Другим активно развивающимся направлением иммунотерапии злокачественных новообразований является вакцинотерапия [4, 159, 187]. Ключевым моментом в создании противоопухолевых вакцин становится поиск опухолеассоциированных антигенов [11, 187]. Было показано, что многие саркомы экспрессируют такие РТА, как MAGE, GAGE, BAGE и NY-ESO-1 [11, 41, 152], ганглиозиды GD2/3, также описаны специфические слитые белки сарком, в частности, SYT-SSX [65, 159, 187]. Вакцины, разработанные на основе специфических антигенов СМТ, позволяют формировать направленный иммунный ответ против злокачественных клеток без вреда для нормальных тканей.

Впервые противоопухолевую вакцину для лечения остеогенной саркомы использовали R.C. Marcove и соавт. в 1970 году [176]. В настоящее время существуют различные подходы к вакцинотерапии сарком, которые включают использование выделенных полипептидных антигенов, опухолевого лизата, белков теплового шока, а также ДК, активированных саркома-специфическими антигенами [65]. Однако, несмотря на прогресс в изучении противоопухолевого иммунного ответа и успехи биотехнологии, клинические исследования применения ДК-вакцин при саркомах демонстрируют противоречивые результаты. В исследовании J.D. Geiger и соавт. (2001), в котором ДК-вакцины, нагруженные аутологичным опухолевым лизатом, использовали для лечения фибросаркомы у 10 больных, наблюдался

полный регресс метастазов в легких у одного пациента [108]. В другой работе 16 пациентов с распространенными СМТ получали дендритноклеточные вакцины, которые были активированы *in vitro* опухолеспецифическими полипептидами в сочетании с введением IL-2 в качестве адьюванта. У четырех из этих больных была зарегистрирована стабилизация опухолевого процесса [80]. При этом в другом исследовании применение ДК, активированных ОАА, у 52 пациентов с метастатической или рецидивирующей саркомой Юинга или с альвеолярной рабдомиосаркомой привело к достоверному улучшению 5-летней выживаемости по сравнению с теми, кто не получал иммунотерапию (43% и 15%,  $p=0,0004$ ) [169]. S.E. Finkelstein и соавт. (2012) показали, что внутриопухолевое введение ДК вместе с лучевой терапией в качестве неоадьювантной терапии СМТ привело к формированию противоопухолевого иммунного ответа у 9 из 17 пациентов. У 70,6% пациентов не наблюдалось прогрессирования заболевания в течение одного года, лечение приводило к выраженной инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами [98]. Также описан клинический случай, когда ДК-вакцина, нагруженная аутологичным опухолевым лизатом, в сочетании с цитокин-индуцированными киллерами (CIK) продемонстрировала эффективность при недифференцированной эмбриональной саркоме печени [261]. У этого пациента после иммунотерапии наблюдался регресс метастатических очагов в легких на фоне увеличения количества CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов.

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова ранее было проведено исследование, включавшее 9 больных метастатической СМТ, которые получали ДК-вакцину, активированную РТА. Иммунный ответ в форме ГЗТ наблюдался у 7 из 9 пациентов (77,7%), была отмечена тенденция к увеличению активированных Т-хелперов и ЦТЛ в периферической крови. У 56% больных наблюдалась стабилизация опухолевого процесса после окончания курса вакцинотерапии, у 44% эффект сохранялся более 6 мес., у 22,2% - более 12 мес. и у одного пациента – более 17 мес. [3].

Эффективность противоопухолевой иммунотерапии, в том числе, на основе ДК-вакцин, главным образом зависит от 4-х важных компонентов, к которым относят наличие эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов, качество CD4+ Т-хелперов, элиминация или подавление активации Treg и разрушение иммуносупрессивного опухолевого микроокружения [203]. Ограниченная эффективность ДК-вакцин при саркомах может быть связана со снижением Т-клеточного ответа под воздействием опухолевых клеток и их микроокружения: Treg, миелоидных супрессорных клеток и опухолеассоциированных макрофагов [65]. Также причиной ограниченной эффективности вакцин может быть отсутствие непрерывного процесса иммуноредактирования, который приводит к потере экспрессии антигенов [181].

Дальнейшее изучение СМТ, в частности, изучение поведения опухолевых клеток в моделируемых условиях иммуносупрессирующего микроокружения *in vitro*, оценка

эффекторной функции лимфоцитов, эффективности ДК-вакцины собственного производства «CaTeVac», разработка подходов внедрения ее в широкую клиническую практику в лечебном и адьювантном режиме представляется перспективным и многообещающим [3, 18].

### 1.5 Заключение

В современной концепции опухолевого роста центральным становится понятие опухолевого микроокружения, которое активно взаимодействует с малигнизированными клетками и участвует в их росте, инвазии, метастазировании, а также «ускользании» от иммунного надзора. Противоопухолевый иммунный ответ, который осуществляется с помощью инфильтрирующих опухоль иммунных клеток, неразрывно связан с иммуноредактированием, приводящим к снижению иммуногенности злокачественного новообразования. Также опухолевое микроокружение способствует иммуносупрессии, необходимой для выживания опухоли в организме. Следовательно, актуальной задачей является изучение экспрессии опухолью рецепторов хемокинов, продукции этих и других факторов, участвующих в привлечении эффекторных клеток, которые осуществляют противоопухолевый иммунный ответ, или клеток, формирующих иммуносупрессивное микроокружение. Важно выявить взаимосвязь между уровнем данных хемокинов в опухоли и экспрессией соответствующих рецепторов на различных субпопуляциях клеток, циркулирующих в периферической крови, для понимания их прогностического значения.

Резистентность СМТ к стандартной химиотерапии во «второй» и последующих линиях химиотерапии диктует необходимость разработки и использования *in vitro* новых методов для прогностической оценки эффективности лекарственных препаратов в отношении этих новообразований с учетом индивидуальных особенностей опухоли. Однако использование при моделировании *in vitro* только опухолевых клеток ограничивает применение полученных результатов. Становится необходимым комплексный подход, включающий помимо культуры злокачественных клеток как минимум представителей иммунного и воспалительного микроокружения, а именно разных субпопуляций Т-лимфоцитов, макрофагов, ДК. Это позволит моделировать и изучать межклеточные взаимодействия и их влияние на выживание и пролиферацию опухолевых клеток, а также оценить эффективность различных, в том числе, иммунологических подходов к персонализированному лечению СМТ.

## Глава 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с задачами исследования работа была разделена на 2 части: клиническую и лабораторную.

#### 2.1. Материалы

В исследование всего включено 124 больных саркома мягких тканей, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2008 по 2018 гг. У всех больных на момент включения в исследование была диагностирована распространенная форма СМТ соответствующей III-IV стадии заболевания.

В клиническую часть работы включено 69 пациентов. Произведена оценка иммунологической и клинической эффективности проведенного лечения: В первую группу вошли больные, получавшие стандартное лекарственное лечение и никогда не получавшие «CaTeVac», всего 30 пациентов, 11 мужчин и 19 женщин, средний возраст составил 45 лет (от 26 до 79 лет); Во вторую группу вошли больные, получавшие вакцину на основе зрелых периферических дендритных клеток собственного производства «CaTeVac» на этапе системного лечения, всего 39 пациентов, 10 мужчин и 29 женщин, средний возраст больных составил 43 лет (от 13 до 76 лет).

От всех пациентов или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие на проведение иммунотерапии ДКВ «CaTeVac».

Объектом лабораторного исследования были образцы биологического материала, полученные в рамках диссертационной работы, которые были изучены в ходе всех этапов разработки экспериментальных моделей: 1) 26 клеточных культур сарком мягких тканей на различных пассажах; 2) образцы аутологичной опухоли: местный рецидив первичной опухоли (5 образцов), метастатический очаг (21 образец); 3) супернатанты клеточных культур сарком мягких тканей на различных пассажах (19 образцов); 4) мононуклеары (МНК) периферической крови (40 образцов); 7) зрелые вакцинные ДК (6 образцов).

#### 2.1.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование

Для отбора больных использовали общепринятые в клинической практике критерии включения и исключения.

##### *Критерии включения в исследование:*

- морфологически подтвержденный диагноз саркомы мягких тканей;
- проведение ранее стандартной лекарственной терапии (для больных III-IV стадии);

- ECOG оценка 0 – 2;
- Возраст  $\geq 12$  лет.
- адекватная сердечная функция ( $\leq$ ХСН II ФК класс по NYHA), гипертоническая болезнь  $\leq$  II стадии или артериальная гипертензия  $\leq 2$  степени;
- адекватная гемопозитическая функция: абсолютное содержание нейтрофилов (ANC)  $\geq 1,5 \times 10^9$ /л; тромбоциты  $\geq 100 \times 10^9$ /л; уровень гемоглобина  $\geq 90$  г/л;
- адекватная функция печени (отсутствие повышения трансаминаз и билирубина более 1 ст. (NCICTCAE v4.0), за исключением пациентов с метастатическим поражением печени, у которых допустима 2 ст. повышения указанных показателей);
- адекватная функция почек: креатинин в периферической крови  $\leq 115$  мкмоль/л или клиренс более 50 мл/мин;
- согласие пациентов применять надежные методы контрацепции на протяжении всего исследования;
- наличие добровольно подписанного пациентом или его законным представителем информированного согласия на использование медицинской технологии.

***Критерии исключения из исследования:***

- наличие метастазов в головном мозге или его оболочках (за исключением больных после стереотаксической лучевой терапии);
- вторичный (приобретенный) иммунодефицит (по клинико-лабораторным данным), включая заболевания, приводящие к иммунодефициту, в т.ч. системное использование кортикостероидов или других иммуносупрессивных препаратов;
- неконтролируемое инфекционное заболевание или другое тяжелое сопутствующее заболевание;
- состояния, которые, по мнению исследователя, могут привести к невыполнению процедур исследования или к чрезмерному риску НЯ в ходе исследования;
- несоблюдение больным процедур исследования или наличие препятствий к их соблюдению;
- беременность и лактация;
- участие в любом клиническом исследовании лекарственного или иммунобиологического препарата;
- аллергическая реакция на компоненты терапии.

Для оценки эффективности иммунотерапии на основе аутологичных ДК, активированных аллогенными раково-тестикулярными антигенами, была набрана группа контроля (группа 1), куда вошли пациенты, получавшие только стандартную химиотерапию 2-й и последующих линии (30 больных). В группу «CaTeVac» (группа 2) вошли пациенты, получавшие 2 и более линии системного лекарственного лечения, и одним из этапов являлась иммунотерапия аутологичной ДК-вакциной (n=39). Для группы больных, получавших иммунотерапию, данное лечение проводилось в основном во 2-й и 3-й линии лекарственной терапии.

Характеристика пациентов, получавших противоопухолевое лечение, приведена в табл. 1. Все больные, включенные в исследование, были с установленным диагнозом СМТ, не включая ГИСО, и на разных этапах лечения. Гистологические подтипы СМТ в обеих группах представлены на рис. 1 и 2. Самыми часто встречаемыми подтипами оказались синовиальная саркома, липосаркома и лейомиосаркома.

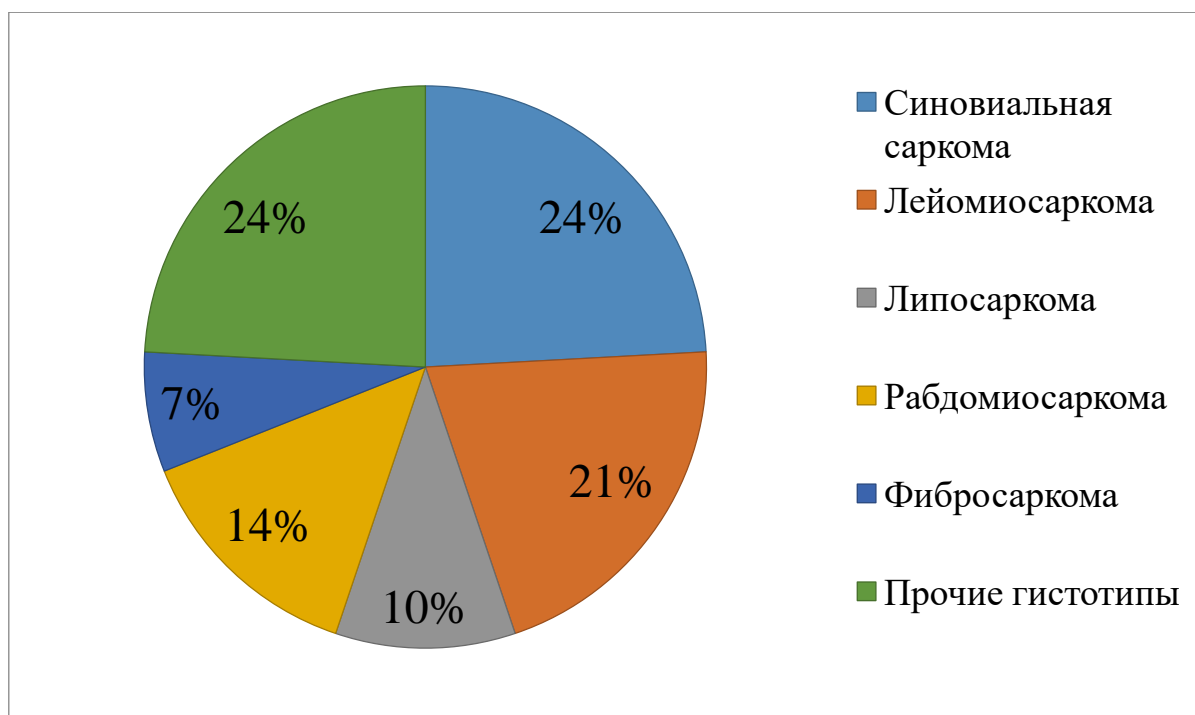


Рисунок 1. Разновидности гистологических подтипов в группе №1



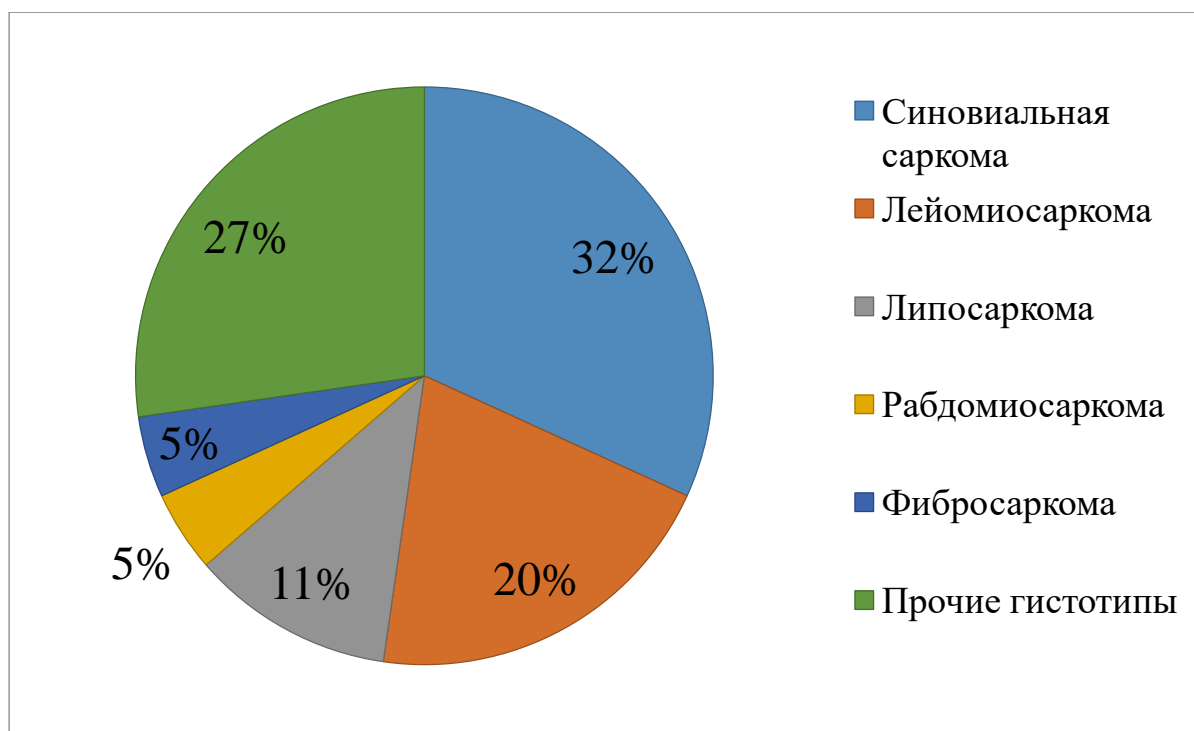


Рисунок 2. Разновидности гистологических подтипов в группе №2

В обеих группах больные распределились однородно по возрасту, полу и полученным схемам ХТ первой и второй линии (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Линии ЛТ*	Характеристика	Группа №1	Группа №2	Коментарий
	N	30	39	
	Пол (м/ж)	11/19	10/29	p=0,43
	СВ** (диапазон)	45(26-79)	43(13-76)	p=0,48
	стадия	IIIВ, n□ 4 IV, n□ 26	IIIВ, n□ 4 IV, n□ 35	p=0,72
1 линия	ХТ «А»***(+)	25	34	p=74
	ХТ	5	5	
	CaTeVac	0	0	
2 линия	ХТ «А»(+)	10	8	p=1
	ХТ	20	17	

	CaTeVac	0	14	
3+ линии	ХТ «А»(+)	0	2	p=0.22
	ХТ	14	11	
	CaTeVac	0	25	

\* ЛТ – лекарственная терапия

\*\*СВ – средний возраст

\*\*\* ХТ «А»<sup>\*\*\*</sup>(+) –антрациклинсодержащие схемы химиотерапии

Больным, получавшим индивидуальную противоопухолевую вакцину на основе ДК, проводили забор крови перед каждой нечетной вакциной. После получения клеточного препарата производили введение аутологичных зрелых ДК внутривенно паравертебрально в 4 точки в дозе 5-30 млн. клеток на одну инъекцию с интервалом для 1-й, 2-й вакцинации – 2 недели, для 3-й, 4-й вакцинации – 3 недели и 5-12 вакцинации – 4 недели. За 3 дня до введения вакцины с иммуномодулирующей целью, в/в капельно в течение 20-25 минут вводился циклофосфамид в дозе 300 мг. Известно, что в/в введение низких доз циклофосфамида уменьшает количество Т-регуляторных (Т-супрессорных) лимфоцитов в периферической крови [158, 270].

Исследование иммунологических показателей проводили перед каждым нечетным циклом вакцинотерапии с помощью метода проточной цитофлюориметрии, кроме этого эффективность ДК-вакцины РТА<sup>+</sup> изучали на автоматическом клеточном анализаторе xCELLigence.

Для оценки клинической эффективности вакцинотерапии использовали критерии RECIST v1.1. Оценка нежелательных явлений проводилась по шкале токсичности СТСАЕ v.5.0.

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Приготовление аутологичной дендритноклеточной вакцины

#### 2.2.1.1 Получение ДК

Дендритные клетки получали из моноцитов периферической крови путем дифференцировки *in vitro*, активировали созревание ДК и нагружали их опухолевыми антигенами.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности. Для этого периферическую венозную кровь разбавляли равным объемом питательной среды RPMI-1640 (ООО «Биолот», РФ), полученную суспензию наслаивали на 2,5 мл Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Великобритания) в 15-мл стерильных центрифужных пробирках до 13-14 мл, не допуская перемешивания жидкостей, и центрифугировали при 1500

об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре. МНК собирали пастеровской пипеткой на границе раздела фаз по всей площади сечения пробирки, вносили в стерильные 15-мл центрифужные пробирки и дважды отмывали неполной питательной средой RPMI-1640 при 1000 об/мин в течение 10 минут. Подсчет МНК и оценку их жизнеспособности проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Invitrogen, США) с окраской 0,4% трипановым синим.

Моноциты выделяли методом адгезии на пластике, для чего МНК в неполной питательной среде RPMI-1640 в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл помещали в 2 плоскодонных культуральных флакона 75 см<sup>2</sup> с вентилируемыми пробками (Sarstedt AG & Co., Германия) и инкубировали в условиях контролируемого 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности при 37°C в инкубаторе «Heracel» (Termo Electron LTD GmbH, Германия). Через 2 часа аккуратно отбирали жидкую фракцию с непрекрепившимися клетками, а к клеткам, адгезированным на пластике, добавляли бессывороточную среду CellGro DC (CellGenix, Германия). На 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования добавляли GM-CSF (72 нг/мл) (препарат Неостим, ЗАО «Фармсинтез», РФ) и IL-4 (20 нг/мл) (CellGenix, Германия). На 7-е сутки культивирования вносили лизированные опухолевые клетки (в соотношении 1:3) и ростовые факторы: GM-SCF (72 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл) и TNF-α (20 нг/мл) (BD Bioscience, США) и инкубировали в течение 48 часов. Затем ДК отмывали в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, содержащего 10% альбумина человека, производили подсчет и оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Invitrogen, США) и 0,4% трипанового синего.

Для приготовления ДК вакцины 1/2 клеток (от 5 до  $10 \times 10^6$ ) ресуспендировали в 1,5 мл 0,9% раствора NaCl, содержащего 10% альбумина человека, переносили в ампулу и доставляли в клиническое отделение для введения больному. Другую 1/2 ДК криоконсервировали и хранили в жидком азоте до следующей вакцинации.

#### **2.2.1.2. Характеристика ДК**

Научное прижизненное исследование ДК проводили на всех этапах культивирования с помощью инвертированного микроскопа. Экспрессию наиболее значимых антигенов на зрелых ДК исследовали на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США), для этого к клеткам добавляли моноклональные антитела (mAb), меченые флуорохромами: anti-CD83-PE-Cy5, anti-CD1a-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CCR7-FITC, anti-HLA-DR-Per CP-Cy5.5 (BD Biosciences, США).

### 2.2.1.3 Криоконсервация и размораживание ДК

Для криоконсервации ДК помещали в криосреду (90% аутологичной плазмы и 10% диметилсульфоксида (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США) и переносили в индивидуально маркированные криопробирки (Sarstedt AG & Co., Германия). Криоконсервацию осуществляли с помощью программного замораживателя Computer Freezer «Ice-Cube 14S» (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  в диапазоне от  $+4^{\circ}\text{C}$  до  $-4^{\circ}\text{C}$ , и  $-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  в диапазоне от  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $-120^{\circ}\text{C}$ ). Затем криопробирки переносили в индивидуальные контейнеры с жидким азотом ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) и хранили в криобанке до использования.

Перед применением ДК-вакцины криопробирку с клетками помещали на 3 минуты в водяную баню при температуре  $+42^{\circ}\text{C}$ , после исчезновения кристаллов льда клеточную суспензию переносили в стерильную 15-мл пробирку и разбавляли не менее чем десятикратным избытком 0,9% раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%). Клетки отмывали двукратным центрифугированием (1000 об/мин в течение 10 минут) в 10 мл 0,9% раствора NaCl, производили подсчет и оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Invitrogen, США) и 0,4% трипанового синего.

### 2.2.1.4. Источник антигенов для изготовления ДК вакцины

Источниками антигенов для изготовления ДК вакцин служили клеточные линии, полученные от больных меланомой кожи человека, охарактеризованные и экспрессирующие опухольассоциированные антигены (ОАА), которые представлены в табл. 2.

Таблица 2. Антигенный состав культивируемых клеточных линий меланомы кожи человека, используемых для приготовления ДК-вакцины.

Антигены	Клеточные линии меланомы кожи			
	226	253	515	520
Melan-A	+		+	
tyrasinase	+		+	
TRP-1,2	+			
MITF	+			
S100	+	+	+	+
CD63	+	+	+	+
CD146	+	+	+	+
Gp 100	+		+	
HLA1			+	+

HLA2			+	+
MAGE 1	+		+	
MAGE A1	+	+		
MAGE A2	+	+		
MAGE A3	+	+		
MAGE A4	+	+		
MAGE A6	+	+		
MAGE A10	+	+		
MAGE A12	+	+		
MAGE B2	+	+		
MAGE C1	+			
Семейство BAGE	+	+		
GAGE 2	+	+		
GAGE 3	+	+		
GAGE 4	+	+		
NY-ESO-1	+	+	+	
B7-H1	+			

### **2.2.2. Изучение клеток иммунной системы у больных с саркомами мягких тканей методом проточной цитометрии.**

Исследование проводилось в лаборатории научного отдела онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России согласно разработанным рекомендациям. Для исследования использовалась цельная кровь больных с установленным диагнозом СМТ.

#### **2.2.2.1. Оценка содержания основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток методом проточной цитофлуориметрии**

В исследовании больные были разбиты на две группы. В первую клиническую группу входили пациенты, получавшие иммунотерапию. Забор крови производился до начала лечения и после проведения 1-2 циклов иммунотерапии «CaTeVac». Всего изучено 148 образцов крови у 45 пациентов.

Для исследования содержания основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток проводился забор периферической венозной крови больного в вакутейнер - BD Vacutainer

(Becton Dickinson, США) содержащий ЭДТА, объемом 4 мл. Кровь пациента с помощью дозатора вносили в 8 пробирок для цитофлюориметрического анализа (12x75 мм) по 100 мкл в пробирку. В каждую пробирку вносили по 20 мкл антител, меченых соответствующим флюорохромом соответствии с табл. 3.

Таблица 3. Список антител для выполнения исследования содержания основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

Пробирка №	Антитела	Флюорохром
1	BD Leucogate™ CD45/CD14	FITC/PE
2	Isotype Control IgG <sub>1</sub> /IgG <sub>2a</sub>	FITC/PE
3	CD3/CD19	FITC/PE
4	CD3/CD4/HLA-DR	FITC/PE/PerCP
5	CD3/CD8/HLA-DR	FITC/PE/PerCP
6	CD3/CD16+CD56	FITC/PE
7	CD3/CD4/CD8	FITC/PE/PerCP
8	CD25/CD127/CD4	FITC/PE/PerCP-Cy™5.5

После добавления антител пробу перемешивали на автоматическом миксере Digital Vortex Mixer (Fisher Scientific, США) в течении 1-3 секунд на скорости 3000 оборотов в минуту и инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течении 20 минут. По окончании инкубации для лизирования эритроцитов в пробу добавляли 2 мл лизирующего раствора BD Simultest IMK-Lymphocyte Lysing Solution (BD Bioscience, США), состоящего из 15% формальдегида и 50% диэтиленгликоля в солевом растворителе, разведенного в дистиллированной воде в соотношении 1/10. Пробу перемешивали на автоматическом миксере и инкубировали в течении 10 минут в темноте при комнатной температуре, затем центрифугировали при скорости 250g в течении 5 минут с помощью центрифуги Heraeus Labofuge 400 Centrifuges (Thermo Fisher Scientific, США). Далее удаляли надосадочную жидкость, вносили 1 мл раствора для разбавления клеточной суспензии CellWASH (BD Bioscience, США), перемешивали и повторно центрифугировали при скорости 250g в течении 5 минут. Затем удаляли надосадочную жидкость, вносили 0,5 мл раствора CellWASH и перемешивали.

Пробу анализировали методом проточной цитометрии на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США). Оценивали относительное количество лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, ЦТЛ, НК- и НКТ-клеток, регуляторных Т-клеток, HLA-DR-позитивных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, CD25+ Т-хелперов, вычисляли

иммунорегуляторный индекс. Для подсчета абсолютного количества иммунокомпетентных клеток применяли двухплатформенную систему анализа, расчет производился с использованием результатов гематологического анализатора. Фенотипы определяемых субпопуляций показатели представлены в табл. 4.

Таблица 4. Основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток и их фенотип.

Номер	Показатель	Фенотип
1	Т- лимфоциты	CD3+CD19-
2	В- лимфоциты	CD3- CD19+
3	Т- хелперы	CD3+CD4+
4	Активированные Т-хелперы	CD3+CD4+HLA-DR+
5	Активированные Т-хелперы	CD4+CD25+
6	Цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+
7	Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+HLA-DR+
8	Двойные положительные CD4/CD8 Т-лимфоциты	CD3+CD4+CD8+
9	Двойные отрицательные Т-лимфоциты	CD3+CD4-CD8-
10	НК-клетки	CD3-CD16+56+
11	НКТ-клетки, НКТ-подобные лимфоциты, $\gamma\delta$ -Т-клетки	CD3+CD16+56+
12	Т-регуляторные лимфоциты	CD4+CD25brightCD127+
13	Иммунорегуляторный индекс	CD4+/CD8+

#### 2.2.2.2. Анализ субпопуляции регуляторных Т-клеток в периферической крови больных с СМТ методом проточной цитометрии.

Для оценки супрессирующей функции регуляторных Т-клеток у больных с СМТ изучили экспрессию этими клетками белков CCR10, CCR4 (CD194), VEGFR-2 (CD309) и Neuropilin-1 (CD304).

В исследование были включены 35 больных СМТ, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» с 2013 по 2017 гг. Критерии включения: возраст старше 18 лет, гистологический верифицированный диагноз СМТ, отсутствие острых инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний в период обострения, свободный период от приема кортикостероидов или других иммунодепрессантов в течении последних 10 дней до включения в исследование. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 5.

Таблица 5. Характеристика больных СМТ, включенных в исследование супрессирующей функции Treg.

Характеристика	Количество пациентов (n=35)
Средний возраст, годы	48 (18-80)
Пол:	
мужчины	9 (25,7%)
женщины	26 (74,3%)
Локализация первичного очага:	
конечность	18 (51,43%)
туловище	7 (20%)
внутренние органы	10 (28,57%)
Метастазы в легких:	
есть	17 (48,57%)
нет	18 (51,43%)
Характеристика опухоли:	
лейомиосаркома	5 (14,29%)
липосаркома	11 (31,43%)
синовиальная саркома	11 (31,43%)
миксофибросаркома	1 (2,86%)
светлоклеточная саркома	2 (5,71%)
веретенноклеточная саркома	2 (5,71%)
внескелетная хондросаркома	2 (5,71%)
фибросаркома	1 (2,86%)
Количество линий предшествующей терапии:	
Не получали системного лечения	8 (22,8%)
1	5 (14,3%)
2	9 (25,7%)
3 и более	13 (37,1%)

Для исследования проводили забор периферической венозной крови в вакутейнер - BD Vacutainer (Becton Dickinson, США) содержащий ЭДТА, объемом 4 мл. В пробирку для цитофлюориметрического анализа (12x75 мм) добавляли раствор моноклональных антител, меченых флюорохромом, (по 10 мкл каждого mAB) в соответствии с табл. 6.



Таблица 6. Список антител для оценки иммуносупрессирующей функции Treg.

Пробирка №	Антитела	Флюорохром
1	CD25/CD4/CD127/ CD194/CD304/CCR 10	FITC/PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5/PE/ BV510/BV421/APC
2	CD25/CD4/CD127/ CD194/CD304/CD309	FITC/ PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5/ PE/ BV510/BV421/Alexa Fluor® 647

В каждую пробирку добавляли 100 мкл периферической крови, пробы перемешивали при помощи автоматического миксера. Методика пробоподготовки соответствовала описанной в разделе 2.2.2.1.

Анализ субпопуляционного состава T регуляторных лимфоцитов производили на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto<sup>TM</sup> II (BD Bioscience, США).

### 2.2.3. Получение клеточных культур СМТ

Удаленные интраоперационно фрагменты опухолевой ткани размером не менее 1 см<sup>3</sup> немедленно помещали в контейнер, содержащий полную питательную среду DMEM/F12 (ООО «Биолот», РФ) с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки (ООО «Биолот», РФ). Образцы переносили в ламинар, установленный в стерильном боксе, и измельчали стерильным скальпелем на фрагменты размером не более 3 мм<sup>3</sup>. Затем их помещали в Медиконы (стерильные ножи) (ДАКО, Дания) в 1 мл питательной среды без сыворотки и подвергали механической автоматической дезагрегации в течение 1-2 минут. Далее вскрывали верхнюю крышку стерильного ножа, отбирали клеточную суспензию с помощью инсулинового шприца и пропускали ее через стерильные фильтры диаметром 50-70 мкм, после чего центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут. Подсчет полученных клеток производили на автоматическом счетчике Countess<sup>TM</sup> (Invitrogen, США) с окрашиванием трипановым синим.

Клетки помещали в стерильные пластиковые флаконы (Sarstedt AG & Co., Германия) в полной питательной среде DMEM/F12 с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина (150 мг/500 мл среды), пенициллина (25000 Ед/500 мл среды), стрептомицина (25 мг/500 мл среды), трансферрина (5 мкг/мл), инсулина (5 мкг/мл), селена (5 нг/мл) и культивировали при 100% влажности, 5% CO<sub>2</sub> и 37°C в инкубаторе CO<sub>2</sub>-инкубатор «Heracel» (Termo Electron LTDGmbH, Германия). При достижении монослоя клетки пересеивали с помощью раствора Версена с добавлением 0,25% трипсина (ООО «Биолот», РФ). Пересев осуществляли в соотношении 1:1 или 1:2 1-2 раза в неделю.

Каждые пять пассажей отбирали супернатанты клеточных культур СМТ: 500 мкл супернатанта помещали в эппендорфы объемом 1,5 или 2 мл и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

#### **2.2.4 Иммуноферментный анализ содержания хемокинов в супернатантах клеточных культур СМТ**

Изучены супернатанты клеточных культур СМТ на разных пассажах, определяли содержание хемокина CCL2 и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF. Всего проанализировано 23 образцов супернатантов клеточных культур СМТ. Контролем служили супернатанты культуры нормальных фибробластов кожи человека.

Исследование проводили методом непрямого иммуноферментного анализа в «сэндвич»-варианте. Для определения CCL2 использовали набор DCP00 Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D, США), концентрацию VEGF оценивали с помощью набора Human VEGF-A ELISA (Bender MedSystems, Австрия).

В соответствующие лунки 96-луночного стрип-планшета вносили 200 мкл стандартного образца, контрольного образца или исследуемого супернатанта культуры СМТ и инкубировали в течении 2 часов при комнатной температуре в защищенном от света месте. Затем трижды промывали лунки с помощью 400 мкл промывочного буфера. Далее в каждую лунку вносили по 200 мкл антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, и инкубировали в течении 1 часа. После инкубации трижды промывали лунки промывочным буфером. Во все лунки добавляли 200 мкл раствора субстрата (0,2 % раствор пероксида водорода и тетраметилбензидина (ТМБ) в цитратном буфере) и инкубировали в течении 30 минут в защищенном от света месте, после чего вносили в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента. Анализ проводили с помощью многопараметрового фотометра «Multiskan EX» (Thermo Electron Corporation, США), абсорбцию регистрировали при длине волны 450 нм.

#### **2.2.5 Мультиплексный анализ панели онкомаркеров в супернатантов культур опухолевых клеток**

##### **2.2.5.1 Принцип метода (технология xMAP)**

Принцип метода заключается в использовании микросфер, содержащих два флюоресцентных красителя в конкретных соотношениях и конъюгированных с mAB к конкретному аналиту. С помощью лазера-классификатора осуществляется одновременная детекция до 100 разных микросфер и качественное определение аналитов. Использование вторых антител, меченых стрептавидином-фикоэритрином, и лазера-репортера позволяет определить концентрацию аналита на основании интенсивности флюоресценции.

### 2.2.5.2 Описание методики

В исследовании методом мультиплексного анализа с использованием Bio-Plex Pro 200 (BioRad, США) оценили концентрацию опухолевых маркеров в супернатантах культур СМТ. Всего проанализировали 23 образца супернатантов культур СМТ. Изученные онкомаркеры и номера клеточных культур с указанием пассажа приведены в табл. 7.

Таблица 7. Онкомаркеры, изученные в супернатантах клеточных культур СМТ методом мультиплексного анализа

Название набора	Онкомаркеры	Номера культур, пассажи
Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel 1, 16-plex (Bio-Rad, США)	sEGFR, FGFb, Follistatin, G-CSF, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, Leptin, Osteopontin, PDGF-AB/BB, PECAM-1, Prolactin, SCF, sTIE-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2	№678 (2p), №699 (3p), №705 (3p), №702 (2p), №710 (3p), №726 (15p), №763 (5p), №728 (5p), №739 (10p), №507 (11p), №776 (6p), №782/1 (3p), №793 (4p), №814 (6p)
Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel 2, 18-plex (Bio-Rad, США)	Angiopoietin-2, sCD40L, EGF, Endoglin, sFASL, HB-EGF, IGFPB-1, IL-6, IL-8, IL-18, PAI-1, PLGF, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , uPA, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D	№716 (15p), №726 (15p), №763 (5p), №728 (10p), №735 (10p), №507 (11p), №749 (6p), №710 (15p), №776 (2p)

В 96-луночный планшет с помощью многоканального дозатора переносили магнитные частицы по 50 мкл в каждую лунку и дважды отмывали промывочным буфером с помощью промывающего устройства Bio-Plex Pro™ II Wash Station (Bio-Rad, США). Затем в соответствующие лунки планшета вносили стандартные образцы в соответствующих разведениях, бланк (буфер для исследования) и образцы супернатантов клеточных культур по 50 мкл в лунку. Инкубировали на шейкере Cobas EIA Incubator (Roche, Швейцария) в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте, трижды отмывали с помощью отмыли промывающего устройства. Далее в лунки добавляли по 25 мкл детектирующих антител, инкубировали на шейкере в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте и выполняли трехкратную отмывку. Затем в каждую лунку добавляли стрептовидин, конъюгированный с фикоэритрином (SA-PE), инкубировали 10 минут в тех же условиях, после чего трижды

отмывали. Добавляли в лунки по 125 мкл буфера для исследования, инкубировали на шейкере в течение 30 секунд, после чего анализировали с помощью системы мультиплексного анализа Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США) с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager™ (Bio-Rad, США). Полученные в ходе анализа значения интенсивности флуоресценции автоматически экстраполировались на стандартную кривую для расчета концентрации. Значения, экстраполированные ниже определяемого диапазона, принимались за «0». Результат получали в пг/мл.

## 2.2.6 Изучение пролиферативной активности и индивидуальной химиочувствительности культур клеток СМТ в аналитической системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ v.2

### 2.2.6.1 Принцип метода (технология Cell-IQ)

Наблюдение за пролиферативной активностью опухолевых клеток проводили с помощью автоматического клеточного анализатора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) методом фазового контраста в течение 72 часов. Для количественной оценки общего числа живых опухолевых клеток создавали специальный протокол на основе библиотеки различных типов клеточных образов, который использовали для количественного и качественного анализа изображений делящихся клеток в режиме реального времени (рис. 3).

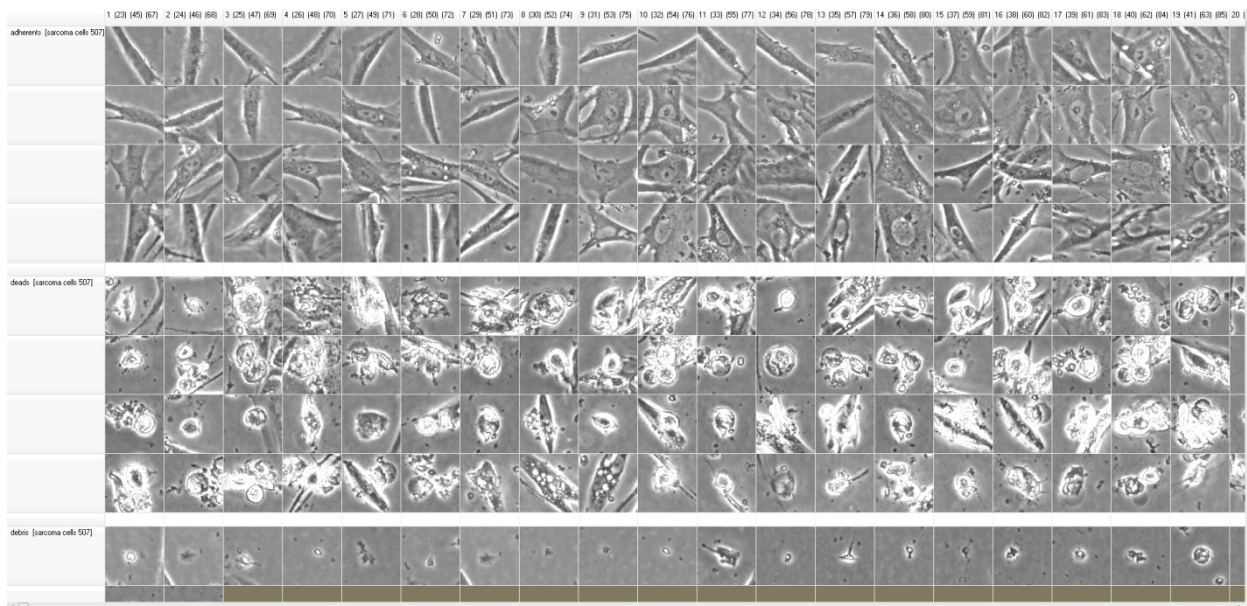
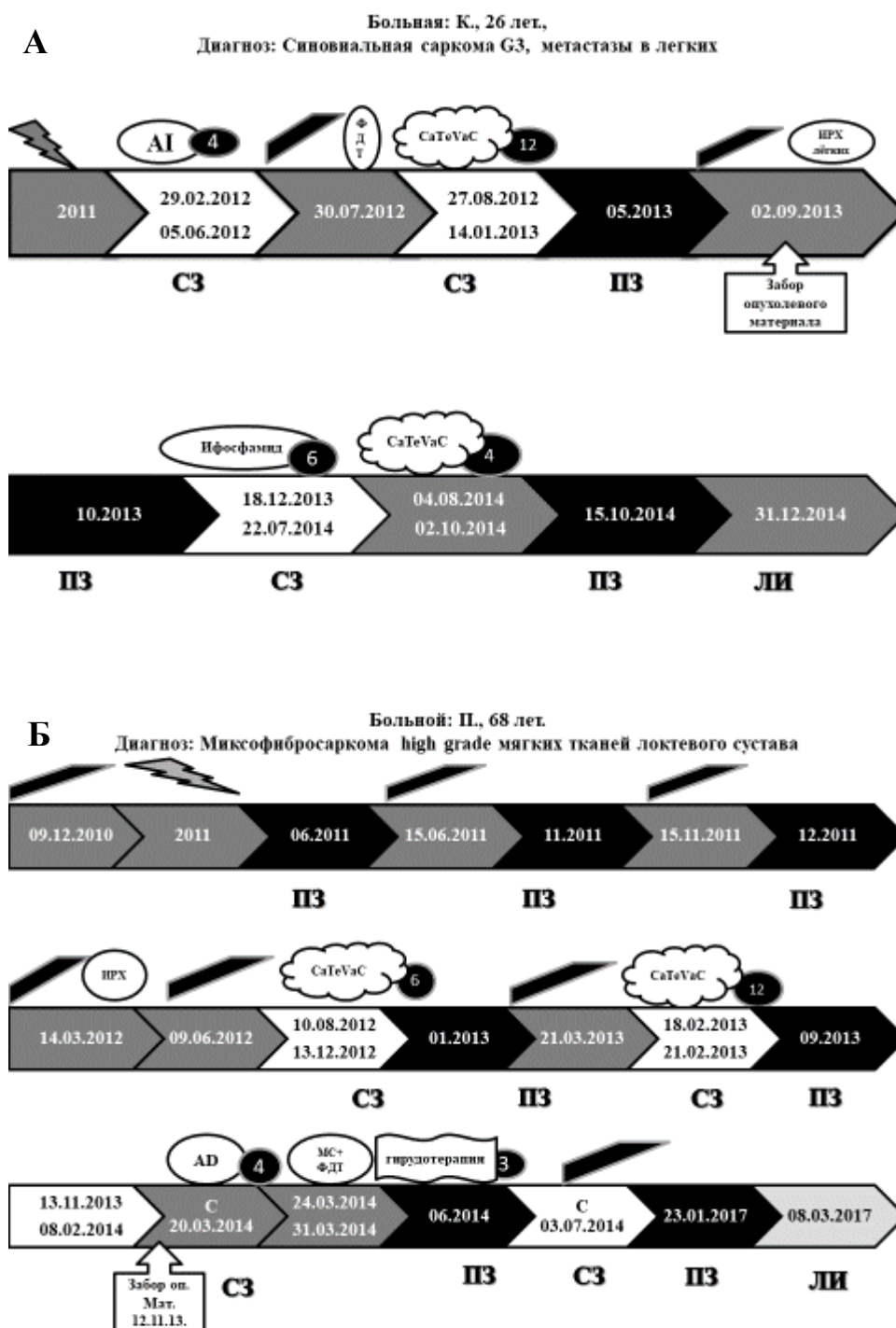


Рисунок 3. Пример библиотеки клеточных образов (культура синовиальной саркомы №507), созданной для анализа пролиферативной активности опухолевых клеток.

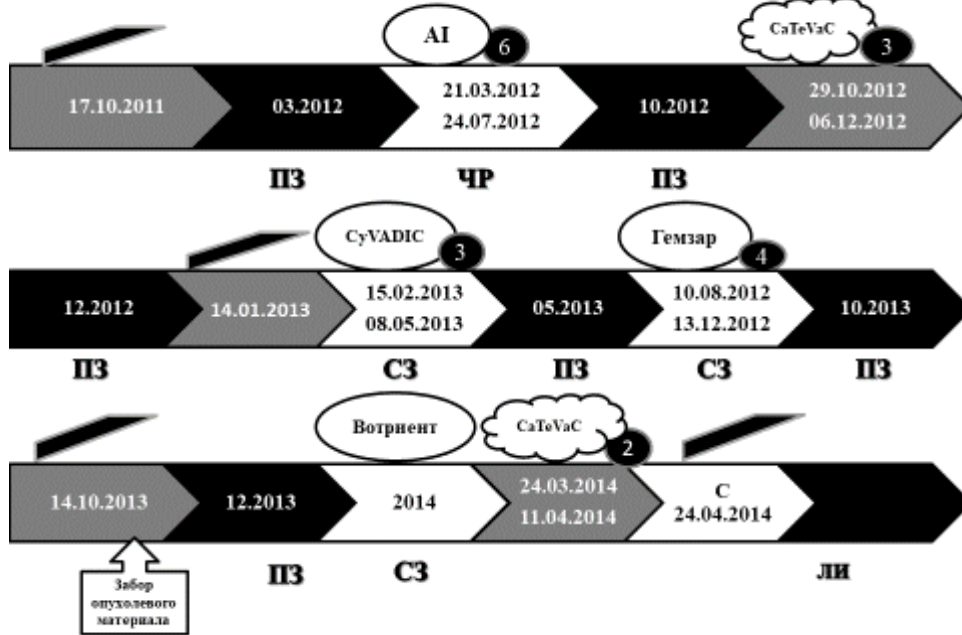
### 2.2.6.2 Описание культур СМТ, включенных в исследование

В работе изучили пролиферативную активность клеточных культур сарком мягких тканей №507 и №763 (синовиальная саркома), №678 и №933 (миксофибросаркома), №749 (лейомиосаркома). Опухолевые клетки были получены из образцов операционного материала пациентов, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с 2011 по 2017 гг. На рис. 4 схематически обозначены режимы лечения и время забора опухолевого материала.



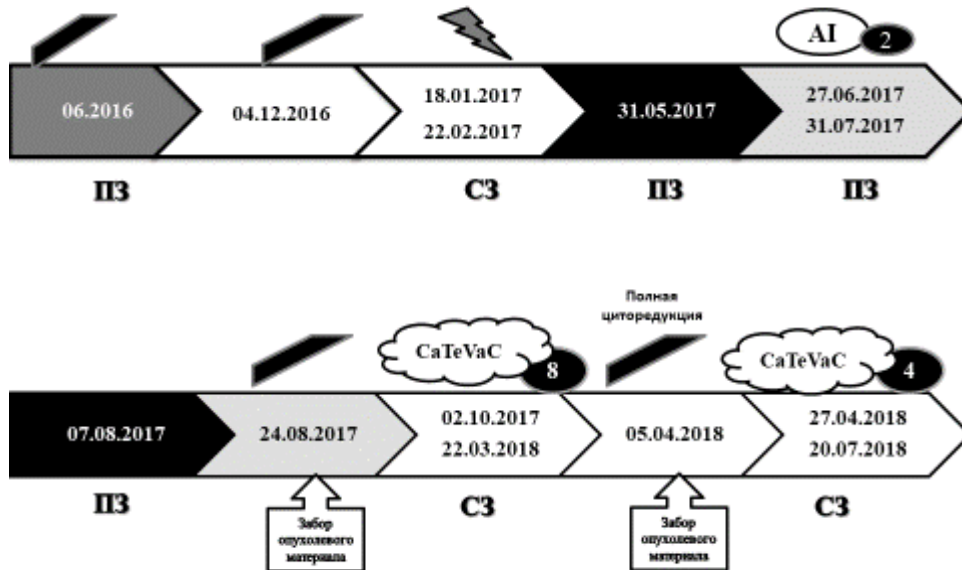
**В**

Больная: М., 50 лет.  
 Диагноз: Монофазная синовиальная саркома забрюшинного пространства



**Г**

Больной: Г., 39 лет.  
 Диагноз: Миксофибросаркома мягких тканей подмышечной области G3, метастазы в легких





действие, связанное с изменением клеточных функций в результате связывания с липидами клеточных мембран и взаимодействием с топоизомеразой II.

Ифосфамид – алкилирующее соединение, производное оксазафосфоринов, противоопухолевая активность которого обусловлена алкилированием нуклеофильных центров, нарушением синтеза ДНК и блокадой митотического деления опухолевых клеток. Неактивная транспортная форма этого препарата метаболизируется в фармакологически активный метаболит 4-гидроксиифосфамид, который активизируется ферментами фосфоамидазами в печени и опухоли.

В табл. 8 представлены основные сведения о фармакокинетических свойствах доксорубицина и ифосфамида.

Таблица 8. Фармакокинетические свойства лекарственных средств, использованных в эксперименте

Наименование лекарственного средства	Основные фармакокинетические параметры			Концентрации, использованные в эксперименте мкг/мл
	Пик концентрации препарата в плазме крови мкг/мл	Период полувыведения (T <sub>1/2</sub> ), ч	Клиренс мл/мин/м <sup>2</sup>	
Эпирубицин	0,24-0,6	20-48	8-20	0,05; 0,5; 1,0
Ифосфамид	221,96	7	78-194	20; 200; 400

## **2.2.7 Моделирование опухолевого микроокружения *in vitro* путем воздействия зрелых дендритных клеток, мононуклеаров и различных цитокинов на первичные культуры и клеточные линии сарком мягких тканей в аналитической системе xCELLigence® RTCA DP**

### **2.2.7.1 Принцип метода**

Аналитическая система xCELLigence® RTCA DP использует неинвазивный радиоперехват электрического сопротивления (импеданса) на электродах, расположенных на дне лунок планшета, для количественной оценки пролиферации клеток, изменения морфологии и качества прикрепления без использования меток в режиме реального времени. Изменение импеданса зависит от протяженности контакта клеток с электродом, на основании этого параметра автоматически вычисляется клеточный индекс, характеризующий состояние клеточной культуры в конкретной точке пространства и момент времени. На рис. 5 и 6 приведены схема принципа метода и изображение импедансных электродов.



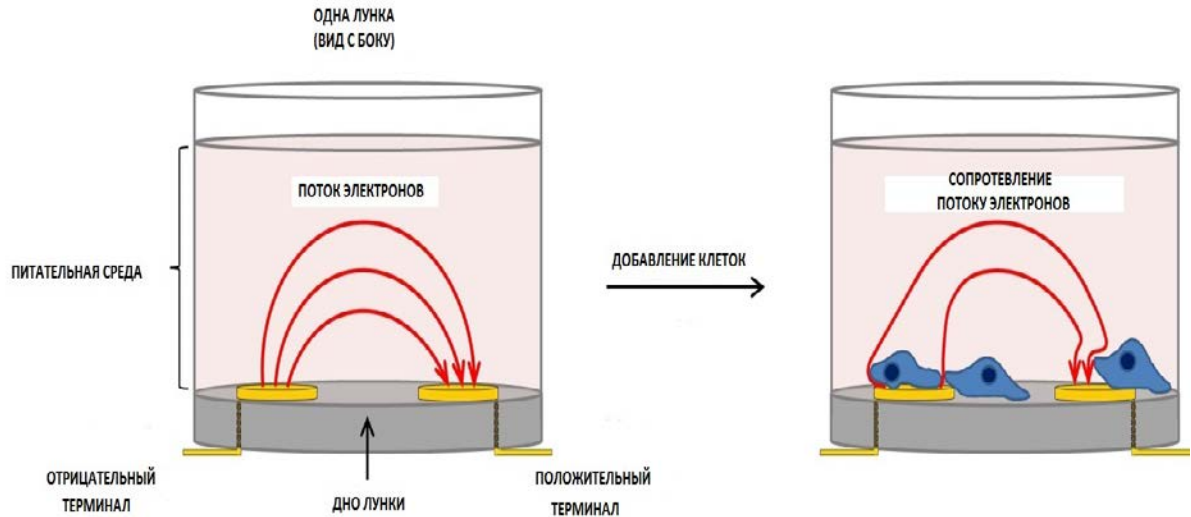


Рисунок 5. Обзор устройства клеточного импеданса: вид сбоку одной лунки до и после добавления клеток (масштаб не соблюден). В отсутствие клеток электрический ток свободно течет через культуральную среду, замыкая цепь между электродами. Поскольку клетки прикрепляются и пролиферируют на электродах, электрический ток затруднен, что обеспечивает чрезвычайно чувствительное считывание числа клеток, размера клеток, их морфологии и качества адгезии.

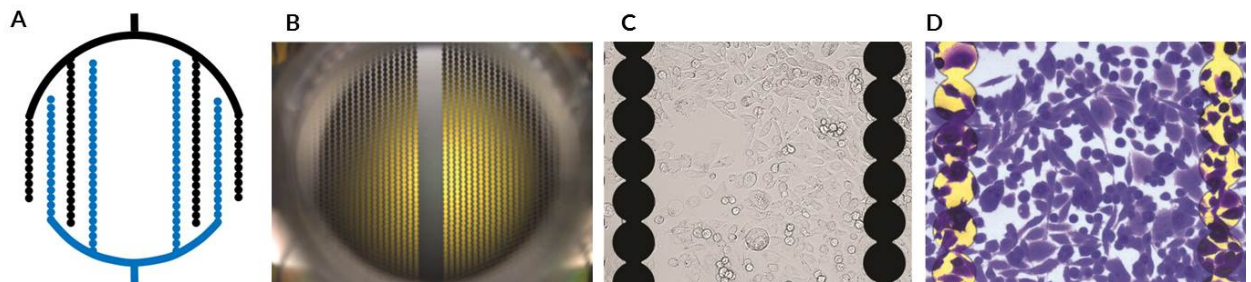


Рисунок 6. Импедансные электроды на E-Plate (E-планшет). (A) Упрощенная схема электродов, используемых в каждой лунке E-планшета. (B) Фотография одной лунки в 96-луночном планшете. (C) Увеличено изображение яркого поля затененных электродов и неокрашенных клеток. (D) Золотые электроды и окрашенные метилвиолетом клетки в оптическом микроскопе.

### 2.2.7.2 Описание экспериментальной модели опухолевого микроокружения СМТ под воздействием клеток иммунной системы в режиме реального времени в аналитической системе xCelligence

Всего воспроизведено несколько экспериментальных моделей опухолевого микроокружения на аутологичном биоматериале 5 больных с верифицированным диагнозом саркомы мягких тканей: №914 (синовиальная саркома), №678 (миксоидная фибросаркома), №862 (эмбриональная рабдомиосаркома), №932 (светлоклеточная саркома), №933 (миксоидная фибросаркома). Для создания иммунного окружения, максимально приближенного к

реальности, на опухолевые клетки воздействовали с помощью аутологичных зрелых дендритно-клеточных вакцин и моноклеаров, полученных из периферической венозной крови больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова» с 2008 по 2017 гг. Для создания экспериментальной модели опухолевого микроокружения кроме биологического материала больных применяли различные цитокины: рекомбинантный интерлейкин-2 (IL-2) человека, (препарат Ронколейкин, БИОТЕХ НПК, РФ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (ЗАО ГЕНЕРИУМ, РФ).

Клетки СМТ высевали в планшет Е-16 в количестве 20 000 клеток на лунку. Далее практически одновременно добавляли зрелые ДК, активированные аллогенным опухолевым лизатом, содержащим РТА, и моноклеары, выделенные из периферической крови больных. Соотношение опухолевых клеток/ДК/МНК – 1/3/10 [93, 190, 202]. Добавляли цитокины IL-2 и GM-CSF в физиологических дозах для культур клеток, равных 125 МЕ/мл и 72 нг/мл, также использовали низкую дозу IL-2 (50 МЕ/мл) и высокую дозу этого цитокина (1000 МЕ/мл) согласно данным литературы по экстраполяции доз на технологии *in vitro* [257]. Общая схема эксперимента отражена в табл. 9. Планшет инкубировали в течение 30 минут в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора для минимизации турбулентных потоков жидкостей. Далее устанавливали планшеты в ячейки прибора и начинали регистрацию электрических сигналов.

Таблица 9. Варианты заполнения лунок планшеты эксперимента

№	Клетки	Количество, x10 <sup>3</sup>	Цитокины	Количество
1	Опухолевые клетки (интактный контроль)	20	-	-
2	Дендритные клетки	60	-	-
3	Моноклеары	100	-	-
4	Опухолевые клетки + ДК + МНК	200+60+100	-	-
5	Опухолевые клетки + ДК + МНК	200+60+100	GM-CSF	72 нг/мл
6	Опухолевые клетки + ДК + МНК	200+60+100	IL-2	50 МЕ/мл
7	Опухолевые клетки + ДК + МНК	200+60+100	GM-CSF IL-2	72 нг/мл 125 МЕ/мл
8	Опухолевые клетки + ДК + МНК	200+60+100	IL-2	1000 МЕ/мл

Анализ полученных данных производили с помощью программного обеспечения RTCA прибора xCelligence. Были построены дозозависимые кривые, на которые был экспонирован клеточный индекс, с дискретными точками для выбранной лунки.

### 2.2.8 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием SPSS 23, R. Для систематизации и наглядного представления эмпирических данных использовали основные описательные статистики: среднее значение, минимум, максимум, медиана, среднеквадратическое отклонение, 25-й и 75-й процентиля, интерквартильный размах. Для проверки гипотезы о нормальности распределения применяли критерий Шапиро—Уилка. При исследовании взаимосвязи между номинальными и порядковыми переменными использовали таблицы сопряженности, анализ которых проводили с помощью критерия хи-квадрат и точного теста Фишера. В случае количественных признаков применяли коэффициент ранговой корреляции rho Спирмена. Определение различий в группах по значениям количественной переменной проводили с помощью t-критерия, U-критерия Манна—Уитни, критерия Краскела—Уоллиса (для межгрупповых сравнений применяли апостериорный тест Данна). Для сглаживания краткосрочных колебаний в данных, полученных при помощи клеточного анализатора Cell-IQ, применяли метод скользящего среднего по 5 значениям. Анализ выживаемости проводили на основе процедуры Каплана—Мейера. При сравнении кривых выживаемости в группах применяли логранговый критерий и критерий Гехана—Бреслоу. Для оценки взаимосвязи между предикторными переменными и частотой выживаемости использовали регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса. Все различия считали статистически значимыми на уровне значимости  $p=0,05$ .

### Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ МЕТАСТАТИЧЕСКИХ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ФАЗОВО-КОНТРАСТНОЙ МИКРОСКОПИИ CELL-IQ

В настоящее время не вызывает сомнения необходимость прогнозировать реакцию метастатических сарком мягких тканей на химиотерапию, таргетную терапию, иммунотерапию. Однако пока в большинстве случаев не представляется возможным правильно предсказать индивидуальную чувствительность опухоли во второй и последующих линиях лекарственного лечения.

Многочисленные исследования показывают, что опухоли экспериментальных животных, перевиваемые и спонтанные, варьируют по всем изучаемым показателям: скорости роста, пролиферативной активности, степени оксигенации, системе кровоснабжения, присутствия клеток иммунной системы, молекулярно-генетическим признакам, с учетом гистогенетических признаков, локализации и др. В связи с вышеизложенным важным становится изучение реакции метастатических сарком мягких тканей человека на химиотерапевтические агенты во второй и последующих линиях лекарственного лечения.

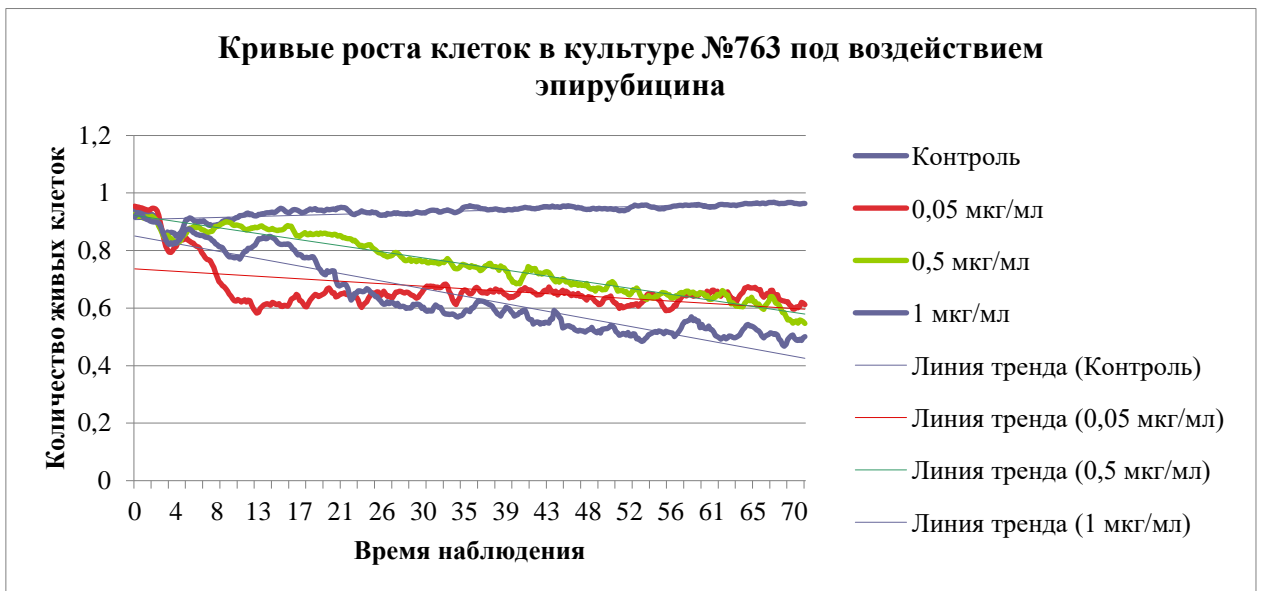
Установлено, что для различных типов метастатических сарком мягких тканей требуется применение разных способов лекарственного лечения: в одних случаях это химиотерапия, в других - таргетная терапия, в третьих - опухолеспецифическая вакциноterapia, в четвертых - сложные комбинированные схемы лечения. Однако и такой дифференцированный подход не решает проблему, так как реакция различных метастатических сарком мягких тканей также весьма вариабельна в зависимости от предшествующего лекарственного лечения. Более того, среди близких по всем этим признакам различные типы сарком мягких тканей не все в одинаковой степени чувствительны к химиотерапевтическому лечению.

В связи с этим представляется чрезвычайно важным и актуальным разработать способы и методы, позволяющие прогнозировать эффективность химиотерапии, индивидуальную чувствительность метастатических сарком мягких тканей к наиболее часто используемым препаратам химиотерапии - доксорубицину или эпицирубицину и ифосфамиду.

### 3.1.1. Результаты и обсуждение

В работе изучали пролиферативную активность клеточных культур сарком мягких тканей №507 и №763 (синовиальная саркома), №678 и №933 (миксофибросаркома), №749 (лейомиосаркома). Опухолевые клетки были получены из образцов операционного материала пациентов, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с 2011 по 2017 гг. Воздействовали на клеточные линии сарком мягких тканей цитостатиками: эпирубицин или ифосфамид. Каждый препарат использовался в 3-х концентрациях, составляющих 10, 100 и 200% от пика концентрации в плазме крови. Наблюдение за пролиферативной активностью опухолевых клеток проводили с помощью автоматического клеточного анализатора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) методом фазового контраста в течение 72 часов.

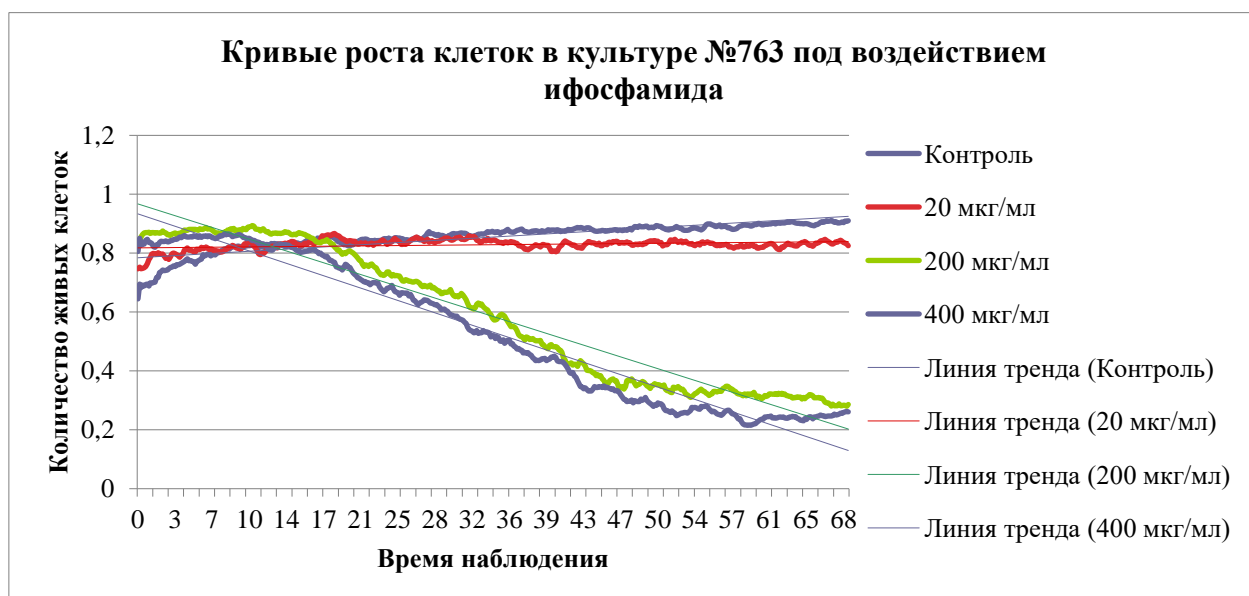
Проведен анализ индивидуальной чувствительности клеточных культур к эпирубицину (доксорубицину) и ифосфамиду, составляющих основу режимов химиотерапии у этой категории больных. Было установлено, что опухолевые клетки метастатической СМТ в фазе экспоненциального роста обладают различным потенциалом пролиферативной активности, который целесообразно учитывать при оценке гетерогенности клеточных популяций, характеристике их метаболизма, определения спектра чувствительности к химиотерапевтическим агентам *in vitro*. На рис. 7-16 представлена графическая интерпретация полученных данных.



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,212	0,07	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	0,005	0,003	0,002	0,005	0,003	0,007
Контроль -			0,003	0,001	0,005	0,01	0,016	0,049	0,074	0,065	0,056	0,123	0,084

Малая													
Контроль -													
Средняя			0,557	0,239	0,436	0,218	0,131	0,074	0,085	0,092	0,057	0,031	0,012
Контроль -													
Большая			0,096	0,043	0,012	0,001	0,003	0,003	0,001	0,001	0,003	0,002	0,012
Малая -													
Средняя			0,001	0,036	0,028	0,163	0,342	0,748	0,831	0,669	0,873	0,487	0,471
Малая -													
Большая			0,182	0,202	0,631	0,423	0,454	0,314	0,161	0,145	0,314	0,131	0,428
Средняя -													
Большая			0,196	0,31	0,072	0,032	0,131	0,223	0,131	0,092	0,299	0,372	0,831

Рисунок 7. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации эпирубина: А – культура синовиальной саркомы №763



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,025	0,071	0,204	0,406	0,02	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,002
Контроль - Малая	0,392				0,957	0,957	0,708	0,487	0,364	0,630	0,487	0,557	0,487
Контроль - Средняя	0,023				0,131	0,028	0,024	0,015	0,021	0,018	0,037	0,032	0,015
Контроль - Большая	0,111				0,036	0,01	0,008	0,005	0,001	0,008	0,001	0,003	0,005
Малая - Средняя	0,155				0,131	0,028	0,049	0,072	0,146	0,049	0,146	0,104	0,719
Малая - Большая	0,403				0,036	0,010	0,014	0,015	0,016	0,018	0,008	0,010	0,015

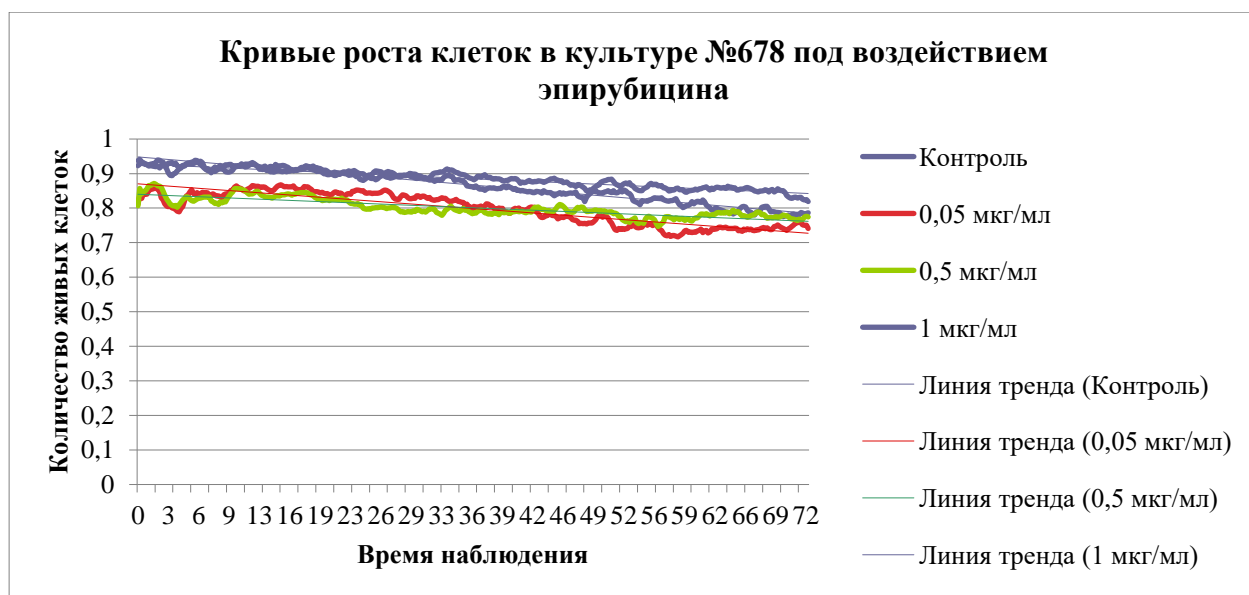
Средняя -													
Большая	0,423				0,507	0,668	0,585	0,487	0,314	0,630	0,218	0,314	0,487

Рисунок 8. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации ифосфамида: А – культура синовиальной саркомы №763.

Результаты наблюдений показывают, что высокая скорость изменений пролиферативной активности синовиальной саркомы №763 (рис. 7) свидетельствует о наличии быстрой динамики увеличения числа клеток за время экспоненциального роста. В присутствии эпирубина (0,05 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1,0 мкг/мл) статистически достоверные различия между группами выявлены при всех концентрациях в период от 12 ч. до 72 ч. наблюдения. Под воздействием данного препарата погибают около 40% опухолевых клеток. Статистически значимое различие между контролем и малой концентрацией сохраняется от 12 до 42 часов включительно. Между большой концентрацией и контролем оно наблюдается почти на весь период наблюдения от 18 до 72 часов наблюдения.

Исследование чувствительности клеток синовиальной саркомы №763 (рис. 8) к ифосфамиду показали статистически достоверные различия между группами в начале наблюдения и стабильно после 24 часов и до 72 включительно. Под воздействием средних и высоких доз ифосфамида погибают более 70% опухолевых клеток.

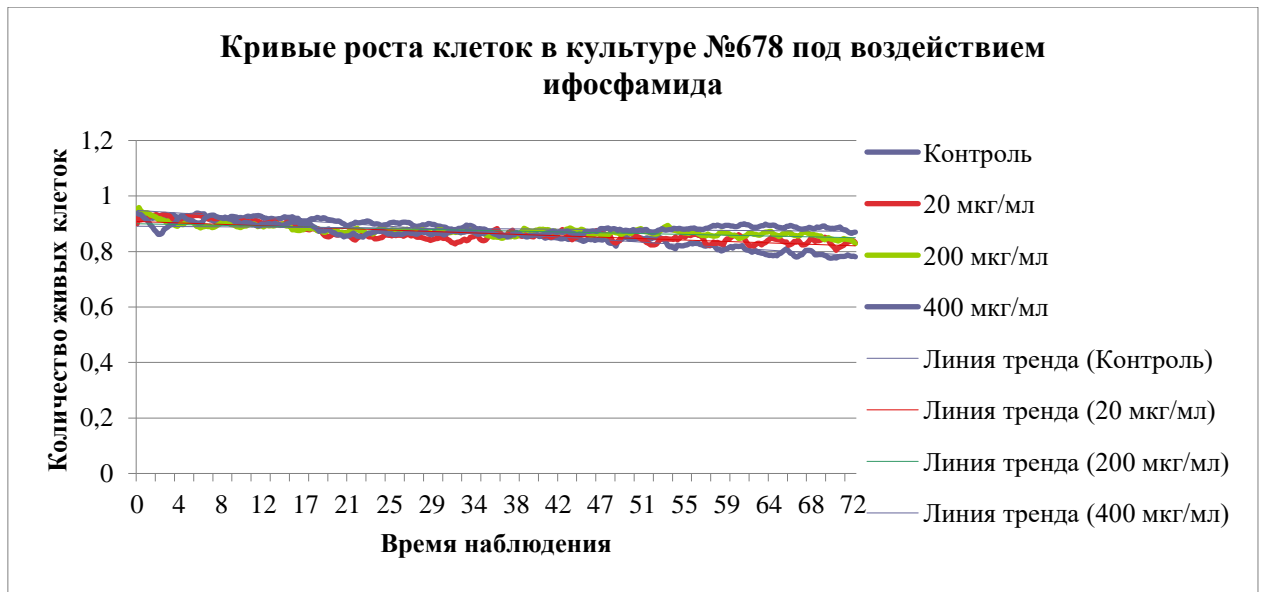
Полученная картина *in vitro* отражена и в клинической картине заболевания. У пациентки после 6 циклов 1-ой линии ХТ по схеме А1 зарегистрирован частичный регресс, который сохранялся 3 месяца. Далее пациентка получала иммунотерапию ДК-вакциной, без эффекта. 2-я линия ХТ был проведен по схеме СуVADIC где также входят доксорубин и циклофосфамид (из группы ифосфамида алкилирующий агент) и была достигнута стабилизация. Таким образом, метастатическая СМТ пациентки М., 49 лет остается чувствительной к антрациклинам и алкилирующим агентам (ифосфамид и циклофосфамид).



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,012	0,037	0,07	0,037	0,007	0,029	0,007	0,023	0,017	0,009	0,03	0,12	0,13
Контроль - Малая	0,042	0,074		0,096	0,065	0,269	0,146	0,085	0,036	0,057	0,16		
Контроль - Средняя	0,042	0,074		0,096	0,007	0,038	0,084	0,223	0,117	0,247	0,63		
Контроль - Большая	0,712	0,757		0,789	0,364	0,708	0,372	0,593	0,545	0,423	0,37		
Малая - Средняя	0,831	0,957		0,789	0,314	0,314	0,708	0,545	0,915	0,423	0,22		
Малая - Большая	0,065	0,117		0,131	0,314	0,314	0,023	0,038	0,036	0,012	0,02		
Средняя - Большая	0,081	0,117		0,096	0,056	0,056	0,014	0,096	0,117	0,057	0,22		

Рисунок 9. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации эпирубицина: Б – культура миксофибросаркомы №678



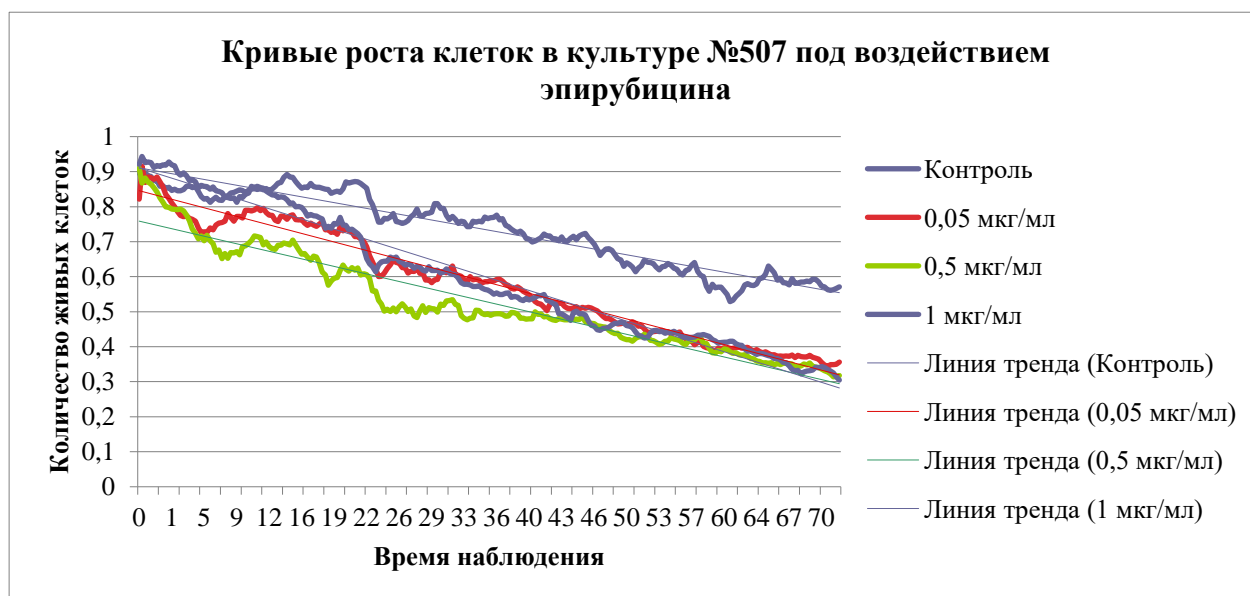


Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,089	0,028	0,037	0,043	0,142	0,254	0,989	0,315	0,478	0,242	0,013	0,05	0,006
Контроль - Малая		0,557	0,269	0,056							0,708		0,131
Контроль - Средняя		0,045	0,048	0,065							0,074		0,098
Контроль - Большая		0,096	0,048	0,056							0,033		0,003
Малая - Средняя		0,096	0,436	0,915							0,131		0,708
Малая - Большая		0,247	0,392	0,915							0,048		0,131
Средняя - Большая		0,557	0,831	0,915							0,585		0,218

Рисунок 10. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации ифосфамида: Б – культура миксофибросаркомы №678

Культура миксофибросаркомы №678 пациента П., 67 лет, представленная на графическом изображении (рис. 9 и 10), свидетельствует о низком пролиферативном потенциале и демонстрирует медленную динамику увеличения численности опухолевых клеток. По нашим наблюдениям статистически значимые различия между группами под воздействием ифосфамида выявлялась на 6,12, 18, 60 и 72 часы наблюдения. Значимых различий между контролем и малой концентрацией не найдено, лишь в средних и больших концентрациях и то не на весь период времени. На рис. 9 мы видим статистические значимые различия под воздействием эпирубицина с 0 по 60 час. Если внимательно посмотреть на график видно, что цитотоксическая активность данного препарата с трудом достигает 20%.

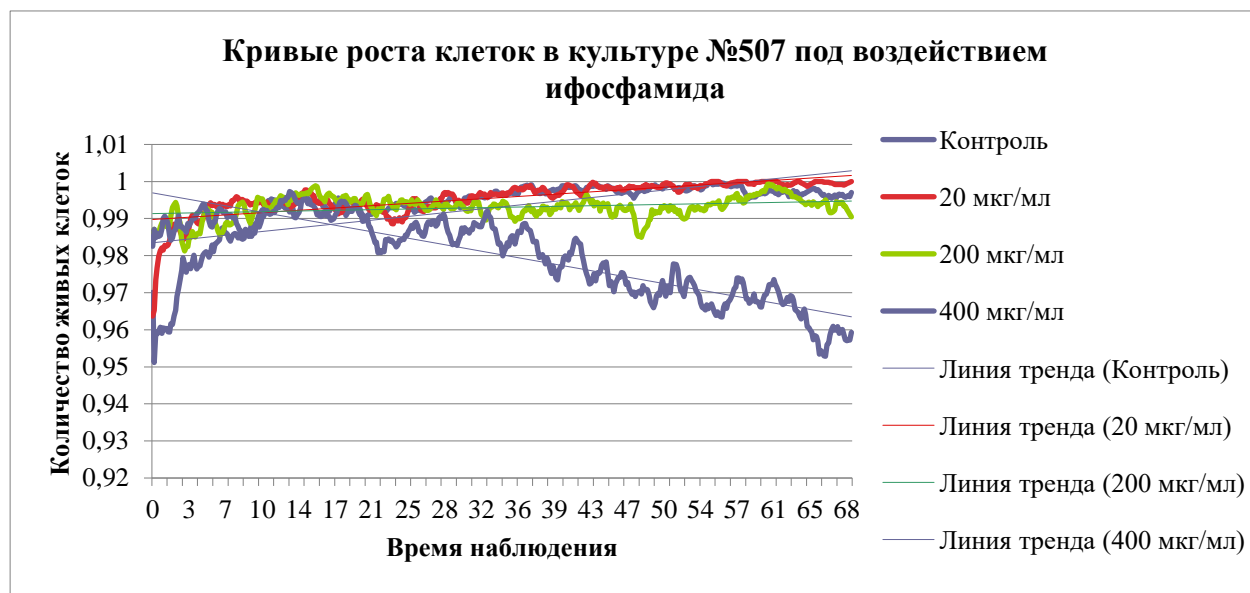
Полученные данные может свидетельствовать о низкой эффективности стандартной химиотерапии для данного больного с миксофибросаркомой. Рассматривая клиническую картину пациент болел с 2008 года по 2017 годы. Больной отказывался от химиотерапии, была проведена лучевая терапия, неоднократно производилось хирургическое лечение местного рецидива верхней левой конечности, в том числе с изолированной регионарной химиоперфузией; иммунотерапия аутологичными костно-мозговыми дендритными клетками с фотодинамической терапией и иммунотерапия аутологичными дендритными клетками нагруженными раково-тестикулярными антигенами. Указанное лечение пациент получал с декабря 2011 г. по июнь 2014 г. Пациент в конце лечения все-таки получил 4 цикла ХТ по схеме ADIC (доксорубцин+дакарбазин), достигнута стабилизация с продолженным эффектом 2 месяца. После больному провели радиальное хирургическое лечение-эгзартикуляция верхней конечности и зарегистрирован безрецидивный период 28 мес, далее пациент умер от диссеминации опухолевого процесса.



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,196	0,004	0,016	0,003	0,009	0,003	0,006	0,008	0,012	0,013	0,046	0,011	0,008
Контроль - Малая		0,037	0,239	0,049	0,037	0,049	0,109	0,043	0,028	0,021	0,048	0,043	0,074
Контроль - Средняя		0,014	0,019	0,002	0,008	0,002	0,01	0,007	0,023	0,021	0,048	0,016	0,049
Контроль - Большая		0,957	0,957	0,096	0,037	0,096	0,01	0,042	0,023	0,021	0,123	0,016	0,006
Малая - Средняя		0,668	0,239	0,263	0,545	0,263	0,328	0,504	0,831	0,898	0,957	0,757	0,748

Малая -													
Большая		0,037	0,239	0,669	0,915	0,669	0,372	0,873	0,831	1	0,712	0,757	0,328
Средняя -													
Большая		0,014	0,019	0,146	0,545	0,146	0,831	0,507	0,831	0,898	0,712	0,873	0,436

Рисунок 11. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации эпирубицина: В – культура синовиальной саркомы №507

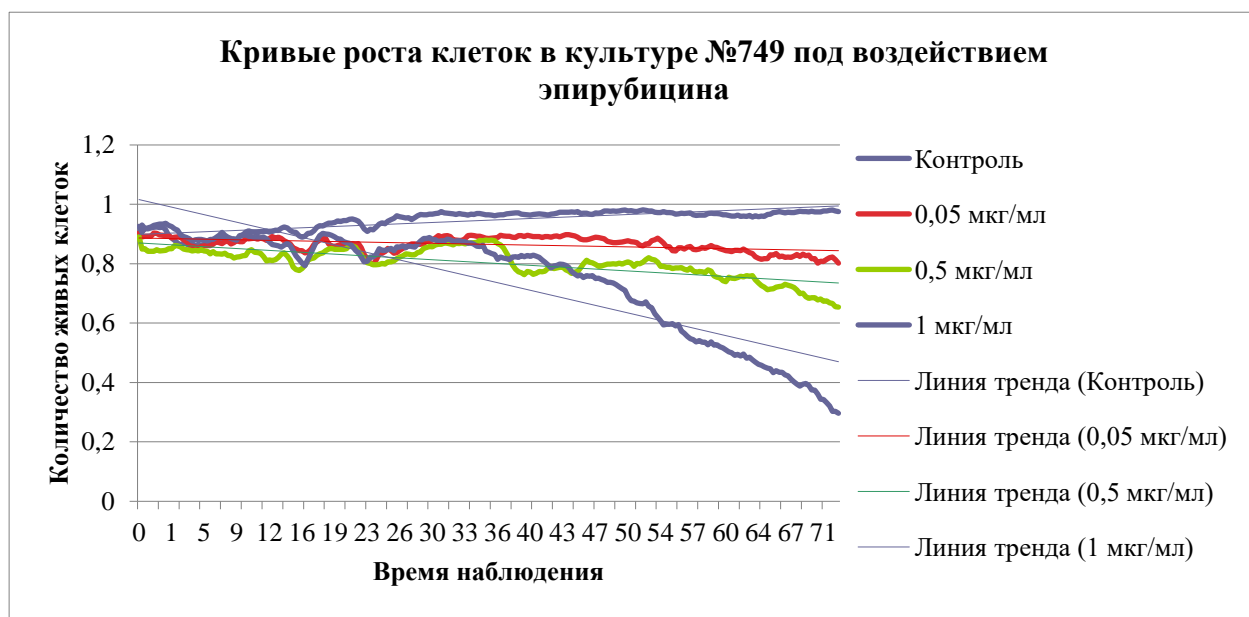


Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,554	0,257	0,784	0,673	0,301	0,853	0,395	0,299	0,08	0,024	0,046	0,015	0,043
Контроль - Малая										0,607	0,246	0,164	0,349
Контроль - Средняя										0,607	0,689	0,89	0,568
Контроль - Большая										0,060	0,304	0,172	0,207
Малая - Средняя										0,418	0,304	0,164	0,207
Малая - Большая										0,023	0,031	0,007	0,031
Средняя - Большая										0,139	0,246	0,164	0,349

Рисунок 12. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации ифосфамида: В – культура синовиальной саркомы №507.

В культуре синовиальной саркомы №507 на графическом изображении рис. 11 наблюдается средний интервал времени экспотенциального роста, соответственно, обнаружена умеренная динамика увеличения численности клеток пациентки К., 25 л., у которой было

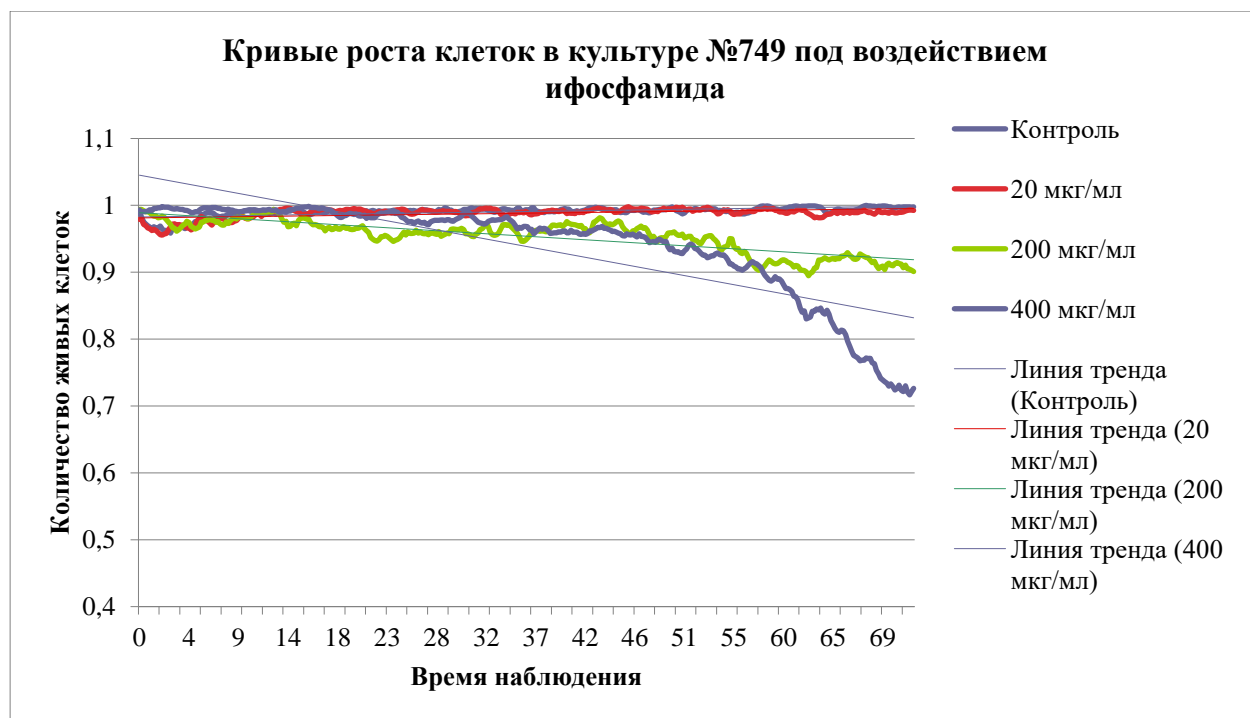
проведено лечение по схеме А1 с максимальным эффектом стабилизация опухолевого процесса с тенденцией к увеличению. Анализ чувствительности метастатической СМТ к эпирубицину и ифосфамиду (рис. 11 и 12) выявил статистически значимые различия в присутствии изучаемых концентраций эпирубицина с 6 по 72 час наблюдения. Максимальный цитотоксический эффект не достигал 20%. Что касается ифосфамида, значимый противоопухолевый эффект наблюдался только при очень высоких концентрациях прерата. Статистически значимые различия тоже выявлены в группе высокой концентрации по сравнению с контролем. Пациентка получала ДК-вакцину «CaTeVac» в течении 1 года и наблюдалась стабилизация процесса при метастатическом поражении легких и местного рецидива. Больную после очередного прогрессирования перевели на монокимиотерапию ифосфамидом, без значимого клинического эффекта. Далее пациентка получала антиангиогенное лечение ингибитором рецепторов тирозинкиназ Вотриент в течении 2 месяца и скончалась от прогрессирования заболевания.



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	1	0,44	0,13	0,007	0,012	0,021	0,012	0,003	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
Контроль - Малая				0,065	0,016	0,074	0,096	0,131	0,117	0,131	0,117	0,137	0,218
Контроль - Средняя				0,005	0,016	0,023	0,096	0,016	0,031	0,050	0,057	0,032	0,024
Контроль - Большая				0,202	0,032	0,048	0,007	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Малая - Средняя				0,342	0,957	0,634	0,873	0,372	0,423	0,521	0,593	0,423	0,240

Малая -													
Большая				0,423	0,850	0,748	0,300	0,131	0,109	0,050	0,057	0,032	0,024
Средняя -													
Большая				0,123	0,850	0,748	0,314	0,487	0,314	0,131	0,117	0,131	0,218

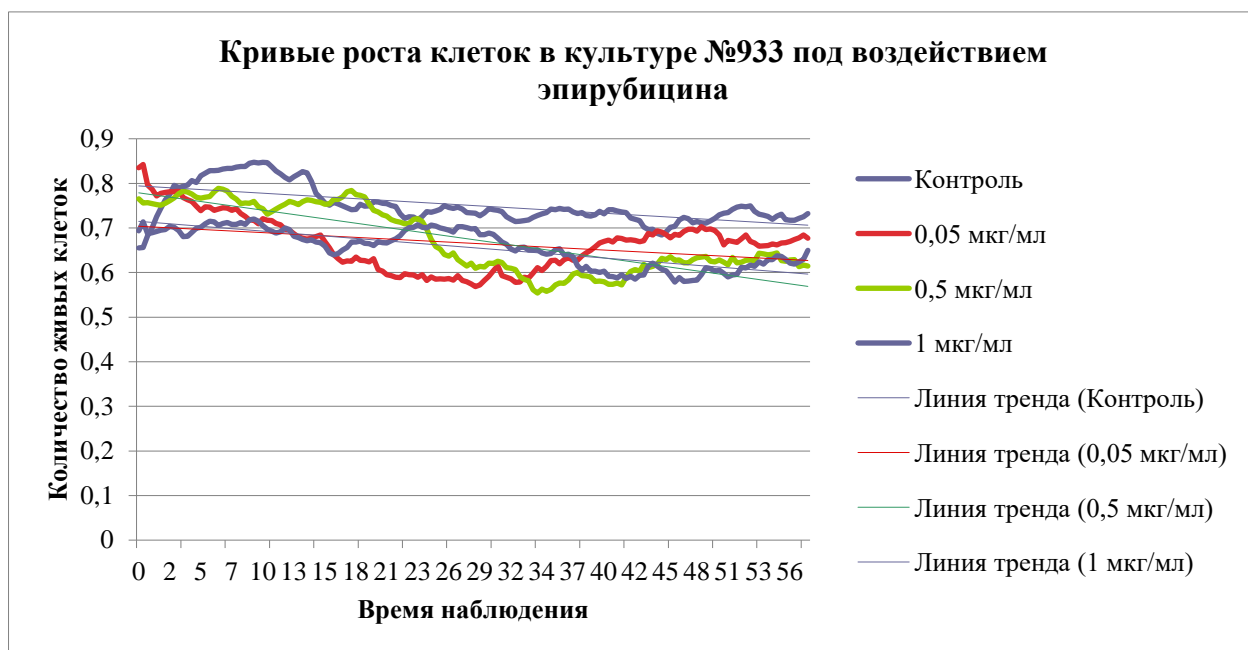
Рисунок 13. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации эпирубицина: Г – культура лейомиосаркомы №749.



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,45	0,04	0,78	0,69	0,29	0,31	0,35	0,15	0,014	0,025	0,003	0,001	0,001
Контроль - Малая									0,957	0,789	1	0,278	0,306
Контроль - Средняя									0,117	0,13	0,024	0,015	0,023
Контроль - Большая									0,021	0,057	0,013	0,001	0,001
Малая - Средняя									0,117	0,172	0,024	0,165	0,197
Малая - Большая									0,021	0,06	0,013	0,015	0,013
Средняя - Большая									0,31	0,545	0,801	0,279	0,214

Рисунок 14. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации ифосфамида: Г – культура лейомиосаркомы №749.

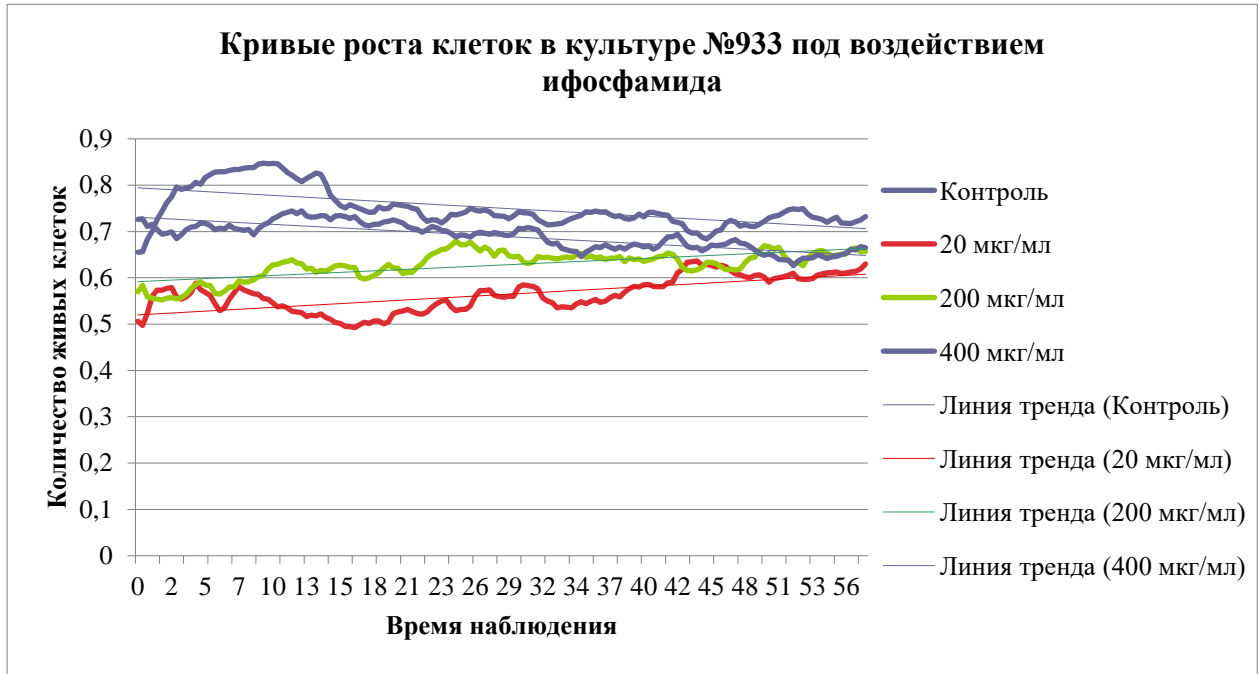
Культура лейомиосаркомы №749 на графическом изображении (рис. 13 и 14) демонстрирует высокую пролиферативную активность в контроле и под воздействием маленьких концентрации цитостатиков. Тенденция к токсическому воздействию на рост опухолевых клеточных культур наблюдается при средних и больше больших концентрациях химиопрепаратов. Статистически значимые различия видны от 18 до 72 часов наблюдения в группе эпирубина и с 48 часов до 72 часа включительно в группе ифосфамида. Малая концентрация, которая считается терапевтической не оказалась эффективной в данной ситуации. Если рассматривать клиническое течение заболевания, больной И. 55 л., в мае 2013 удалили внеоргannую опухоль забрюшинного пространства, уже через месяц пациентке диагностирует рецидив заболевания с метастатическим поражением легких. Далее больной проводится системное лечение по схеме доксорубин+циклофосфамид 4 цикла, максимальный эффект стабилизация опухолевого роста. В связи с чем пациентке предложено хирургическое лечение в объеме нормотермической химиоперфузии легких. В феврале 2014 года обнаружен мягкотканый метастаз в правом плече. Учитывая низкую чувствительность к проведенной ХТ пациентке провели хирургическое лечение данного метастаза. В марте зафиксировано прогрессирование в легких, в связи с чем проведена 2-я линия ХТ по схеме GemTax с 05.2014 по 01.2015 г. В январе очередное прогрессирование заболевания. Безуспешная терапия интерфероном альфа и диссеминация процесса в июне 2015 г.



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,122	0,134	0,062	0,051	0,067	0,356	0,065	0,093	0,075	0,115	0,423	0,385	0,402

Рисунок 15. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации эпирубина: Д – культура миксофибросаркомы №933.

На рис. 15 мы видим, что нет никаких различий между разными группами под воздействием эпирубина. Данная культура миксофибросаркомы не показала никакой чувствительности к данному препарату.



Время	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Краскел-Уоллис	0,17	0,009	0,017	0,004	0,009	0,05	0,027	0,027	0,02	0,13	0,61	0,30	0,23
Контроль - Малая		0,014	0,023	0,004	0,018	0,05	0,018	0,023	0,011				
Контроль - Средняя		0,028	0,028	0,043	0,112	0,401	0,237	0,352	0,178				
Контроль - Большая		0,282	0,205	0,265	0,941	0,941	0,401	0,603	0,248				
Малая - Средняя		0,656	0,766	0,265	0,401	0,317	0,237	0,175	0,178				
Малая - Большая		0,127	0,31	0,043	0,018	0,05	0,135	0,078	0,178				
Средняя - Большая		0,237	0,401	0,265	0,112	0,401	0,656	0,603	0,766				

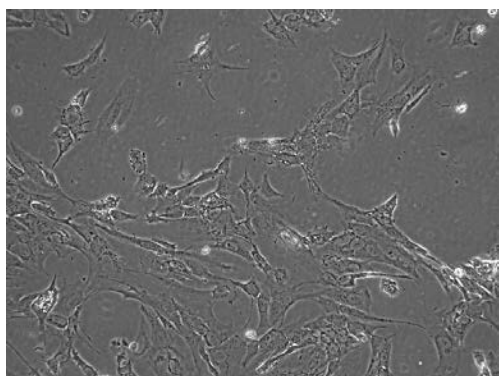
Рисунок 16. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культурах СМТ от концентрации ифосфамида: Д – культура миксофибросаркомы №933

Что касается ифосфамида наблюдается статистическое значимое различие от 6 до 48 часов наблюдения. Если присмотреться к графику наблюдается некий артефакт, вместо доза-

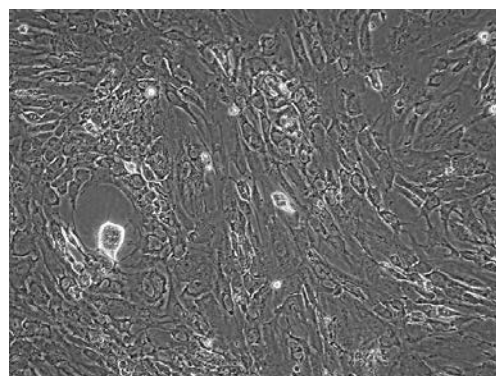
зависимой токсичности вывляется самый лучший эффект под воздействием низких дозах. Если сравнивать полученные данные *in vitro* с реальной картиной *in vivo* у больного после проведения 2-х циклов ХТ отмечалась разнонаправленная динамика, один очаг в легком пропал, 2-й остался предних размеоров и появился новый. Пациенту провели полную циторедуктивную операцию на легком, после чего получает ДК-вакцину «СаТеVac» в адьювантном режиме. Выразенной опухоли лечебного патоморфоза не выявлено. Пациент в данный момент находится на лечение без прогрессирования 5+ мес.

Следовательно, количественные изменения клеточных популяций целесообразно использовать для характеристики быстрой, умеренной и медленной динамики пролиферативной активности опухолевых клеток, находящихся в фазе экспоненциального роста, определения чувствительности к химиотерапевтическим агентам и прогноза заболевания.

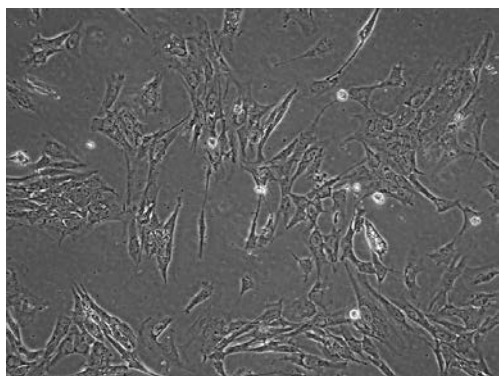
На рис. 17 и 18 представлена демонстрация процессов гибели культур СМТ под воздействием указанных концентраций эпирубицина и ифосфамида.



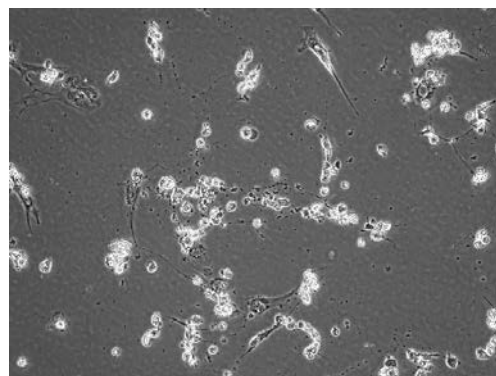
А



Б

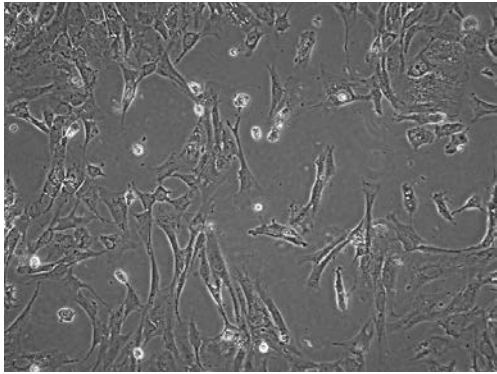


В

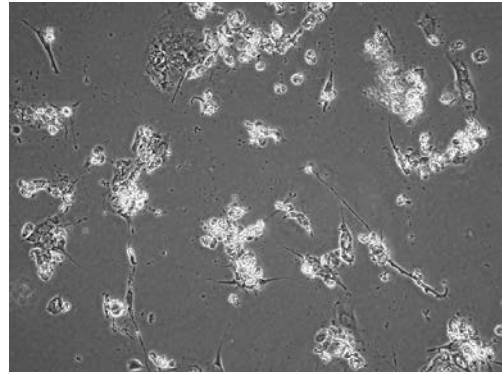


Г

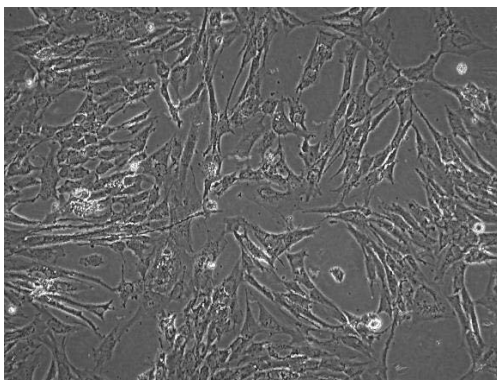




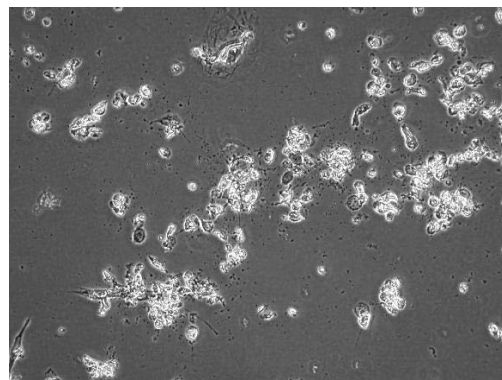
Д



Е

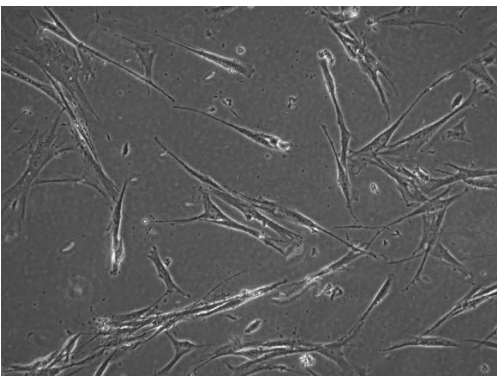


Ж

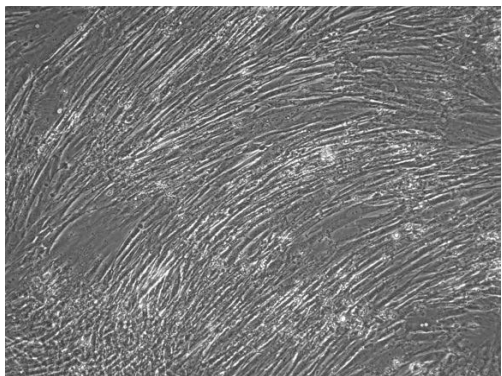


З

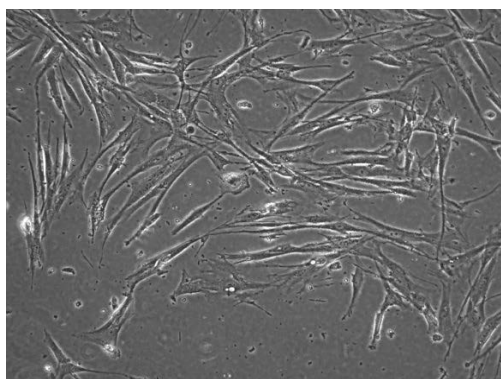
Рисунок 17. Морфология культуры синовиальной саркомы №763 под воздействием различных доз доксорубина. А, Б – контрольный образец; В, Г – 0,5 мкг/мл; Д, Е – 5 мкг/мл; Ж, З – 10 мкг/мл; время наблюдения 0 и 72 часа.



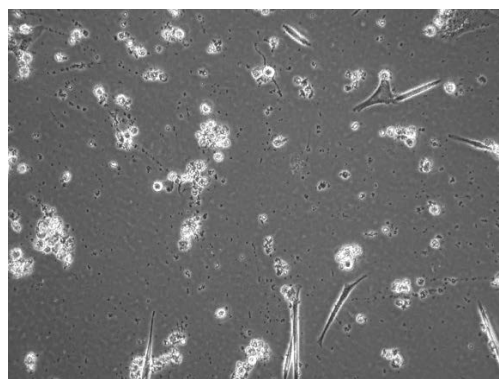
А



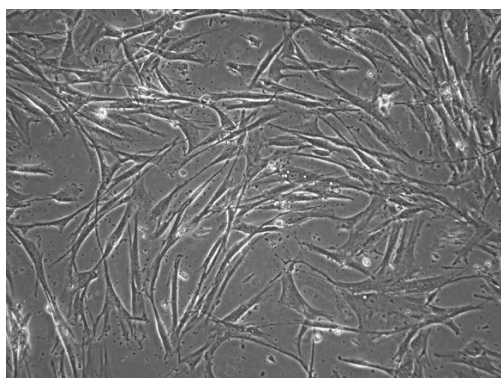
Б



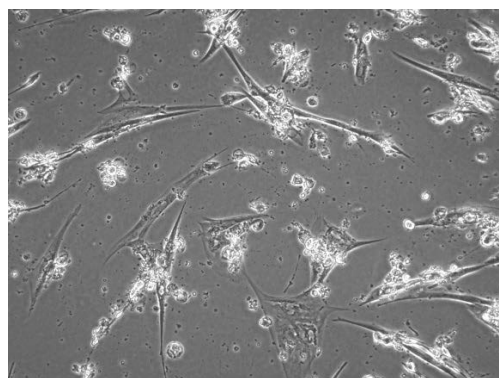
В



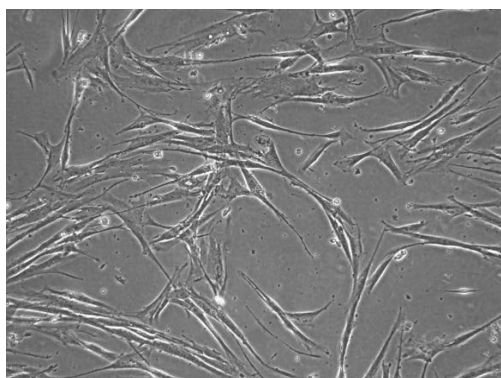
Г



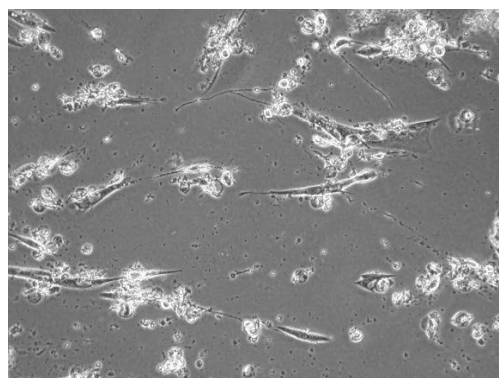
Д



Е



Ж



З

Рисунок 18. Морфология культуры №507 под воздействием различных доз доксорубицина. А, Б – контрольный образец; В, Г – 0,5 мкг/мл; Д, Е – 5 мкг/мл; Ж, З – 10 мкг/мл; время наблюдения 0 и 72 часа.

Обычно химиотерапия метастатических СМТ проводится с использованием максимально переносимых доз цитостатиков и направлена на быстро делящиеся опухолевые клетки, но цитотоксическому эффекту подвергаются нормальные клетки организма (костный мозг, желудочно-кишечный тракт, клетки иммунной системы.). В связи с этим лечение проводится циклами с периодами для восстановления здоровых органов и тканей. Однако

опухоль в этот период также может возобновить рост, но уже генетически измененных опухолевых клеток, резистентных к использованным цитостатикам [8, 17, 211].

Решением этой проблемы может стать индивидуализация подбора стандартных или экспериментальных схем лечения химиотерапевтических агентов на этапе продолженного роста опухоли, с учетом анализа индивидуальной чувствительности к цитостатикам на приборе Cell-IQ.

Для изучения пролиферативной активности опухолевых клеток *in vitro* могут быть использованы экспоненциальные зависимости, корректно описывающие количественные изменения численности клеток от времени. Это не вызывает противоречий с методологическими и аналитическими подходами, применяемыми в изучении кинетического роста популяций живых биологических объектов при отсутствии лимитирующих факторов [25, 81, 153]. Однако в случае влияния таких факторов на пролиферативную активность опухолевых клеток, полученные результаты экспоненциального роста клеток потребуют дополнительной детализации. Например, воздействие на клетки какого-либо лекарственного препарата приведет к поиску соответствующих констант как для детерминированных, так и вероятностно-статистических моделей, описывающих снижение их пролиферативного потенциала. В дальнейшем это позволит корректно подойти к оценке корреляционной связи чувствительности опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам в условиях *in vitro* и *in vivo*, что представляется актуальным для построения системы подбора химиопрепаратов для персонализированной терапии онкологических больных.

### **3.1.2. Заключение**

Таким образом, в результате исследования можно сделать следующие выводы:

1. Изучение пролиферативной активности опухолевых клеток на основе технологии продолжительной фазово-контрастной микроскопии Cell-IQ в режиме реального времени повышает информационную объективность анализа их пролиферативного потенциала.
2. Полученные данные статистического анализа позволяют достоверно оценить количественные изменения пролиферативной активности опухолевых клеток в период экспоненциального роста и при динамическом наблюдении за этими изменениями в присутствии различных концентраций эпирубина и ифосфамида.

### **3.1.3. Практические рекомендации**

Разработанный метод прогнозирования реакции метастатических СМТ на химиотерапевтические агенты в аналитической системе долговременной микроскопии Cell-IQ может быть внедрен в повседневную клиническую практику с целью оптимизации

лекарственного лечения пациентов, резистентных к стандартным методам лечения. Кроме того, предлагаемый метод может быть предиктором индивидуальной чувствительности СМТ к химиотерапевтическим агентам уже в начале лекарственного лечения, в том числе важным фактором в фармакоэкономической целесообразности адъювантного лекарственного лечения больных СМТ.

### **3.2 МОДЕЛИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ *IN VITRO* ПУТЕМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, МОНОНУКЛЕАРОВ И РАЗЛИЧНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ И КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ xCELLigence® RTCA DP**

Моделирование опухоли *in vitro* – это современный персонализированный подход для изучения пролиферативного потенциала опухолевых клеток и прогнозирования чувствительности злокачественного новообразования к химиотерапии. Однако в связи с доказанной ролью иммунной системы в развитии опухоли существует необходимость разработки моделей, включающих как злокачественные, так и иммунокомпетентные клетки. Такой подход позволяет изучать взаимодействие опухоли и иммунной системы, наблюдать противоопухолевый иммунный ответ и иммуноредактирование опухоли, а также в контролируемых условиях *in vitro* исследовать влияние различных биологически активных молекул на эти процессы. Более того, моделирование иммунного микроокружения дает возможность оценить эффективность иммунотерапии, в частности, применения аутологичной противоопухолевой ДК-вакцины «CaTeVac» у больных СМТ. При этом создаваемые модели более полно отражают события, происходящие *in vivo*, так как основаны на использовании опухолевой культуры СМТ и клеток иммунной системы конкретного пациента, полученных непосредственно перед лечением. В то же время применение аналитической системы наблюдения за живыми клетками xCELLigence позволяет выявить достоверные различия пролиферативной активности опухолевых клеток и сделать вывод об эффективности противоопухолевого иммунного ответа, индуцированного ДК-вакциной «CaTeVac» собственного производства. Полученные данные могут стать основой для оптимизации иммунотерапии больных распространенными и метастатическими СМТ.

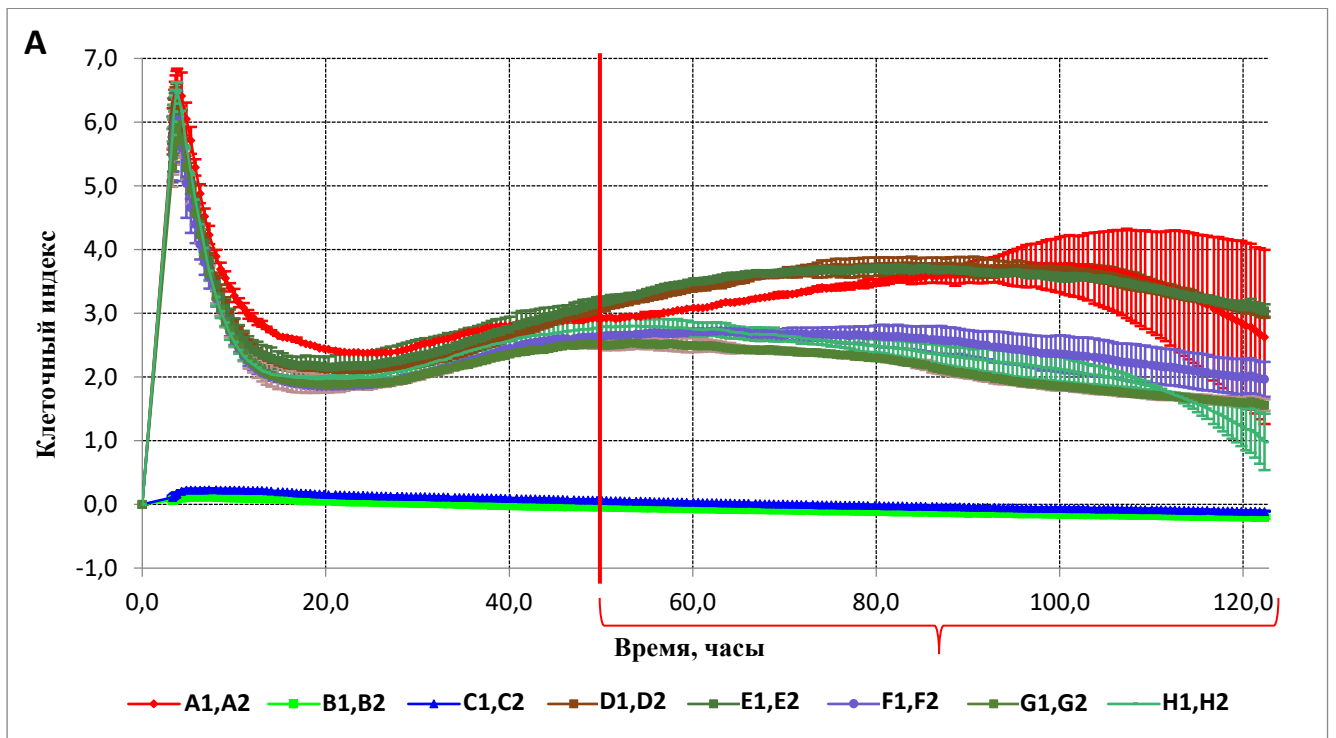
#### **3.2.1 Результаты**

На момент постановки эксперимента опухолевые клетки имели следующую жизнеспособность: СМТ №678 – 97%, №914 – 96%; №862 – 98%; №932 – 97%; №933–97%. Образцы дендритных клеток и мононуклеаров соответствующих пациентов были разморожены, отмыты от ДМСО и имели следующую жизнеспособность (табл. 10).

Таблица 10. Жизнеспособность размороженных ДК и МНК больных СМТ

Номер культуры СМТ/Морфология	Жизнеспособность, %	
	ДК	МНК
678/миксофибросаркома	85	87
914/синовиальная саркома	89	86
862/эмбриональная рабдомиосаркома	91	70
932/светлоклеточная саркома	89	45
933/миксофибросаркома	90	84

В клеточной культуре №678, пациента П. с диагнозом миксофибросаркомы начиная с 50 часов наблюдения были выявлены различия в значении клеточного индекса (рис. 19). В лунках D1, D2 и E1, E2, где опухолевые клетки находились в присутствии клеток иммунной системы (ДК и МНК) с GM-CSF или без него, пролиферативная активность клеток саркомы была выше, чем в интактном контроле (A1, A2). Данное явление также отражено на рис. 20, иллюстрирующем изменение скорости пролиферации опухолевых клеток.



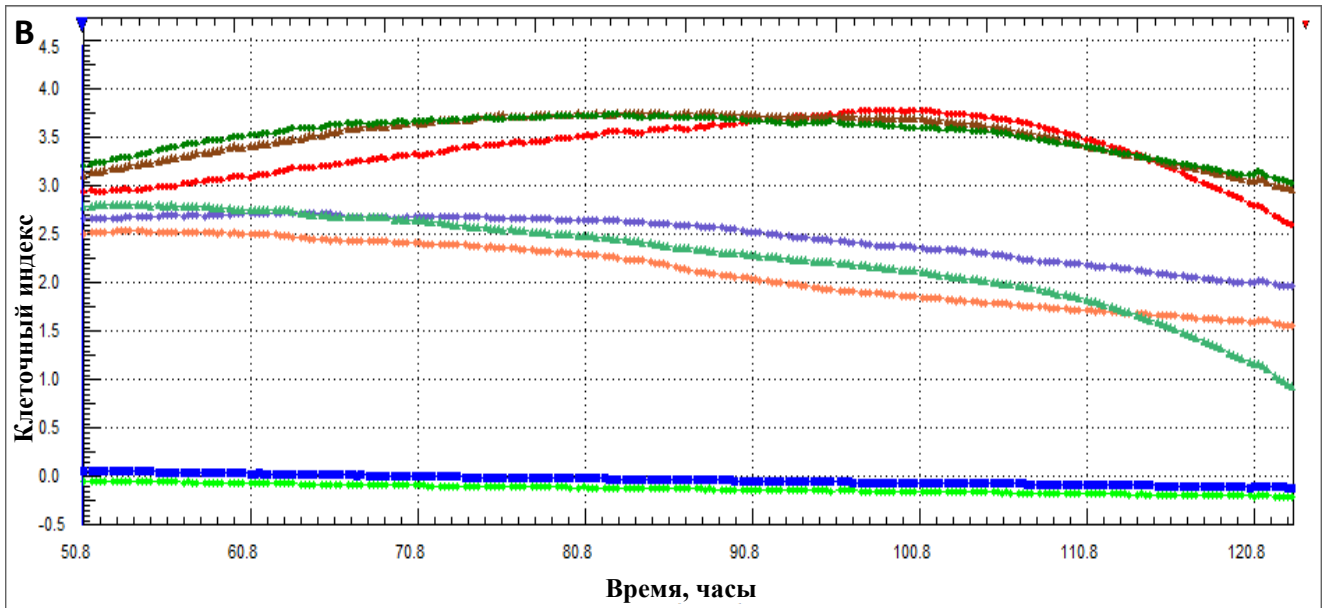


Рисунок 19. Графическое изображение динамики пролиферативной активности клеток культуры миксофибросаркомы №678 в присутствии аутологичных зрелых нагруженных РТА ДК и МНК и различных доз цитокинов GM-CSF и IL-2 в течение всего времени (А) и после 50 часов наблюдения (В). А1, А2 – опухолевые клетки (интактный контроль); В1, В2 – ДК (контроль); С1, С2 – МНК (контроль); D1, D2 – опухолевые клетки + ДК + МНК; E1, E2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF; F1, F2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF + IL-2 (125 МЕ/мл); G1, G2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (50 МЕ/мл); Н1, Н2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (1000 МЕ/мл).

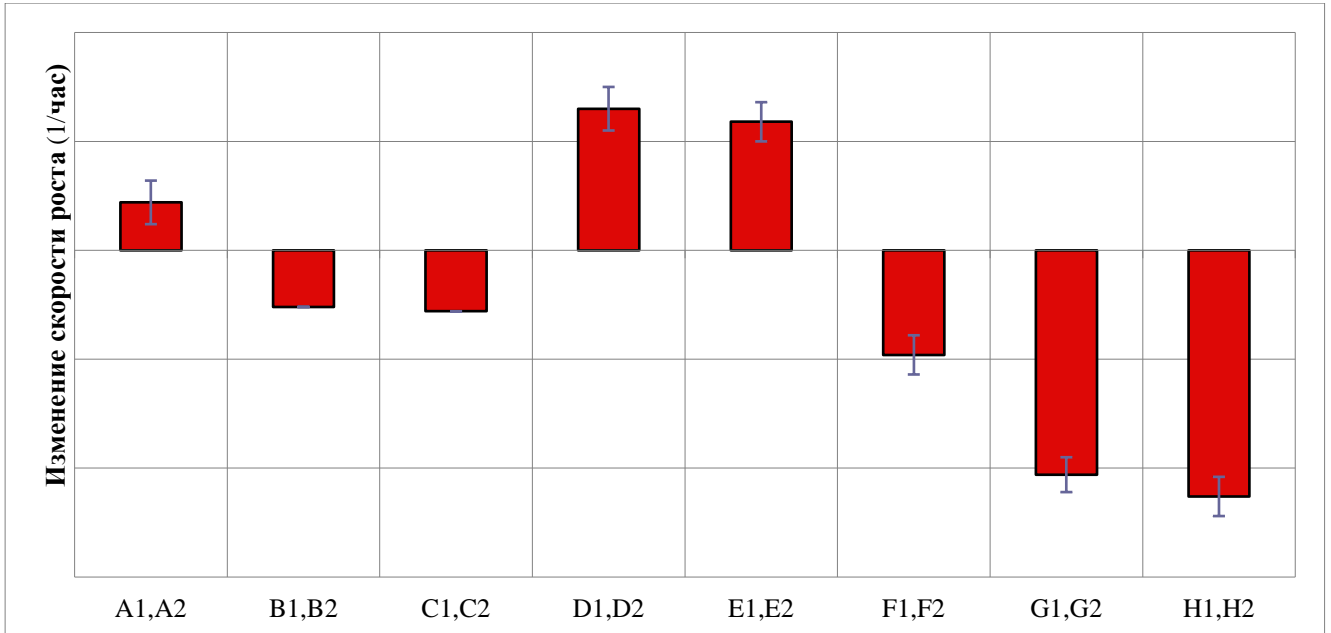


Рисунок 20. Изменение скорости роста культуры миксофибросаркомы (№678) под влиянием различных стимулов в течение всего времени наблюдения.

Наиболее выраженное снижение скорости пролиферации клеточной культуры СМТ наблюдалось в лунках F1, F2, G1, G2 и Н1, Н2, где в систему, моделирующую иммунное микроокружение опухоли, вносили IL-2 в разных концентрациях. Добавление GM-CSF (72

нг/мл) и IL-2 (125 МЕ/мл) оказывало ингибирующее влияние на пролиферацию опухолевых клеток в различные временные интервалы, однако более выраженный противоопухолевый эффект был достигнут при использовании одного IL-2 в высоких (1000 МЕ/мл) и низких (50 МЕ/мл) дозах (рис. 19 и 20).

Изучение изменения скорости пролиферации клеток под действием ДК и МНК в присутствии цитокинов выявило различия динамики роста опухолевой культуры в различные периоды наблюдения (рис. 21). Добавление комбинации GM-CSF и IL-2 привело к повышению скорости пролиферации клеток в первые 50 часов с дальнейшим подавлением роста культуры СМТ. Под действием IL-2 скорость пролиферации опухолевых клеток снижалась в течение всего эксперимента, однако максимальное снижение опухолевого роста наблюдалось после 76-го часа эксперимента.

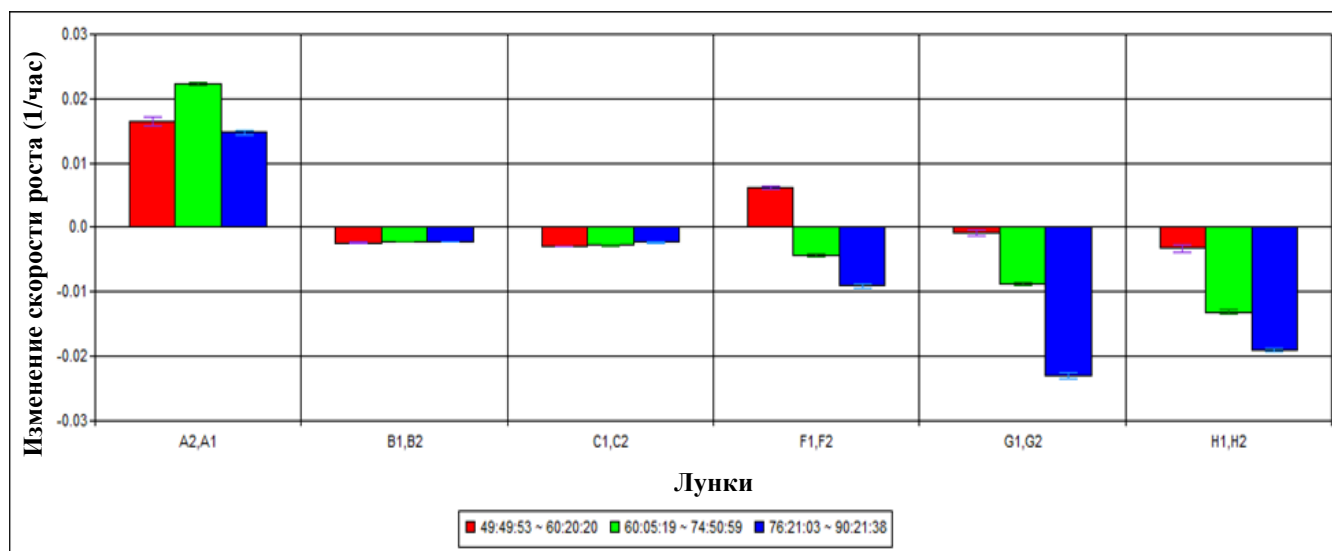


Рисунок 21. Динамика скорости роста культуры миксофибросаркомы №678 в различные временные интервалы наблюдения под влиянием различных стимулов.

Такая же тенденция и динамика роста отслеживалась в клеточной культуре №914, пациента А. с диагнозом синовиальной саркомы. Графики разошлись на 40 часу наблюдения и значительно отличались друг от друга с 80-го часа наблюдения (рис. 22).



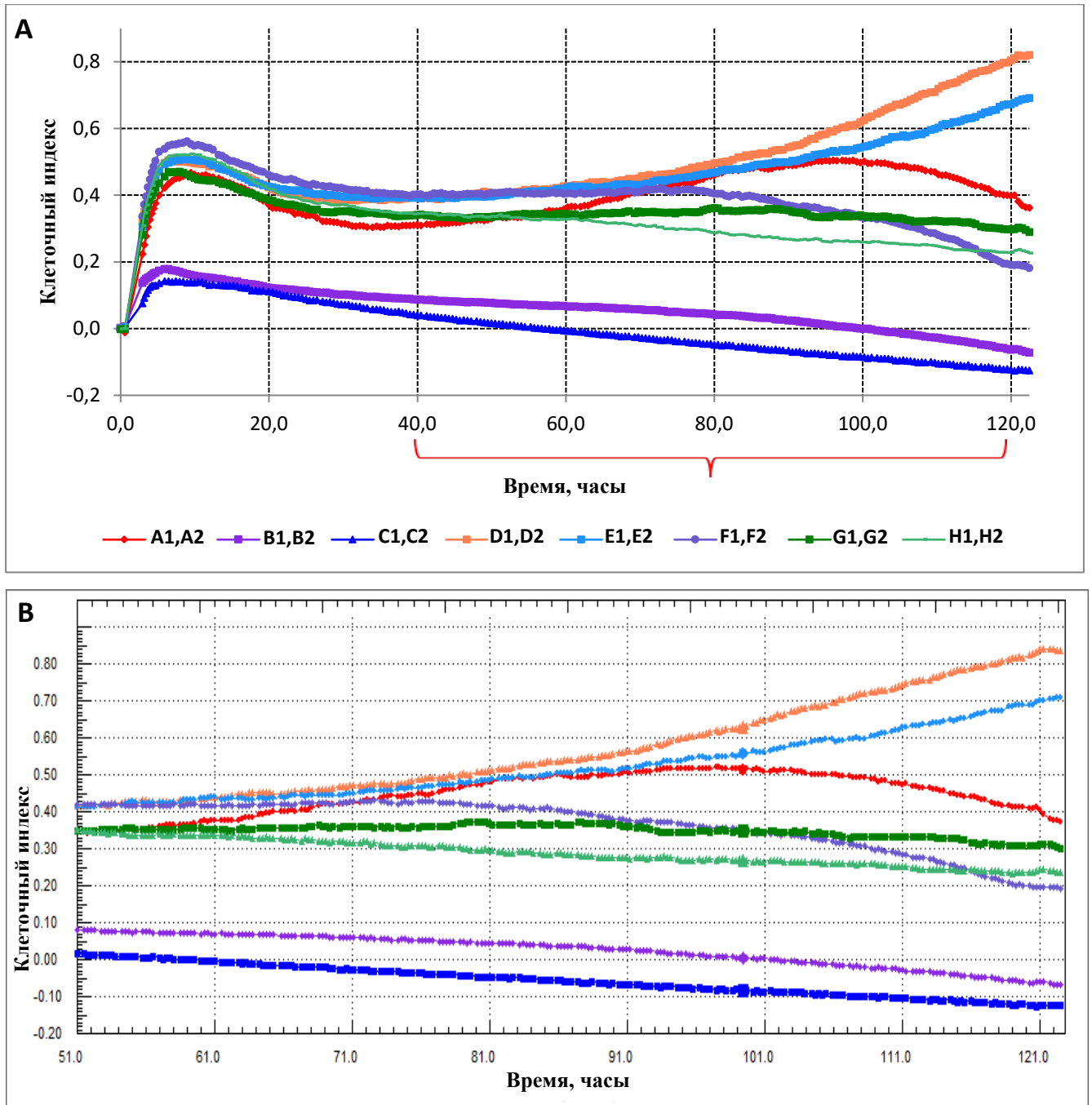
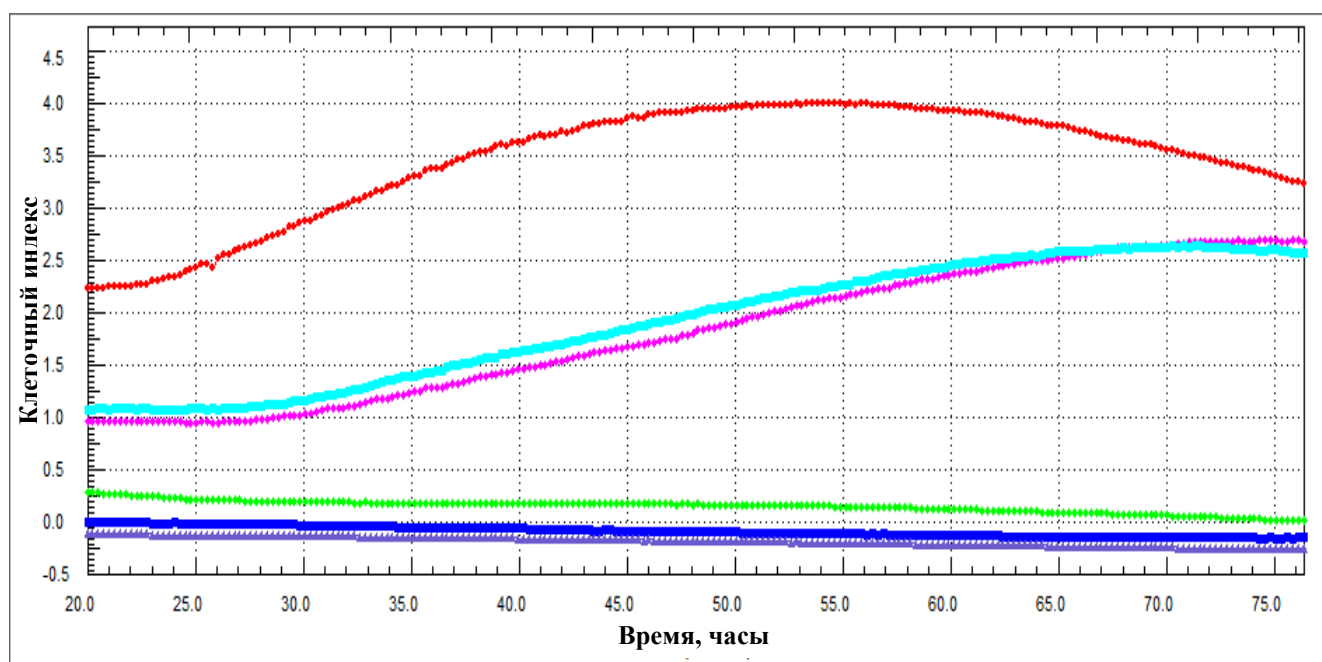


Рисунок 22. Графическое изображение динамики пролиферативной активности клеток культуры синовиальной саркомы №914 в присутствии аутологичных зрелых нагруженных РТА ДК и МНК и различных доз цитокинов GM-CSF и IL-2 в течение всего времени наблюдения (120 часов) (А) и после 50-го часа (В). А1, А2 – опухолевые клетки (интактный контроль); В1, В2 – ДК (контроль); С1, С2 – МНК (контроль); D1, D2 – опухолевые клетки + ДК + МНК; E1, E2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF; F1, F2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF + IL-2 (125 МЕ/мл); G1, G2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (50 МЕ/мл); H1, H2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (1000 МЕ/мл).

Необходимо отметить, что самая высокая пролиферативная активность клеточной культуры СМТ №914 наблюдалась в лунках E1, E2 и D1, D2 в присутствии иммунокомпетентных клеток с добавлением GM-CSF и без него. Под действием IL-2 во всех концентрациях скорость удвоения клеточного индекса опухолевых клеток снижалась по

сравнению контролем (A1, A2) в течение всего эксперимента и выходила на плато. У данного пациента зафиксирован продолжительный рост опухолевого процесса на фоне 3-х введений «CaTeVac». Возможно, добавление IL-2 в качестве иммунологического адьюванта улучшило бы результаты клинического эффекта *in vivo*.

Результаты экспериментального исследования в культуре СМТ №932 вместе с иммунокомпетентными клетками, цитокинами и вакциной «CaTeVac» продемонстрированы на рис. 23 и 24. Во всех лунках с негативным контролем (C1, C2 и D1, D2) клеточный индекс стремится к нулю и время удвоения клеточного индекса тоже. В лунках A1 и A2 клеточная культура СМТ без воздействия неуклонно растет, о чем свидетельствует увеличение клеточного индекса, и достигает своего пика с 45-го до 65-го часа наблюдения. Во всех вариантах (G1,G2 и F1,F2) моделирования иммунного ответа в опухолевом микроокружении светлоклеточной саркомы отмечается незначительное снижение клеточного индекса, которое отражено в графическом изображении рис. 23. Выраженный противоопухолевый эффект в культуре СМТ №932 наблюдается на высокой дозе IL-2 (H1,H2) вместе аутологичной ДК вакциной и МНК пациента (рис. 23 и 24). В клиническом течении заболевания у данного больного наблюдался умеренный рост опухолевых очагов на фоне иммунотерапии аутологичной ДК-вакциной «CaTeVac» и полное отсутствие эффекта на фоне стандартной ХТ по схеме А1. В виду полученных результатов *in vitro* возможно рассуждать о синергичном эффекте вакцины «CaTeVac» и высоких доз IL-2.



—●— A1,A2    —■— B1,B2    —▲— C1,C2    —■— F1,F2    —■— G1,G2    —■— H1,H2

Рисунок 23. Графическое изображение динамики пролиферативной активности клеток культуры светлоклеточной саркомы №932 в присутствии аутологичных зрелых нагруженных РТА ДК и МНК и различных доз цитокинов GM-CSF и IL-2 с 20 по 75 часы наблюдения. А1, А2 – опухолевые клетки (интактный контроль); В1, В2 – ДК (контроль); С1, С2 – МНК (контроль); F1, F2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF + IL-2 (125 МЕ/мл); G1, G2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (50 МЕ/мл); Н1, Н2 - опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (1000 МЕ/мл).

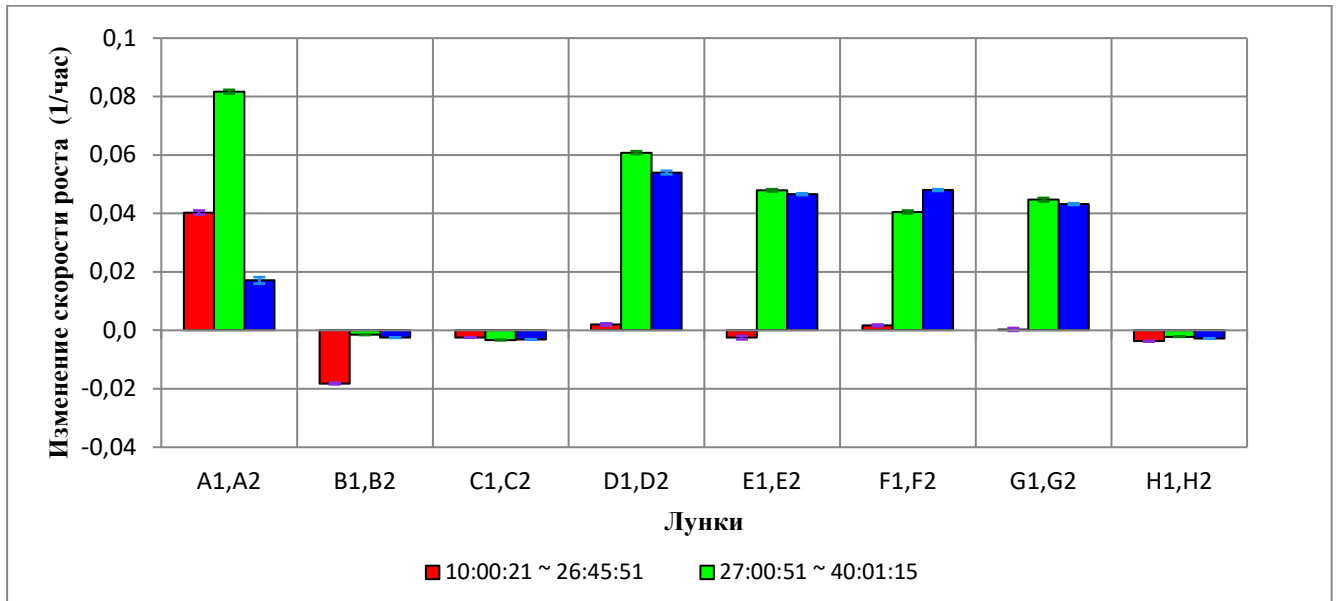
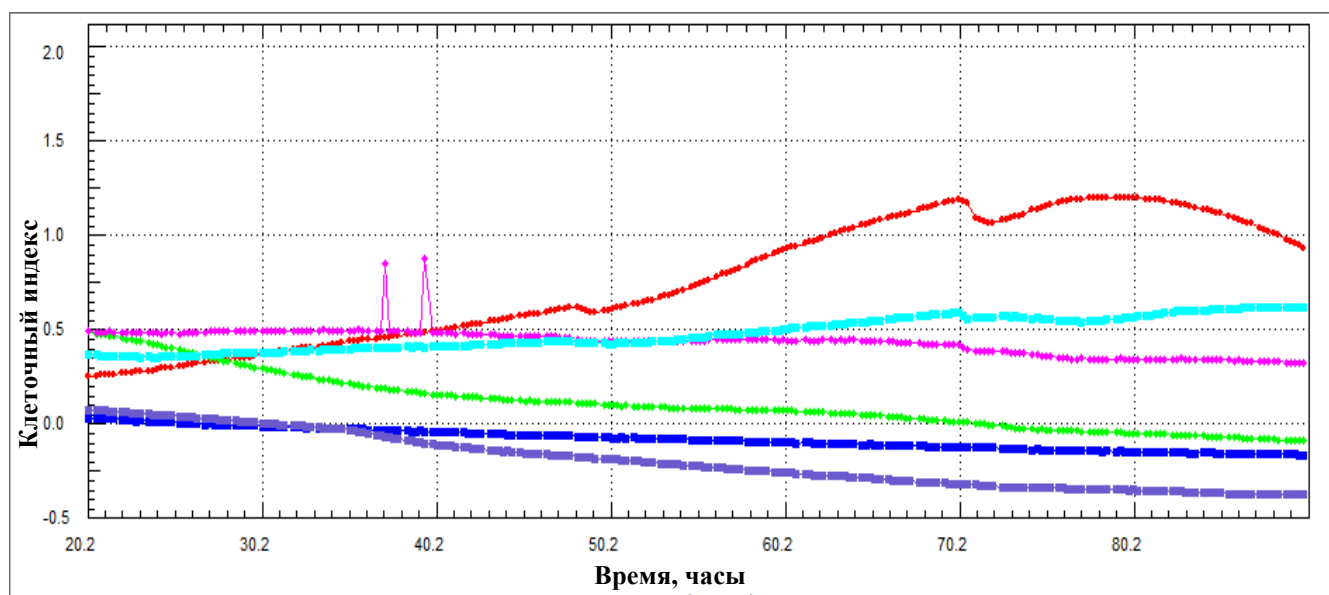


Рисунок 24. Изменение скорости роста культуры светлоклеточной саркомы №932 под влиянием различных стимулов в разные периоды наблюдения.

Культура СМТ №933 миксофибросаркомы оказалась наиболее чувствительной к воздействию иммунокомпетентных клеток (рис. 25 и 26). Во всех лунках, не считая негативный контроль (С1, С2 и D1, D2) снижалась пролиферативная активность опухолевых клеток. Самый лучший результат был достигнут при добавлении IL-2 в низких (G1, G2) и высоких дозах (А3, А4). Возможно, объяснением данного феномена служит поддержание CD25<sup>+</sup> Treg лимфоцитов, снижающих опухоль-опосредованное воспаление, ассоциированное с высокими показателями НКТ-клеток в иммунном статусе конкретного больного. IL-2 в высоких дозах, кроме прямого цитотоксического эффекта, мог послужить хорошим адьювантом поддерживающего жизнедеятельность иммунокомпетентных клеток. К тому же у этого же больного с миксофибросаркомой наблюдается стойкая стабилизация опухолевого процесса с продолжительностью более 1 года на фоне поддерживающей иммунотерапии «CaTeVac».



—●— B1,B2    —●— C1,C2    —●— D1,D2    —●— E1,E2    —●— F1,F2    —●— G1,G2    —●— H1,H2    —●— A3,A4

Рисунок 25. Графическое изображение динамики пролиферативной активности клеток культуры миксофибросаркомы №933 в присутствии аутологичных зрелых нагруженных РТА ДК и МНК и различных доз цитокинов GM-CSF и IL-2 с 20-го по 80-й часы наблюдения. B1, B2 – опухолевые клетки (интактный контроль); C1, C2 – ДК (контроль); D1, D2 – МНК (контроль); E1, E2 – опухолевые клетки + ДК + МНК; F1, F2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF; G1, G2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF + IL-2 (125 МЕ/мл); H1, H2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (50 МЕ/мл); A3, A4 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (1000 МЕ/мл).

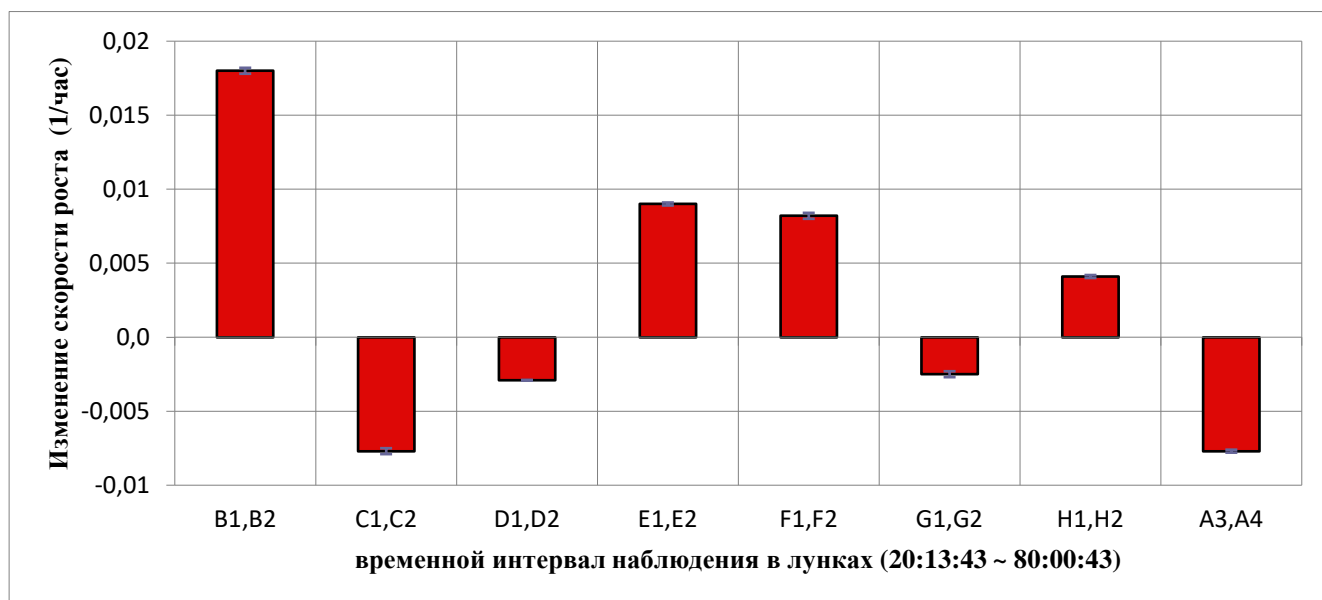


Рисунок 26. Изменение скорости роста культуры миксофибросаркомы (№933) под влиянием различных стимулов с 20-го по 80-й часы наблюдения.

Культура эмбриональной рабдомиосаркомы №862 демонстрирует различия клеточного индекса и изменения скорости роста уже на 20-м часу наблюдения (рис. 27 и 28). Наибольшее подавление пролиферации опухолевых клеток наблюдается при добавлении IL-2 и GM-CSF (F1,

F2), при этом высокая доза ИЛ-2 не способна остановить рост клеточной культуры эмбриональной рабдомиосаркомы. Более того, наблюдается постоянное увеличение скорости пролиферации во всех лунках, что свидетельствует о неэффективном противоопухолевом иммунном ответе.

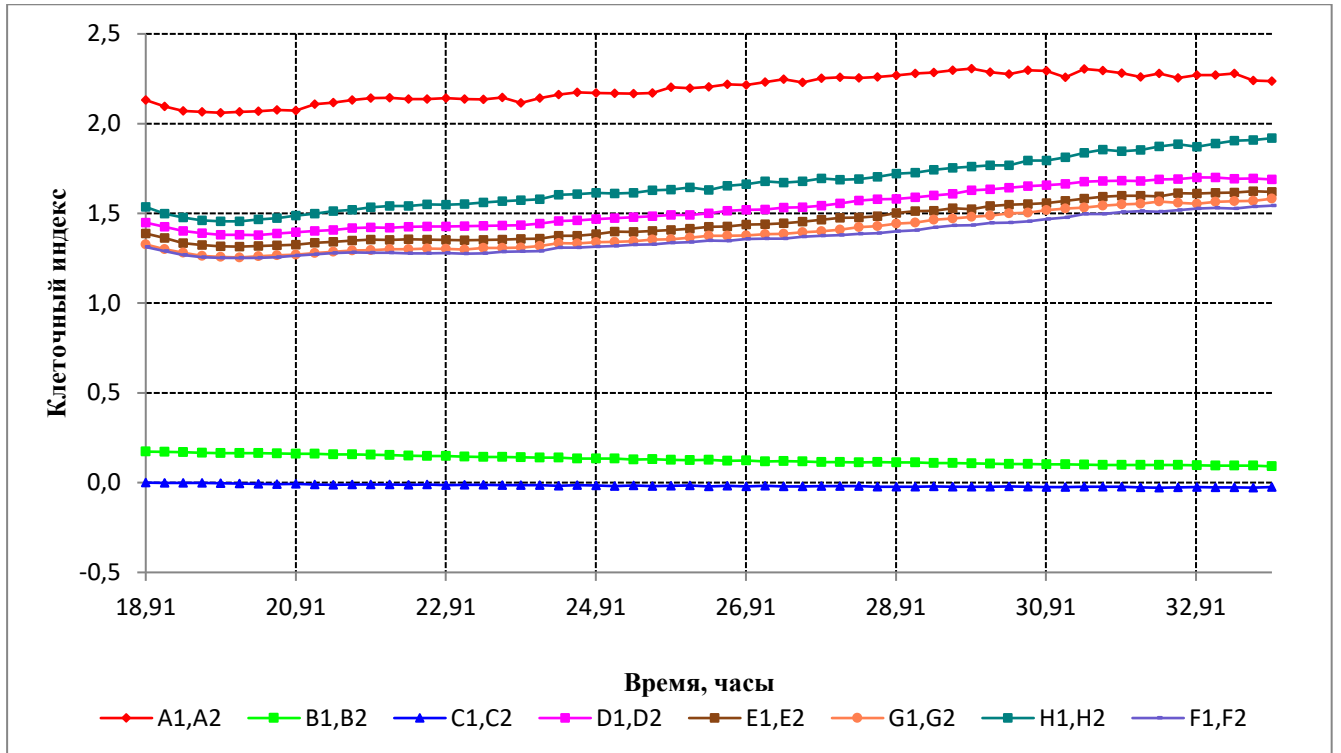


Рисунок 27. Графическое изображение динамики пролиферативной активности клеток культуры эмбриональной рабдомиосаркомы №862 в присутствии аутологичных зрелых нагруженных РТА ДК и МНК и различных доз цитокинов GM-CSF и ИЛ-2 с 20-го часа по 30-й час наблюдения. A1, A2 – опухолевые клетки (интактный контроль); B1, B2 – ДК (контроль); C1, C2 – МНК (контроль); D1, D2 – опухолевые клетки + ДК + МНК; E1, E2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF; F1, F2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF + ИЛ-2 (125 МЕ/мл); G1, G2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + ИЛ-2 (50 МЕ/мл); H1, H2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + ИЛ-2 (1000 МЕ/мл).

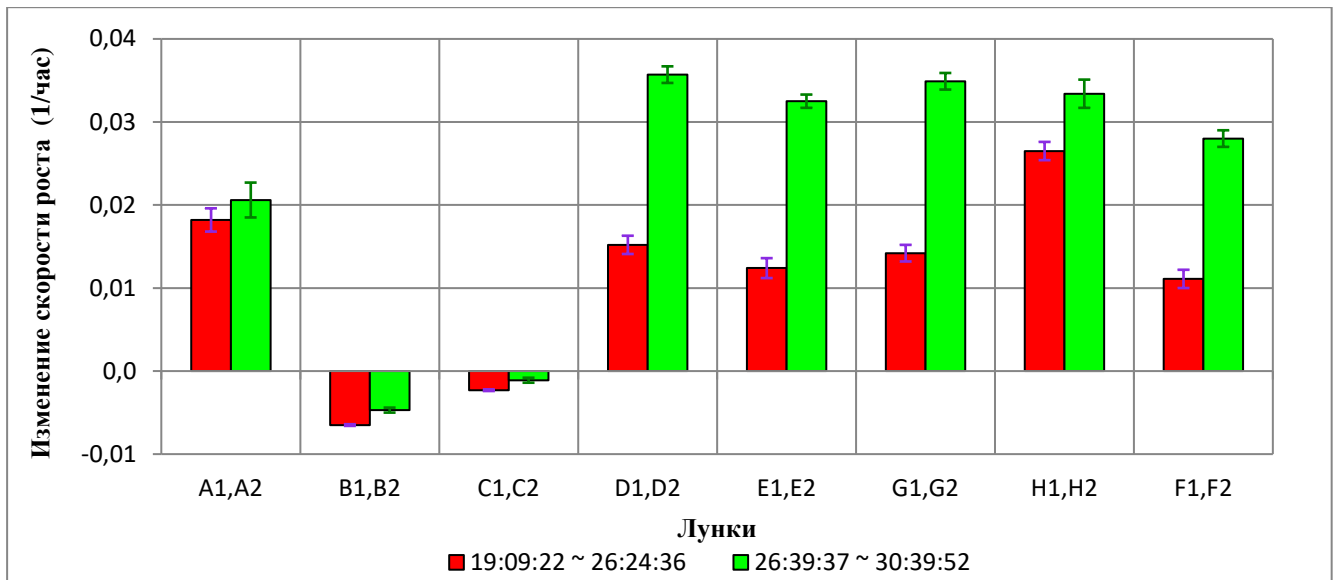


Рисунок 28. Изменение скорости роста культуры эмбриональной рабдомиосаркомы №862 под влиянием различных стимулов в разные периоды наблюдения.

### 3.2.2 Обсуждение

Аналитическая система xCELLigence позволяет моделировать естественный процесс опухоль-опосредованной иммуносупрессии и реализации эффекторной функции иммунной системы с целью изучения этих явлений в контролируемых условиях. В данной модели использованы аутологичные мононуклеарные клетки крови. Эта фракция включает различные популяции клеток иммунной системы, такие как Т- и В-лимфоциты, NK- и NKT-клетки, моноциты, MDSC. Такой подход позволяет учитывать как противоопухолевую активность эффекторных клеток, так и иммуносупрессирующее действие других компонентов иммунного микроокружения. Использование в модели аутологичной ДК-вакцины дает возможность персонализированной оценки эффективности данного метода иммунотерапии.

В нашем исследовании пролиферативная активность клеток саркомы была выше в присутствии клеток иммунной системы (ДК и МНК), чем в контроле, что подтверждает теорию об иммуноредактировании в опухолевом микроокружении [226]. Можно предположить, что клетки иммунной системы подверглись поляризации из М1 фенотипа макрофагов в М2 и зрелые ДК1 в фенотип дендритных клеток ДК2 в опухолевом процессе, что произошло под влиянием провоспалительных цитокинов и факторов роста и стало причиной более бурного роста клеточной культуры микофибросаркомы.

Известно, что иммуноредактирование состоит из 3 фаз: 1) элиминации, 2) равновесия и 3) уклонения. Во время фазы уклонения иммунная система не может ограничить опухолевый рост, на этом этапе опухолевые клетки уклоняются от иммунного распознавания. Происходит потеря опухолевых антигенов, МНС I и/или II класса или ко-стимулирующих молекул, идет экспрессия молекул повышенной резистентности (STAT-3), выживаемости

(антиапоптотическая молекула bcl2) и иммуносупрессия (IDO, TDO, PD-L1, galectin-1/3/9, CD39, CD73, аденозиновые рецепторы) и секреция цитокинов VEGF, TGF- $\beta$ , IL-6, M-CSF, которые усиливают ангиогенез [90, 226]. Кроме того, MDSC, макрофаги M2 и ДК могут также экспрессировать иммунорегуляторные молекулы, такие как аргиназа, iNOS и IDO и продуцировать иммуносупрессирующие цитокины IL-10 и TGF- $\beta$ , которые способны ингибировать пролиферацию CD8<sup>+</sup> лимфоцитов или индуцировать апоптоз. MDSC и IDO, экспрессирующие на DC, также стимулируют регуляторных Т-лимфоцитов. IDO, аргиназа, CD39 и CD73 являются иммунорегуляторными ферментами. Т-клетки, включая Treg, могут экспрессировать ингибирующие рецепторы, такие как PD-1, CTLA-4, TIM-3 и LAG-3, которые подавляют противоопухолевый иммунный ответ и тем самым поддерживают рост опухоли [38]. На этапе уклонения баланс сдвигнут в сторону прогрессирования опухоли из-за присутствия иммуносупрессирующих цитокинов и молекул, таких как IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF, IDO, PD-L1 [38, 90, 181, 226].

Следует отметить, что добавление в систему, включающую клетки СМТ, ДК и МНК, ростового фактора GM-CSF не способствовало подавлению опухолевого роста. Хотя GM-CSF является иммунологическим адьювантом, активирующим ДК и способствующим противоопухолевому иммунному ответу, клиническое применение высоких доз этого ростового фактора приводило к иммуносупрессии [262]. GM-CSF участвует в дифференцировке миелоидных клеток [50, 262], в опухолевом микроокружении он связан с MDSC, которые подавляют эффекторные функции ЦТЛ [50]. Также показана роль GM-CSF в развитии Treg [140]. Вероятно, эти механизмы были реализованы в нашем исследовании и поддерживали иммуносупрессию, позволяя опухолевым клеткам пролиферировать.

Другая картина наблюдалась, когда вместе с GM-CSF добавляли иммунологический адьювант IL-2, который является наиболее изученным противоопухолевым цитокином. Показана способность IL-2 стимулировать пролиферацию и терминальную дифференцировку эффекторных Т-клеток, а также повышать цитолитическую активность CD8<sup>+</sup> лимфоцитов [87]. Кроме того, он активирует некоторые рецепторы естественной цитотоксичности NK-клеток [157, 175]. В нашем исследовании добавление IL-2 в систему, моделирующую иммунное опухолевое микроокружение, приводило к существенному подавлению роста опухолевых клеток, по-видимому, за счет специфического и, отчасти, неспецифического противоопухолевого иммунного ответа. При этом более выраженный эффект IL-2 наблюдался, когда в систему не вносили GM-CSF, что еще раз подтверждает его иммуносупрессирующее действие.

Интересные результаты получены при использовании разных концентраций IL-2. A. Winkelstein и соавт. (1990) продемонстрировали дозозависимый эффект IL-2 на

дифференцировку Т-лимфоцитов. Добавление этого цитокина к МНК в концентрации 50 МЕ/мл приводило к повышению количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, тогда как высокая доза (1000 МЕ/мл) способствовала дифференцировке Т-клеток в ЦТЛ [257]. В нашем исследовании воздействие ИЛ-2 в концентрации 1000 МЕ/мл приводило к более выраженному подавлению роста опухолевых клеток, что может быть связано с повышением содержания антигенспецифических CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в совместной культуре.

Результаты клинических исследований показали, что использование ИЛ-2 в качестве самостоятельного иммунотерапевтического подхода для лечения СМТ было неэффективным [113, 219]. Однако согласно данным, полученным нами на *in vitro* модели опухолевого микроокружения СМТ, этот цитокин существенно повышает эффективность противоопухолевой ДК-вакцины. Это свидетельствует о ключевой роли профессиональных АПК в противоопухолевом ответе.

В случае культуры эмбриональной рабдомиосаркомы №862 добавление даже высокой дозы ИЛ-2 не приводит к подавлению опухолевого роста. Это может быть связано с иммуноредактированием опухоли (утратой ОАА и МНС I класса), с продукцией иммуносупрессирующих факторов, подавляющих эффекторные клетки-мишени ИЛ-2, либо с истощением иммунной системы пациента.

Таким образом, моделирование иммунного опухолевого окружения в аналитической системе xCELLigence® позволяет получить важную информацию о механизмах реализации противоопухолевого эффекта ДК-вакцины при лечении СМТ. *In vitro* оценка эффективности иммунотерапии с использованием культуры опухолевых клеток конкретного больного является мощным инструментом персонализированного подхода к лечению злокачественных новообразований.



### **3.3 АУТОЛОГИЧНАЯ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНАЯ ВАКЦИНА «CaTeVac» НА ОСНОВЕ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ СМТ**

Значительная доля заболевших СМТ приходится на лиц молодого и трудоспособного возраста, при этом смертность в этом же возрастном диапазоне превышает заболеваемость ?. Это делает проблему лечения СМТ социально значимой задачей для здравоохранения.

Таргетная иммунотерапия (моноклональные антитела, вакцины, клоны цитотоксических лимфоцитов), механизм действия которой направлен на прямое или опосредованное клетками иммунной системы разрушение опухоли, в последнее время становится одной из наиболее интригующих в лечении распространенных форм злокачественных новообразований. Результаты клинических исследований позволяют надеяться на ее решающую роль в лечении онкологических больных, в том числе, пациентов СМТ [6, 172, 173].

В течение многих лет иммунотерапия СМТ обсуждается в качестве одного из возможных способов лечения этих сложных гистотипически многообразных злокачественных новообразований. Это обусловлено тем, что прогресс химиотерапии в лечении СМТ невероятно медленный, вместе с тем, достижения иммунотерапии в лечении солидных опухолей не вызывают сомнения, и становится очевидной необходимость разработки новых, более эффективных схем лечения этой категории больных.

В настоящее время получены вакцины для лечения синовиальных сарком, иммуногенность которых направлена на продукты мутированных генов, в том числе саркома-специфические гибридные SYT-SSX белки [92]. При саркоме Капоши используют иммуногенные эпитопы вируса Эпштейна-Барр, ассоциированные с вирусом герпеса человека 8-го типа (HHV8) [96], применяют ганглиозиды, аутологичные опухолевые клетки с IFN- $\gamma$  или GM-CSF в качестве иммунологических адъювантов [205]. Вместе с тем до настоящего времени эти методы остаются недостаточно разработанными и не могут быть внедрены в клиническую практику в качестве стандартного лечения. Более того, есть ряд проблем, связанных с коррекцией противоопухолевого иммунного ответа, так как известно более 50 типов СМТ, и то, что может быть иммуногенным для одного типа, окажется ареактивным (толерантным) для другого. По тем же причинам трудно определить общие мишени для иммунотерапии этой «многоликой» опухоли.

В то же время, общепризнанный успех в иммунотерапии диссеминированной меланомы кожи создает платформу для разработки терапевтических вакцин на основе РТА для метастатических форм СМТ, резистентных к стандартным методам лечения.

РТА представляют собой группу белков, которые считаются одними из наиболее перспективных в качестве мишеней для иммунотерапии. В ранних работах Т. Воон и соавт. (1972) были обнаружены клоны Т-лимфоцитов, распознающие иммуногенные эпитопы раково-

тестикулярного антигена MAGE-1 (Melanoma antigen-1). Было установлено, что РТА экспрессируются в ткани яичек, плаценте и отсутствуют в нормальных тканях. В настоящее время известно более 70 семейств генов РТА, многие из которых изучаются в качестве мишеней для вакцинотерапии и адоптивной клеточной терапии [66].

Вместе с тем иммуногенные по определению РТА могут оказаться малоиммуногенными или неиммуногенными у некоторых групп пациентов. Это связано с тем, что эпитопы РТА могут быть ассоциированы с довольно редкими специфичностями главного комплекса гистосовместимости человека (HLA - от англ. Human Leukocyte Antigen). В то же время некоторые молекулы HLA I класса выявляются относительно часто, например, HLA \*0201 обнаружен у половины лиц европейской популяции. Было установлено, что среди РТА, ассоциированных с HLA\*0201 эпитопами, присутствуют иммуногенные NY-ESO-1, LAGE-1, PRAME, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A9, SSX-2. Экспрессия этих генов наиболее часто выявляется в синовиальной саркоме, липосаркоме, саркоме Юинга и др.

Недавно выявлены эпитопы NY-ESO-1 антигена, ассоциированные с аллелями DRB1, DRB4, DRB5 HLA II класса, распознаваемые CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами у пациентов с диссеминированной меланомой кожи. Установлена центральная роль CD4<sup>+</sup> Т-клеток в индукции и регуляции антиген-специфических CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) [214]. Менее известным остается значение CD4<sup>+</sup> Т-клеток в реализации клеточного и гуморального иммунитета, инициированного NY-ESO-1 антигеном у больных СМТ. Можно предположить, что NY-ESO-1/CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты модулируют направленность Th1 клеточного и Th2 гуморального иммунного ответа, определяя профиль продукции цитокинов, в том числе, в опухолевом микроокружении. Кроме того, антиген-презентирующие ДК в опухолевом микроокружении могут повлиять на активность Th0 (наивные Т-хелперы) и реализацию вакциноопосредованного противоопухолевого иммунного ответа.

В соответствии с этим, в качестве инновационного решения для лечения больных метастатическими СМТ была выбрана и ранее нами разработана технология специфической иммунотерапии на основе РТА<sup>+</sup> активированных аутологических ДК «CaTeVac».

### **3.3.1 Первая часть клинического исследования**

В первую часть исследования включено 22 больных с морфологически верифицированным диагнозом одного из подтипов СМТ, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2012 по 2017 гг. Критериями включения было прогрессирование опухолевого процесса после проведения химиотерапии по поводу распространенного заболевания. Клиническая характеристика больных представлена в табл. 11.

Все больные, включенные в исследование, получили хирургическое лечение. Восемью больным была выполнена лапаротомия и удаление опухоли, 10 пациентов получили лечение в виде иссечения образования мягких тканей и 4 больных подверглись ампутации нижней конечности.

Девяти больным в адьювантом режиме была проведена лучевая терапия на область послеоперационного рубца и ложа опухоли в суммарной дозе 50 Гр. До начала ДК-вакцинотерапии все пациенты получили стандартное лекарственное лечение. «Первая линия» химиотерапии была проведена 9 больным, «вторая линия» химиотерапии – 7 больным, 2 пациентов получили 3 линии химиотерапии и одна больная получила 4 линии химиотерапии до начала лечения ДК-вакциной «CaTeVac». Перечень применявшихся лечебных режимов представлен в табл. 11.

Таблица 11. Клиническая характеристика больных СМТ, получивших ДК-вакцинотерапию

Характеристика	Количество пациентов (n=22)
Средний возраст, годы	49,6±12,43 (от 23 до 64)
Пол:	
мужчины	9
женщины	13
Локализация первичного очага:	
конечность	8
туловище	6
внутренние органы	8
Местастазы в легких:	
есть	14
нет	8
Характеристика опухоли:	
лейомиосаркома	3
злокачественная фиброзная гистиоцитома	1
синовиальная саркома	6

злокачественная шваннома	2
эмбриональная рабдомиосаркома	1
фибросаркома	5
внескелетная хондросаркома	1
злокачественная гигантоклеточная опухоль мягких тканей	1
липосаркома	2
Предшествующее лечение:	
хирургическое	22
химиотерапия	
А (1)	1
АР (1)	1
СуVADIC (2)	2
AI (10)	10
IE (1)	1
MAID (5)	5
CM (1)	1
GemTax (6)	6
CP(1)	1
СОР(1)	1
Циклоф+винкристин+цисплатин+доксорубицин	1
Лучевая терапия (9)	9
Количество линий предшествующей лекарственной терапии:	
0	3
1	9
2	7
3	2
	1

А – монотерапия доксорубицином; АР – доксорубицин с цисплатином, СуVADIC – циклофосфамид, доксорубицин, дакарбазин, AI – доксорубицин и ифосфамид, IE – ифосфамид и этопозид, MAID – ифосфамид, доксорубицин, дакарбазин, CM – циклофосфамид с метотрексатом в метрономном режиме, GemTax – гемцитабин и доцетаксел, CP – карбоплатин и паклитаксел, СОР-циклофосфамид, цисплатин и винкристин.

### 3.3.1.1. Клиническая и иммунологическая оценка эффективности ДК-вакцины «CaTeVac»

ДК пациентов, культивируемые в присутствии РТА<sup>+</sup> опухолевого лизата собственного производства, были оценены по экспрессии маркеров активации и созревания (табл. 12).

Таблица 12. Иммунофенотип ДК больных на разных стадиях их созревания под влиянием РТА<sup>+</sup> опухолевого лизата

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	ДК незрелые (7 день) (%) М±σ	ДК зрелые (9 день) (%) М±σ
CD1a <sup>+</sup> CD83 <sup>-</sup>	52,01±29,42	13,01±14,21*
CD1a <sup>-</sup> CD83 <sup>+</sup>	11,01±11,31	67,05±24,43*
CD1a <sup>+</sup> CD83 <sup>+</sup>	21,03±23,17	9,02±12,25
CD83 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	8,01±6,24	49,11±19,32*
CD83 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>	31,01±31,11	73,03±14,34*
CCR7 <sup>+</sup>	13,03±38,32	82,02±25,18 * * p<0,05

Как видно из таблицы, по мере созревания статистически достоверно увеличивается экспрессия ДК молекул активации и миграции.

Зрелая ДК-вакцина «CaTeVac» больным вводилась внутривожно паравертебрально в 4 точки. С целью контроля иммунологической эффективности вакцины в первую точку вводили аллогенный опухолевый лизат, содержащий высокоиммуногенные РТА в дозе 30 млн в 0,3 мл. Иммунотерапия проводилась с интервалом 2 недели в течении 2 мес. и далее с интервалом 28 дней до прогрессирования заболевания.

Клиническая и иммунологическая оценка эффективности РТА<sup>+</sup> ДК-вакцинотерапии проведена у 22 больных, которые получили от 1 до 24 введений ДК-вакцины (в среднем 7 введений). Полный или частичный регресс у больных не был зарегистрирован. По данным лучевых методов диагностики, стабилизация опухолевого процесса после 2 мес. терапии наблюдалась у 10 (45,5%) больных. Медиана времени до прогрессирования при оценке по

системе RECIST 1.1. составила 3,3 месяца, что сравнимо с показателями эффективности химиотерапевтического лечения. У 32% и 23% больных не было прогрессирования в течение 6 и 12 мес. соответственно. Медиана общей выживаемости больных при этом составила 22,5 мес., что существенно превышает аналогичные показатели для других методов лечения, используемых во «второй линии» терапии (не более 18 мес.); 77% больных пережили 1 год (рис. 29-31).

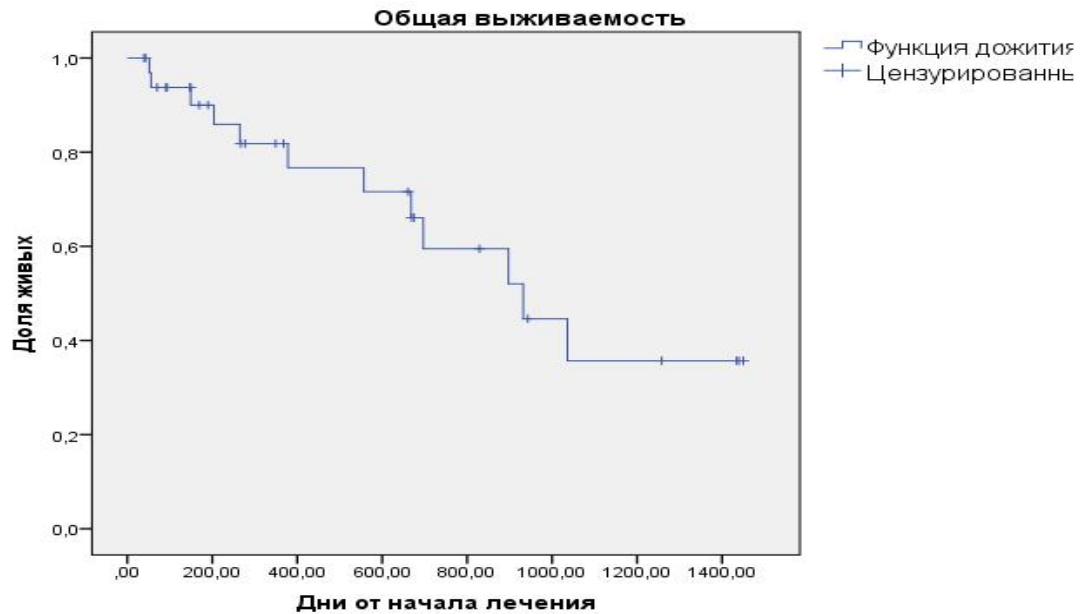


Рисунок 29. Общая выживаемость больных СМТ, получивших ДК-вакцину «CaTeVac».

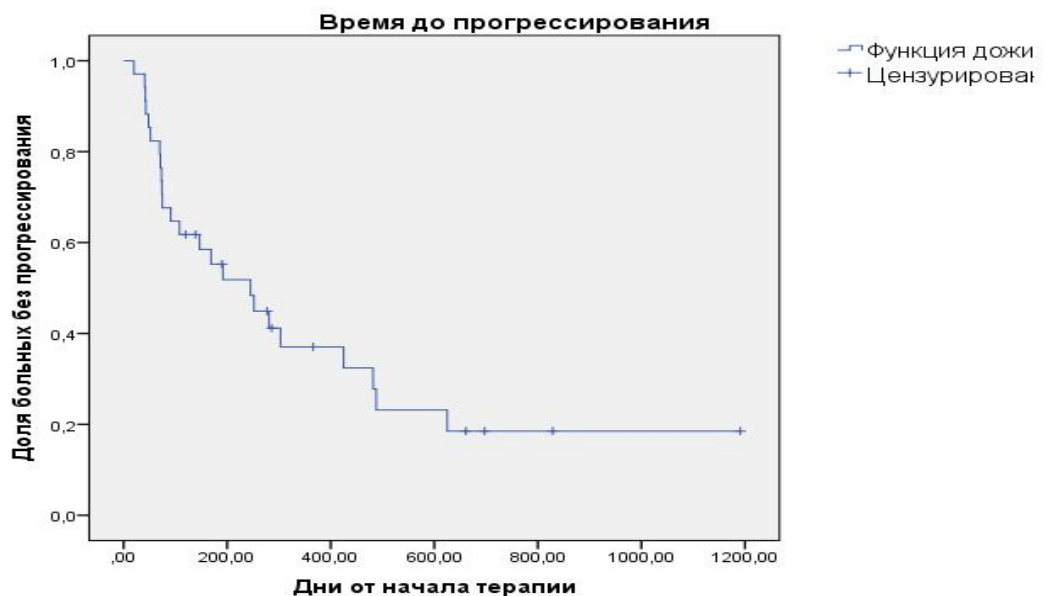


Рисунок 30. Время до прогрессирования у больных СМТ, получивших ДК-вакцину «CaTeVac».

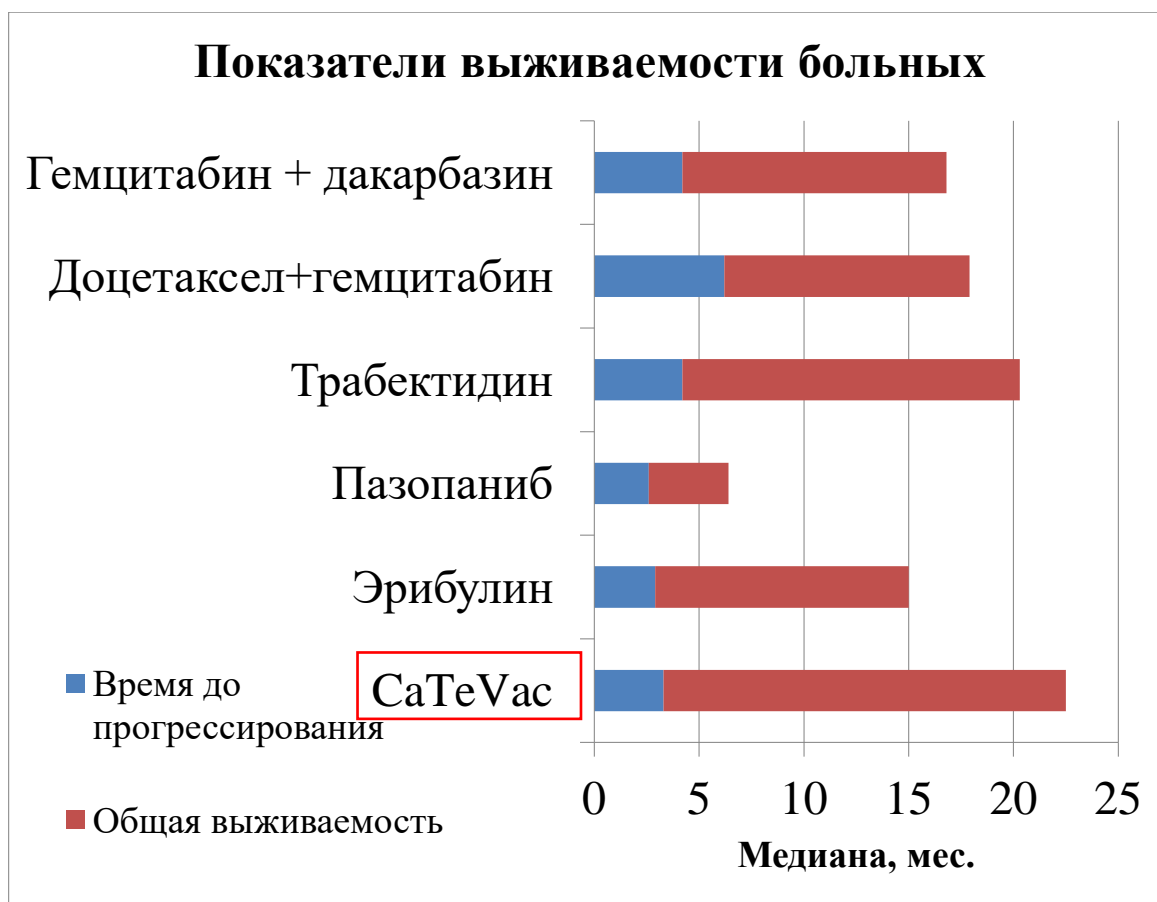


Рисунок 31. Сравнительная гистограмма показателей выживаемости больных СМТ, получавших «вторую линию» терапии на основе существующих подходов к лечению.

Установлено, что изучаемая ДК-вакцина «CaTeVac» не вызывает нежелательных явлений (НЯ) 3 и 4 ст., НЯ 1 и 2 ст. наблюдались у 14 из 22 больных. Зарегистрированные НЯ не требовали прерывания лечения или применения лекарственных средств для их купирования.

Необходимо отметить, что другие исследования, посвященные изучению клинической эффективности вакцин на основе ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток или различными пептидами, для лечения сарком немногочисленны и демонстрируют неоднозначные результаты. Так, в работе J.D. Geiger (2001) по изучению эффективности применения ДК-вакцин, нагруженных аутологичным опухолевым лизатом, был зарегистрирован полный регресс метастатических очагов фибросаркомы в легких у одного пациента из десяти [108]. В исследовании R. Dagher и соавт. (2004) из 16 больных с распространенными формами СМТ, получивших вакцины на основе ДК, нагруженных опухолеспецифическими пептидами, у 4-х пациентов была зарегистрирована стабилизация заболевания [80]. При использовании вакцин на основе ДК, активированных тремя синтетическими пептидами, которые являются фрагментами опухолеспецифических белков синовиальной саркомы и саркомы Юинга, для лечения 5 пациентов был достигнут полный

регресс у одного больного саркомой Юинга с продолжительным эффектом более 77 мес. Еще у 2-х пациентов зарегистрировали непродолжительную стабилизацию заболевания [239].

В нашем исследовании все больные были с метастазами, затрагивающими жизненно важные органы, после хирургического лечения получили одну (9/22, 40%) или более (10/22, 45%) линий лекарственного лечения. Следовательно, отсутствие полного и частичного регресса в нашем исследовании может быть связано с рядом причин: распространенностью опухолевого процесса, интенсивной цитотоксической предшествующей терапией и резистентным характером опухолей, что требует дальнейшего изучения.

У 19 из 22 больных (86,3%) зарегистрирована реакция ГЗТ через 24 ч уже после первого введения ДК-вакцины, в том числе, в контрольной точке, куда вводили РТА<sup>+</sup>-опухолевый лизат. В процессе ДК-вакцинотерапии наблюдали увеличение размеров реакции ГЗТ практически у всех пациентов (рис. 32). В ряде исследований различных типов вакцин для лечения СМТ авторы оценивали положительную динамику реакции ГЗТ в процессе вакцинотерапии как демонстрацию иммунного ответа *in vivo*. В частности, при введении вакцин на основе аутологичных опухолевых клеток с адьювантами (GM-CSF и INF- $\gamma$ ) медиана общей выживаемости больных с хорошо выраженной реакцией ГЗТ составила 16,6 мес. по сравнению с больными, не ответившими на лечение (8,2 мес.) [89]. Вместе с тем, описаны случаи отсутствия ГЗТ у пациентов, получавших неклеточные вакцины на основе пептидов, несмотря на обнаружение поствакцинальных специфически активированных ЦТЛ в периферической крови [136, 146].

Таким образом, реакция ГЗТ в процессе вакцинотерапии является важным, но не достаточным условием успешного лечения [22].

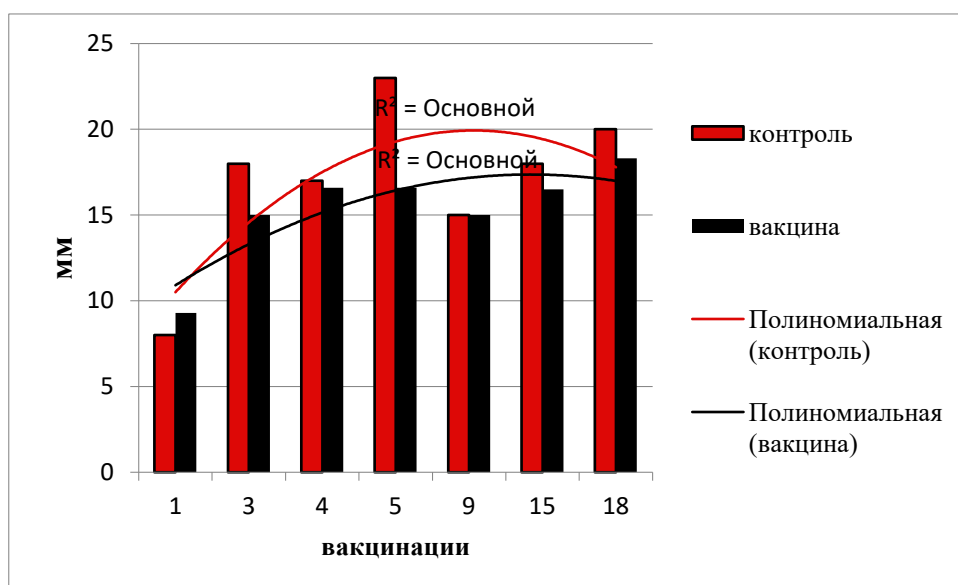


Рисунок 32. Динамика размеров реакции ГЗТ больного Г., 50 л., наблюдаемая через 24 ч после введения вакцины «CaTeVac», в процессе лечения.



При определении экспрессии РТА NY-ESO-1 и MAGE-A3 в опухоли пациентов: у 2-х больных зарегистрирована для обоих антигенов, у 4-х пациентов для одного антигена, у 2-х больных экспрессия этих антигенов не была обнаружена. Корреляции между экспрессией NY-ESO-1 и MAGE A3 и клинической эффективностью проводимой терапии не наблюдали. Выбор исследуемых РТА был определен литературными данными исследований о достаточно частой встречаемости этих белков в клетках солидных опухолей. Отсутствие изучаемой корреляции связано, вероятно, с малой численностью наблюдений и в тоже время указывает на необходимость более полного и комплексного обследования больных на предмет экспрессии РТА в опухоли, так как уже установлено, что СМТ способны экспрессировать широкий спектр РТА, например, в клетках синовиальной саркомы и лейомиосаркомы чаще встречается MAGE A4 и SSX-2, клетки хондросарком чаще экспрессируют MAGE-1 [233].

При анализе результатов лабораторного обследования наблюдали различную динамику иммунологических показателей у больных со стабилизацией заболевания (СЗ) и прогрессированием опухолевого процесса (ПЗ) (табл. 13). Введение изучаемой дозы ЦФ было достаточным для поддержания малой численности субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов ( $CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$ ), не превышающей референтных значений у больных со СЗ, в то время как у пациентов с ПЗ количество этих лимфоцитов увеличивалось в процессе лечения. Кроме того, больных со СЗ характеризовала тенденция к увеличению в периферической крови абсолютного содержания Т-лимфоцитов и NK-клеток, сохранению количества В-лимфоцитов в пределах нормы, в то время как у больных с ПЗ наблюдали снижение количества Т- и В-лимфоцитов в эти сроки наблюдения.

Интересным становится, что пациенты со СЗ демонстрировали волнообразную динамику содержания Т-хелперов и ЦТЛ в процессе ДК-вакцинотерапии, и при уменьшении количества этих клеток в периферической крови нарастала их активность, о чем можно судить по увеличению абсолютного содержания лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности антигены HLA-DR (рис. 33 и 34).

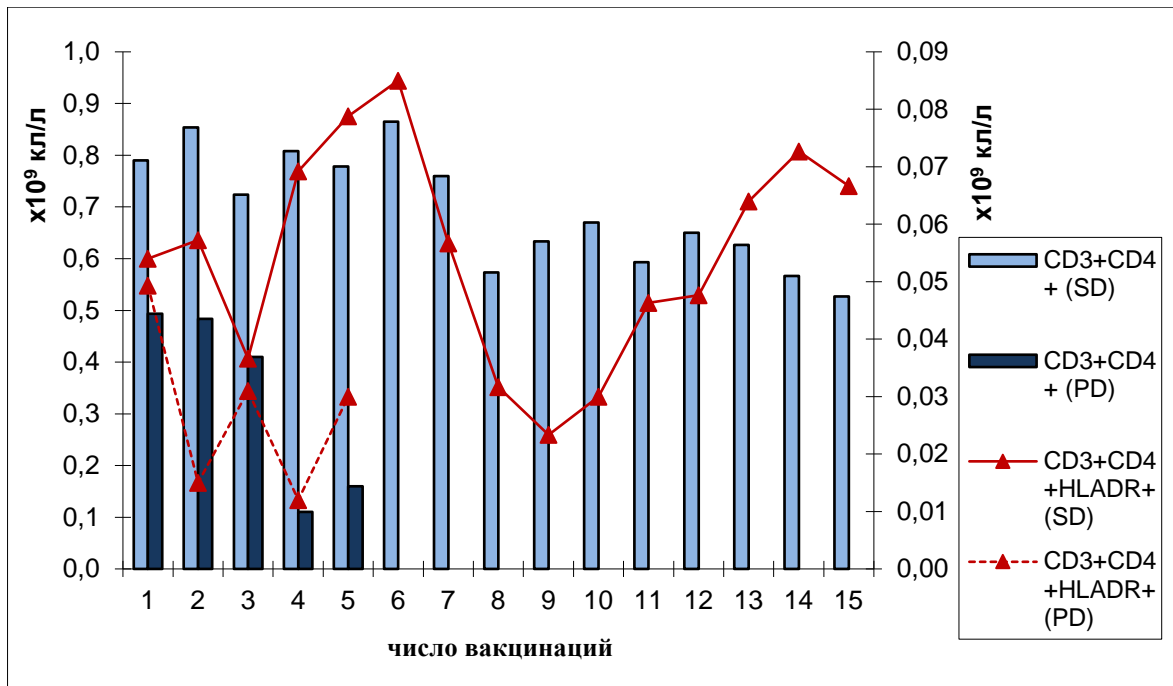


Рисунок 33. Динамика абсолютного содержания Т-хелперов и активированных Т-хелперов (HLA-DR<sup>+</sup>) в периферической крови больных СМТ с различным клиническим эффектом в процессе ДК-вакцинотерапии «CaTeVac».

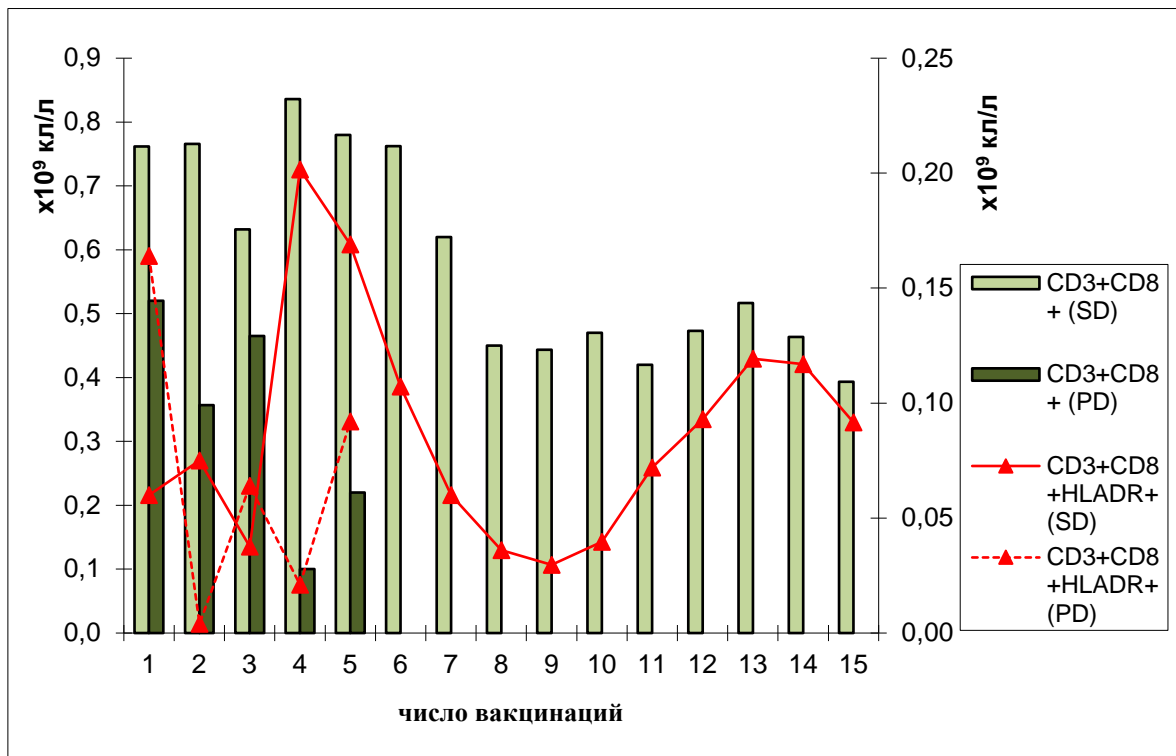


Рисунок 34. Динамика абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (HLA-DR<sup>+</sup>) в периферической крови больных СМТ с различным клиническим эффектом в процессе ДК-вакцинотерапии «CaTeVac».

Таблица 13. Анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных СМТ в процессе ДК-вакцинотерапии «СаТеVac».

№	Измеряемый показатель (x10 <sup>9</sup> кл/л)	SD (n=10)					PD (n=12)		
		1	2	3	4	7	1	2	3
1	CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	1,61±0,17	1,62±0,30	1,46±0,22	1,73±0,11	1,71±0,13	1,07±0,16	<b>0,88±0,07</b>	1,04±0,58
2	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	0,13±0,02	0,18±0,06	0,18±0,09	0,19±0,09	0,19±0,08	0,11±0,04	0,18±0,03	0,19±0,04
3	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,79±0,06	0,85±0,09	0,72±0,13	0,80±0,10	0,86±0,06	<b>0,49±0,12</b>	<b>0,48±0,12</b>	0,80±0,09
4	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	0,05±0,01	<b>0,06±0,01</b>	0,04±0,01	<b>0,07±0,02</b>	<b>0,09±0,02</b>	0,05±0,003	0,05±0,01,	0,04±0,02
5	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	0,26±0,06	0,31±0,09	0,17±0,03	0,21±0,03	0,32±0,04	0,07±0,01	<b>0,13±0,06</b>	<b>0,12±0,09</b>
6	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,76±0,13	0,76±0,23	0,63±0,13	0,83±0,15	0,78±0,11	0,52±0,02	<b>0,35±0,02</b>	0,46±0,04
7	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	0,06±0,02	0,07±0,02	0,04±0,01	<b>0,20±0,05</b>	<b>0,17±0,01</b>	<b>0,16±0,01</b>	<b>0,12±0,03</b>	0,07±0,02
8	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,003	0,03±0,01	0,03±0,004	<b>0,01±0,001</b>	<b>0,01±0,01</b>	0,02±0,001
9	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	<b>0,38±0,09</b>	<b>0,31±0,12</b>	0,19±0,04	0,24±0,03	<b>0,33±0,12</b>	0,25±0,07	0,16±0,01	0,22±0,04
10	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,11±0,03	0,11±0,05	0,11±0,04	0,12±0,05	0,10±0,05	<b>0,05±0,003</b>	<b>0,02±0,01</b>	<b>0,06±0,002</b>
11	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>low</sup>	0,04±0,003	0,06±0,01	0,04±0,01	0,05±0,004	0,05±0,001	0,05±0,01	0,05±0,01	0,07±0,003

**000**-повышенный показатель, **000**-пониженный показатель, 000-показатель в пределах референсных значений

Недавно описан случай успешного применения комбинации ДК-вакцины, активированной аутологичным опухолевым лизатом, и цитокин-индуцированными киллерами для лечения больного недифференцированной эмбриональной саркомой печени, когда в процессе вакцинотерапии осуществляли мониторинг состояния клеточного иммунитета и обнаружили значительное увеличение количества лимфоцитов с экспрессией CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> антигенов [261].

В нашем исследовании наблюдалось сниженное содержание клеток с иммунофенотипом CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (NK-клетки) у больных с ПЗ и сохранение этого показателя в пределах референсных значений у больных с положительным клиническим эффектом. Учитывая, что лимфоциты с данными поверхностными антигенами классифицируются как выполняющие важную роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа за счет продукции IFN- $\gamma$ , активирующего ЦТЛ и макрофаги, можно рассматривать тенденцию снижения численности этой субпопуляции клеток как неблагоприятную [2]. У больных со СЗ наблюдали низкий иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) за счет увеличения количества ЦТЛ, в то время как у 2-х из 3-х больных с ПЗ имела место противоположная тенденция.

Таким образом, обнаруживается связь между динамикой показателей клеточного иммунитета у больных СМТ, определяемых методом проточной цитометрии, и клинической эффективностью РТА<sup>+</sup> ДК-иммунотерапии «CaTeVac».

### **3.3.1.2. Заключение по первой части клинического исследования**

Разработка получения вакцинных ДК на основе высокоиммуногенного РТА<sup>+</sup> опухолевого лизата собственного производства позволила достичь высокой степени экспрессии молекул созревания и миграции на аутологичных ДК у больных диссеминированными СМТ после «первой линии» химиотерапии. Иммунотерапия ДК-вакциной «CaTeVac» хорошо переносится больными и не вызывает тяжелых местных и общих токсических реакций 3-4 ст. НЯ 1 и 2 ст. наблюдались у 14 из 22 больных (63,6%). При этом надо отметить, что ДК-вакцина «CaTeVac» является эффективным методом активной специфической иммунотерапии и оказывает клинически значимый противоопухолевый эффект у больных метастатическими формами СМТ во «второй» линии терапии: стабилизацию опухолевого процесса у 10 из 22 больных (45,5%). Медиана времени до прогрессирования при оценке по системе RECIST 1.1 составила 3,3 мес., что сравнимо с показателями эффективности химиотерапевтического лечения. У 32% и 23% больных не было прогрессирования в течение 6 и 12 мес. соответственно. Медиана общей выживаемости у этой категории больных составила 22,5 мес., что существенно превышает аналогичные показатели для других способов лечения, используемых во «второй» линии терапии (не более 18 мес.). В нашем исследовании 77%

больных пережили 1 год. Кроме того, иммунологический мониторинг в процессе «CaTeVac»-вакцинотерапии выявил тенденцию к восстановлению иммунологического гомеостаза, который был зарегистрирован в увеличении абсолютного содержания активированных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови на фоне снижения содержания регуляторных (супрессорных) Т-лимфоцитов. Более того, промежуточные результаты исследования были представлены на конкурсе «ОнкоБиоМед 2016» с проектом «Аутологичная дендритно-клеточная вакцина на основе раково-тестикулярных антигенов для лечения сарком мягких тканей (CaTeVac)» и стали победителем в номинации лекарственный препарат/технология лечения.

### **3.3.2 Вторая часть клинического исследования**

Результаты, полученные при использовании РГА<sup>+</sup>-активированной ДК-вакцины «CaTeVac» для лечения больных метастатическими формами СМТ, указывают на перспективность этого подхода для терапии пациентов с исчерпанными возможностями стандартного лечения, в частности, в случае химиорезистентных форм опухоли.

Ограничениями в первой части клинического исследования оказалась его малая мощность и возможное селекционное смещение, которое могло вызвать сдвиг результатов в пользу чрезмерно оптимистичной оценки. Вместе с тем становится очевидным, что даже при отсутствии различий в продолжительности жизни по сравнению с пациентами, которые получали химиотерапию, ДК-вакцинотерапия «CaTeVac» становится предпочтительней ввиду ее крайне низкой токсичности.

С целью увеличения мощности исследования и снижения возможной селективной выборки была набрана ретроспективная группа больных СМТ, получивших 2 или более линии системного лечения без применения «CaTeVac», n=30 пациентов (группа 1). Во вторую группу были включены больные с метастатическими формами СМТ, получивших две и более линии системного лечения и противоопухолевую ДК-вакцину «CaTeVac», которую применяли в поддерживающем режиме после оптимальной циторедукции метастазов или химиотерапии, или в лечебном режиме на фоне прогрессирования заболевания, n=39 пациентов. Первичной конечной точкой во второй части исследования был сравнительный анализ общей выживаемости больных в обеих группах. Вторичной конечной точкой являлась оценка отношения рисков смерти.

Развернутый дизайн исследования представлен на рис. 35. Характеристика 69 больных представлена в главе «Материалы и методы».

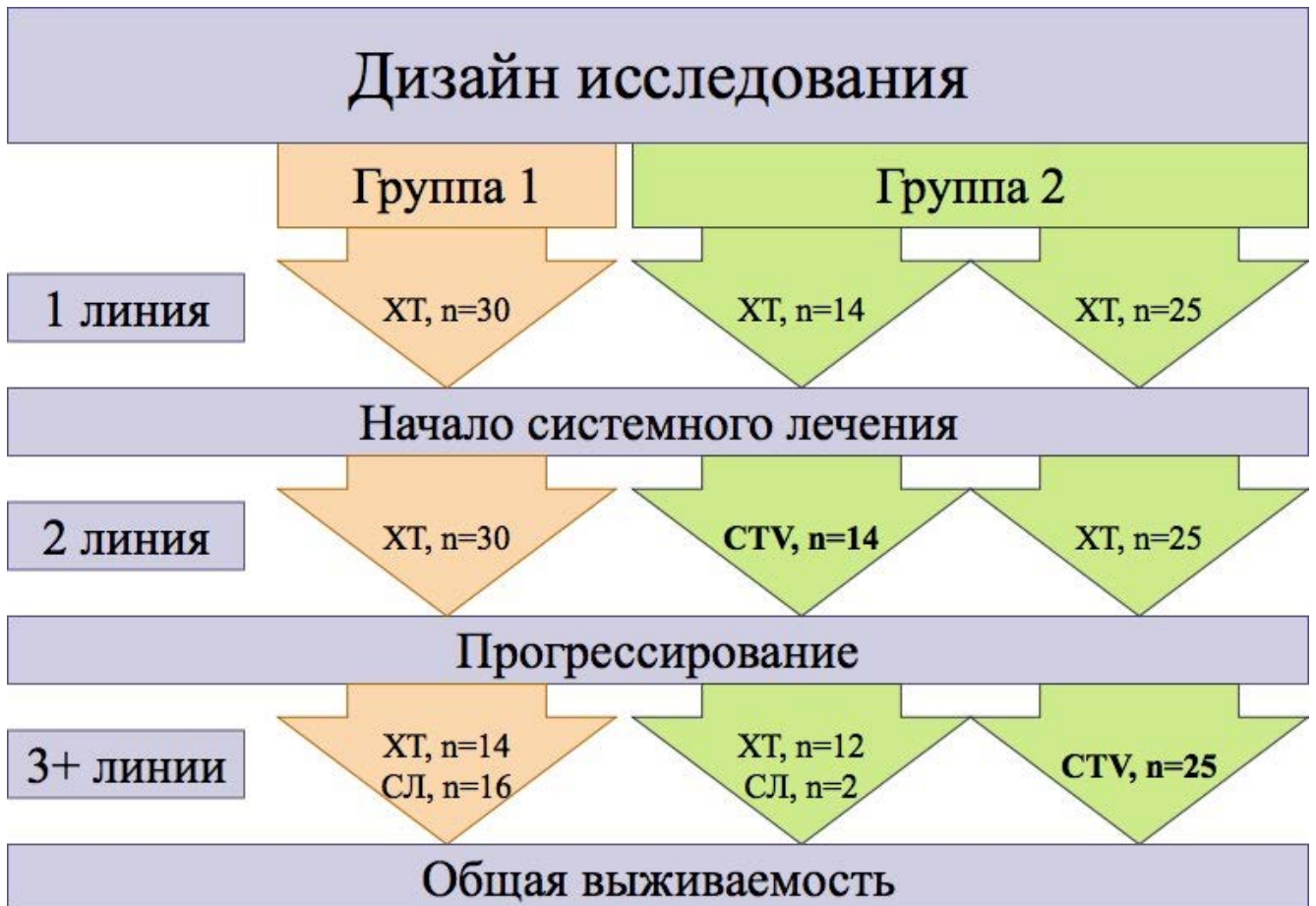


Рисунок 35. Характеристики лечения больных СМТ и распределение между группами пациентов: ХТ-химиотерапия, СЛ-симптоматическое лечение, СТV-противоопухолевая ДК-вакцина «CaTeVac».

На рис. 35 представлены больные, включенные в исследование в основном для проведения «второй» и «третьей» линии терапии. Обоснованием для планирования дизайна исследования и его анализа послужили полученные данные промежуточного анализа (Первая часть клинического исследования) и наши предположения о влиянии вакцинотерапии на общую продолжительность жизни больных.

Оценка эффективности лечения проводилась на основе RECIST 1.1 в обеих группах (табл. 14). В 1 группе пациентов во второй линии терапии без ДК-вакцины «CaTeVac» полных регрессов не было. Частичный регресс на фоне «второй» линии ХТ также не был зарегистрирован (0%), у 17 (57%) пациентов наблюдалась стабилизация заболевания. Прогрессирование заболевания после «второй» линии терапии выявлено у 13 пациентов (43%). В группе с ДК-вакциной «CaTeVac» у 17 больных (44%) зарегистрирована стабилизация опухолевого процесса, у 3 пациентов – частичный регресс (8%) и у 19 больных (49%) – прогрессирование заболевания.

Таблица 14. Эффект лечения у больных СМТ в группе с применением ДК-вакцины «СаТеVac» (группа 2) и без ее применения(группа 1)

RECIST 1.1	Группа 1		Группа 2	
	1 линия	2 линия	1 линия	2 линия
Полный регресс	2 (6%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
Частичный регресс	3 (10%)	0 (0%)	8 (21%)	3 (8%)
Стабилизация заболевания	11 (37%)	17 (57%)	21 (54%)	17 (44%)
Прогрессирование заболевания	14 (47%)	13 (43%)	9 (23%)	19 (49%)

Частичный регресс во 2-й группе был зафиксирован у больной с ангиосаркомой на фоне терапии ДК-вакциной и минимальный регресс на 26,6% у одного больного с липосаркомой забрюшинного пространства (рис. 36).

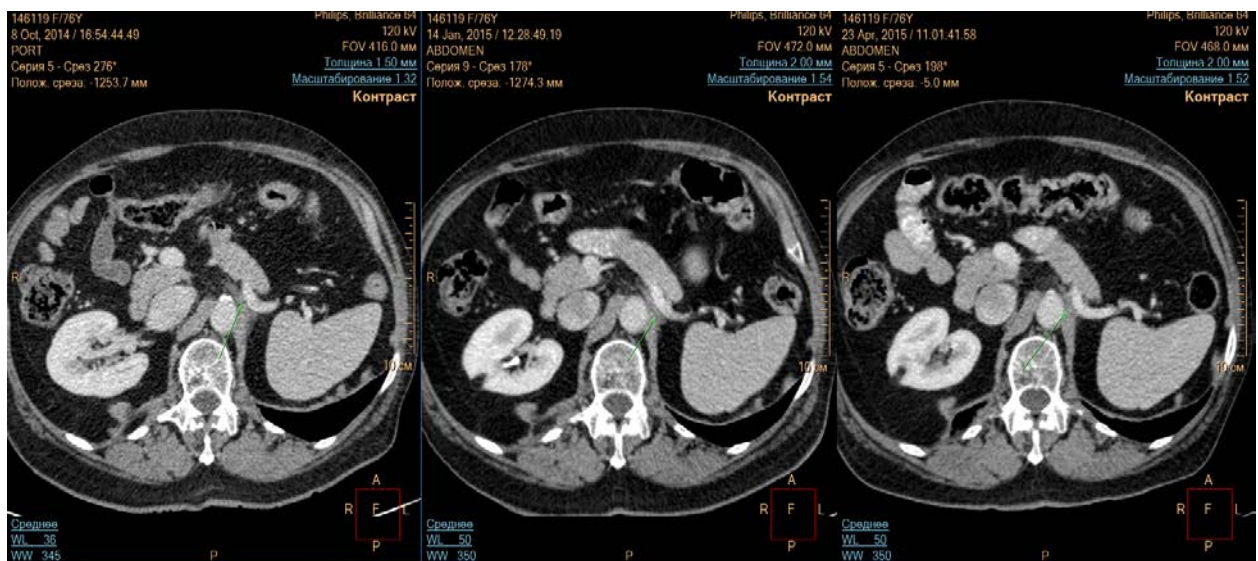


Рисунок 36. Больная Г., 76 лет, ангиосаркома надпочечника, до и после иммунотерапии ДК-вакциной «СаТеVac».

Больной Г., 76 лет, ангиосаркома левого надпочечника (рис. 36) в марте 2014 г. выполнена лапароскопическая адреналэктомия. Пациентка находилась под динамическим наблюдением. В ноябре 2013 г. по данным контрольного ПЭТ-КТ выявлено вторичное поражение парааортального лимфатического узла 11x9 мм, что было констатировано как неспецифическое образование. При КТ брюшной полости в июне 2014 г. выявлено

прогрессирование заболевания – рецидив в ложе удаленной опухоли (инфильтрат парааортально слева от чревного ствола на протяжении до 32x14мм). С 30.06.2014 г. начата ПХТ по схеме GemTax. Всего проведено 12 циклов. Максимальный эффект лечения – стабилизация, очаг уменьшился до 30x9 мм. С 03.11.2014 г. пациентке начата иммунотерапия ДК-вакциной «CaTeVac» в поддерживающем режиме до 04.09.2015 г. Всего проведено 12 введений. На фоне лечения очаг уменьшился на 33,3% до 20x8 мм. Пациентка находится под динамическим наблюдением, данных за прогрессирование на 09.2018 г. нет.

Пациент В., 63 г. с диагнозом: гигантская липосаркома забрюшинного пространства, pT2bNxM0 от 2012 г. Первая операция была проведена в мае 2012 г., далее хирургическое лечение проводилось по поводу рецидива заболевания в декабре 2015 г. и марте 2017 г. Прощедив заболевания в мае 2017 г. Обратился в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Учитывая гистологический тип опухоли (высокодифференцированная липосаркома), низкую чувствительность к химиотерапии (в отличие от миксоидной липосаркомы) и желание пациента получать экспериментальное лечение, начата иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» в мае 2017 г. Стабилизация опухолевого процесса зарегистрирована в июле 2017 г. и регресс на 26,6% по RECIST 1.1 в октябре 2017 г. При пересчете размеров опухоли по irRC зарегистрировано уменьшение очага на 60,6%, частичный регресс на фоне 8 введений ДК-вакцины «CaTeVac» (рис. 37) В июле 2018 г. зарегистрировано прогрессирование заболевания, выявлен новый очаг в брюшной полости и увеличение размеров контрольного очага. В настоящее время (сентябрь 2018 г.) пациент получает предоперационную лучевую терапию.

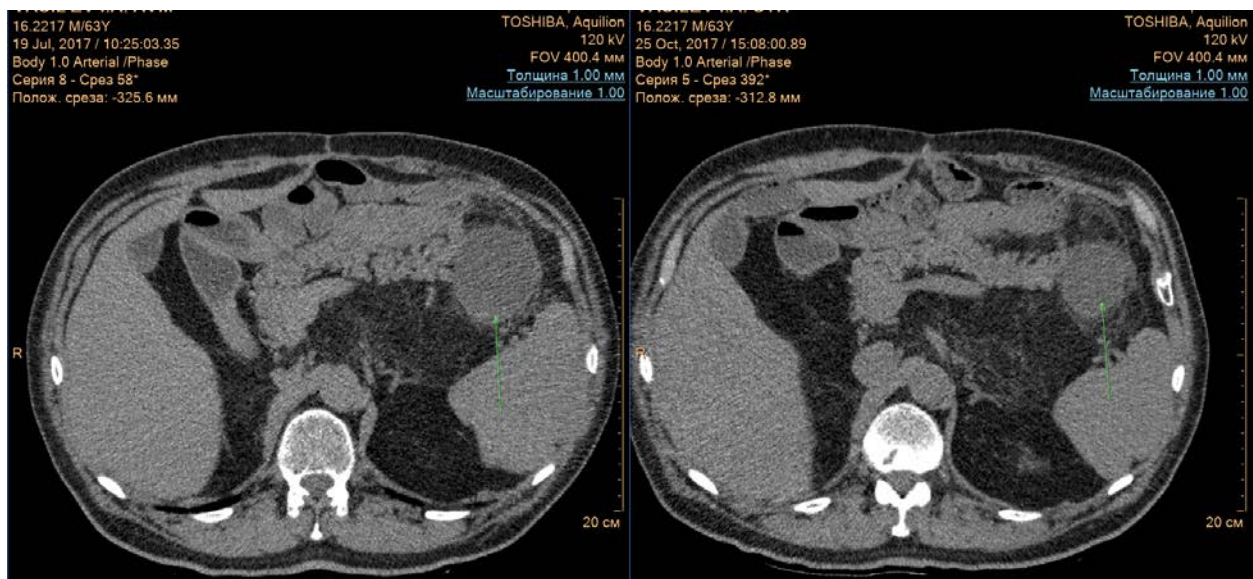


Рисунок 37. Пациент В, 63 г., липосаркома забрюшинного пространства, до и после иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac».



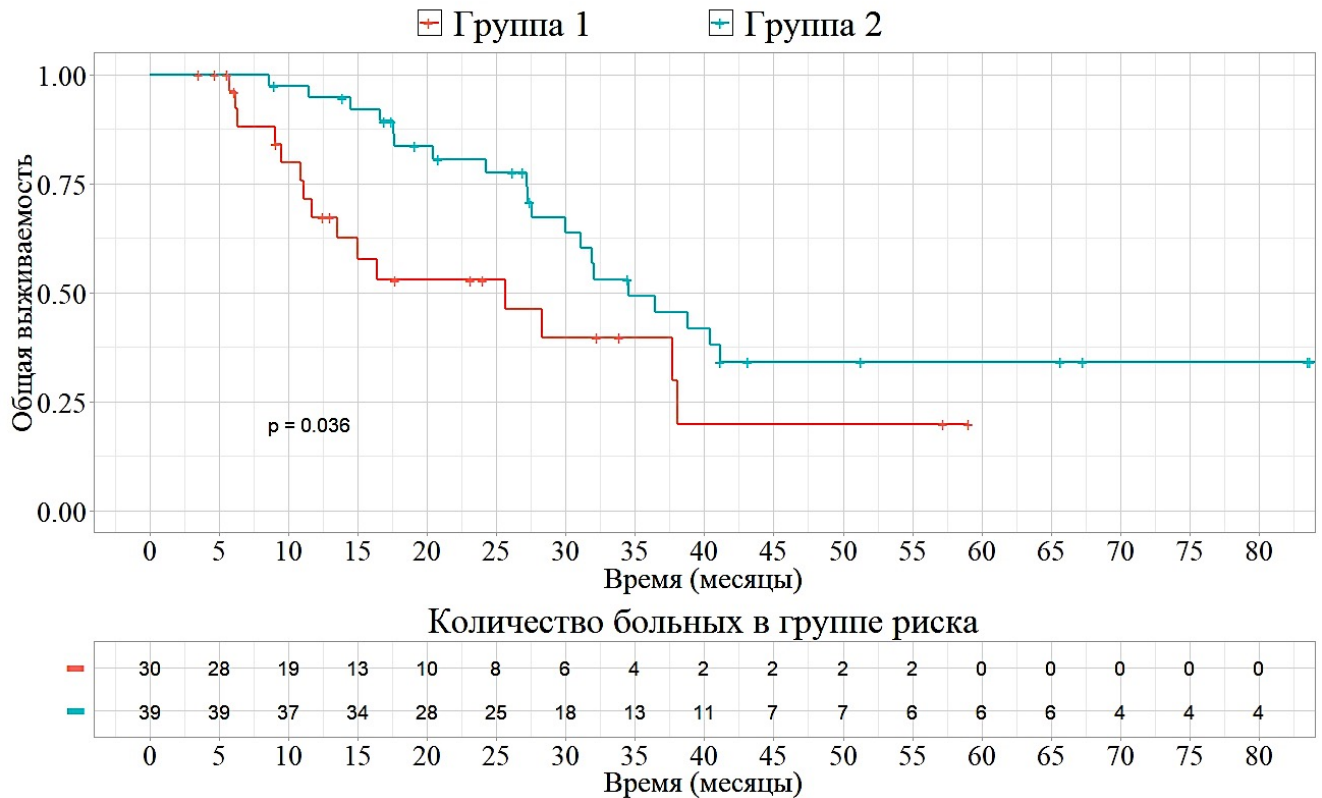


Рисунок 38. Графическое изображение сравнительного анализа общей выживаемости в соответствии Каплана – Мейера между 1-й группой (без «CaTeVac») и 2-й группой (с применением «CaTeVac») у больных метастатическими СМТ.

Общая выживаемость (ОВ) пациентов в 1-й группе составила 25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес) против 34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес) в группе «CaTeVac» (Log-Rank  $p = 0,036$ , Breslow  $p = 0,006$ ) (рис. 38). Отношение рисков (ОР) наступления смерти  $[\exp(B)]$  в 1-й группе пациентов, получавших только стандартную терапию, составило 0,492 (95% ДИ 0,250-0,969) в регрессии Кокса. Пол и возраст не влияли на ОВ ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, можно заключить, что противоопухолевая ДК-вакцина «CaTeVac» снижает риск наступления смерти во 2-й группе по сравнению с группой контроля (группа 1) в 2 раза.

### 3.3.3 Заключение по второй части клинического исследования

Исходя из выше изложенного, можно рассматривать применение РТА<sup>+</sup> ДК-вакцины «CaTeVac» в качестве основного вида лечения в «первой» или во «второй» линии терапии у больных метастатическими СМТ с условно индолентным течением заболевания и/или имеющимися противопоказаниями к проведению полихимиотерапии, или как дополнительную опцию в поддерживающем режиме к стандартной или метронормной химиотерапии у пациентов с быстро прогрессирующими СМТ.

Таким образом, полученные результаты позволяют перейти к рандомизированным клиническим исследованиям с целью подтверждения эквивалентности или превосходства иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» над другими вариантами системного лечения метастатических СМТ, так как , разрабатываемый подход обладает лучшими показателями соотношения риска и пользы из существующих на сегодняшний день подходов во «второй» линии химиотерапевтического лечения этой нозологической формы злокачественного новообразования, и в будущем может быть рассмотрен в качестве адъювантной терапии у больных СМТ с высоким риском прогрессирования заболевания.

### **3.4 ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОСУПРЕССИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ У БОЛЬНЫХ САРКОМАМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ**

Хемокины могут быть функционально классифицированы как гомеостатические или воспалительные, что соответствует выражению, конститутивным или индуцируемым, соответственно. Гомеостатические цитокины регулируют Т-клеточный трафик при селекции в тимусе, а также физиологическое перемещение иммунных клеток (то есть хемокинез) через вторичные лимфоидные органы и периферические ткани в обычных условиях иммунного надзора. С другой стороны, воспалительные хемокины играют ключевую роль в рекрутировании иммунных клеток в периферическую ткань в ответ на антигенный вызов. Хемокины регулируют миграцию иммунных клеток в опухоли и участвуют в развитии, прогрессировании и ангиогенезе опухолей [129]. Было показано, что при меланоме присутствие ОИЛ коррелирует с экспрессией CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 и CXCL10 [125, 221]. Например, интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ) -ингибируемые хемокины CXCL9 и CXCL10, которые могут секретировать локальные миелоидные и стромальные клетки, участвуют в рекрутинге CXCR3+ CD8+ Т-клеток памяти [55, 76, 242] и сильно связаны с Th1-иммунным ответом [76, 115], а также благоприятным исходом химиотерапии и иммунотерапии [222].

#### **3.4.1 Результаты**

По данным проточной цитофлюориметрии, регуляторные Т-лимфоциты экспрессировали на поверхности CCR4 (CD194), CCR10, VEGFR-2 (CD304) и Neuropilin-1 (CD309) (рис. 39).

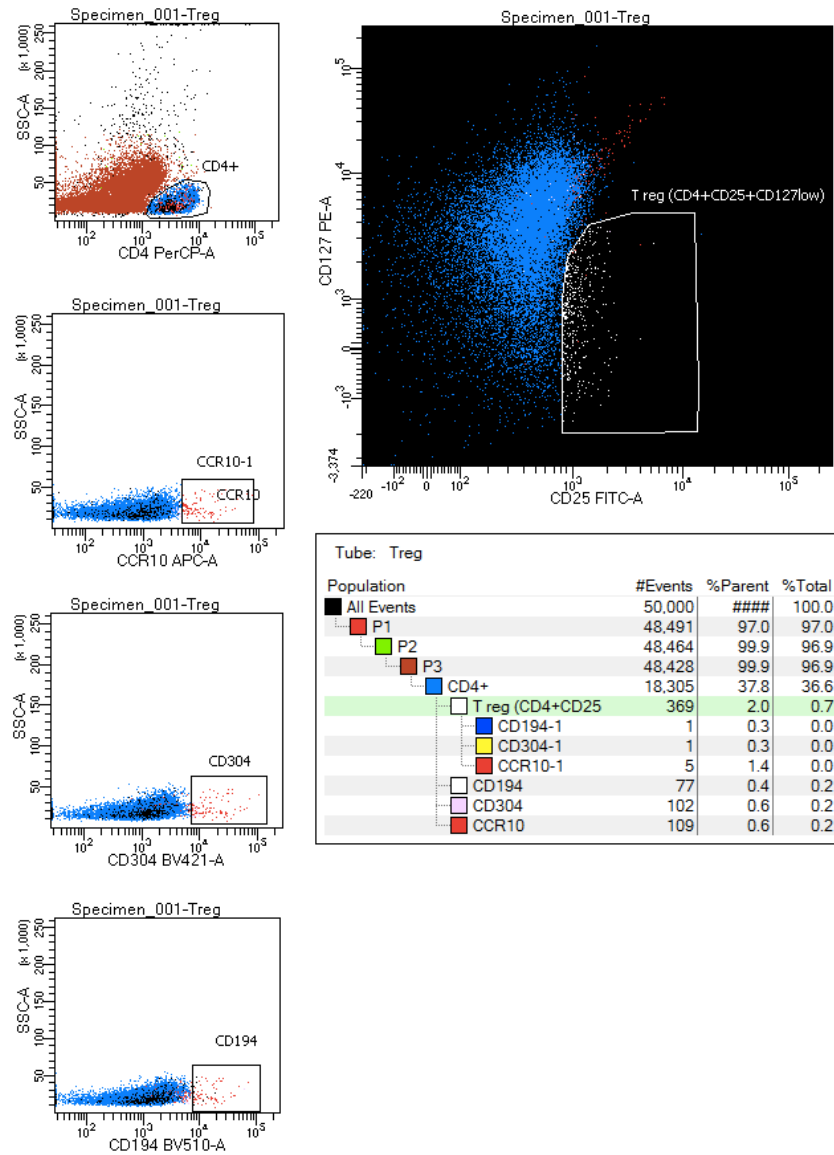


Рисунок 39. Экспрессия CCR4, CCR10 и Neuporilin-1 на поверхности Treg.

Медиана распределения относительного содержания Treg в периферической крови больных метастатическими СМТ составила 6,7 (интерквартильный размах (ИКР) от 5,57 до 9,25). Минимальное и максимальное значение этого параметра в группе пациентов с ПЗ составило 4,5 – 10,2%, что перекрывает границы референсных значений (1,65–5,75%). Сопоставление относительного количества Treg у больных с ПЗ и СЗ указывает на тенденцию к увеличению субпопуляции Treg в периферической крови у пациентов с ПЗ (табл. 15).

При статистическом анализе зависимости изучаемых показателей Treg от течения заболевания выявили статистически значимые различия у больных с ПЗ и СЗ в количественном содержании Treg, экспрессирующих на своей поверхности CCR10 ( $p=0,001$ ), CCR4 ( $p=0,001$ ), Nrp1 ( $p=0,021$ ). У одного больного хондросаркомой относительное содержание CCR10<sup>+</sup>Treg

составило 98,9% за 3 месяца до клинического проявления метастазирования опухоли в головной мозг, в то время когда экспрессия CCR4 не превышала 10%.

Таблица 15. Количественное содержание Treg в периферической крови больных СМТ и их иммунофенотип в зависимости от течения заболевания

Характер течения заболевания	Treg (%)				
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>low</sup>	CCR10 <sup>+</sup>	CD304 <sup>+</sup>	VEGFR-2 <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup>
ПЗ, медиана	8,90	9,10	6,00	0,80	10,00
ИКР	7,05-10,20	5,80-19,35	2,55-9,75	0,0-1,35	4,00-51,25
СЗ, медиана	8,75	4,50	2,50	0,20	3,30
ИКР	6,80-9,37	2,60-6,20	1,80-4,40	0,00-1,30	1,95-4,50
p	0,776	<b>0,001</b>	<b>0,021</b>	0,435	<b>0,001</b>

ПЗ – прогрессирование заболевания

СЗ – стабилизация заболевания

Выявлено снижение абсолютного содержания NK-клеток в периферической крови больных СМТ при прогрессии опухолевого процесса, медиана  $0,11 \times 10^9/\text{л}$ , ИКР 0,08-0,15 ( $p=0,031$ ). Изменения в субпопуляционном составе цитотоксических CD8<sup>+</sup> лимфоцитов не были статистически значимы в зависимости от активности опухолевого процесса ( $p=0,511$ ) (табл. 16).

Таблица 16. Количественное содержание NK клеток и цитотоксических Т лимфоцитов в периферической крови больных СМТ и их иммунофенотип в зависимости от течения заболевания

Характер течения заболевания	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>		Цитотоксические Т лимфоциты	
	NK (%)	NK $\times 10^9/\text{л}$	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> $\times 10^9/\text{л}$	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> $\times 10^9/\text{л}$
ПЗ, медиана	9,2	0,11	0,32	0,39
ИКР	6,95–13,75	0,08–0,15	0,19 - 0,46	0,018 - 0,11
СЗ, медиана	13	0,17	0,36	0,031
ИКР	7,5 – 16	0,09-0,26	0,23 – 0,47	0,02 – 0,05
p	0,241	<b>0,031</b>	0,511	0,619

При многогрупповом сравнении относительных значений общего содержания Treg и субпопуляций Treg, экспрессирующих изучаемые рецепторы, у больных СМТ разных

гистологических типов были выявлены значимые различия ( $p=0,012$  и  $p=0,006$ ) для  $CCR4^+Treg$  и  $CCR10^+Treg$ . Для уточнения категорий значимости применили апостериорный тест Данна для попарного сравнения групп пациентов, который показал значимые различия только для когорт с липосаркомой и синовиальной саркомой ( $p=0,012$  и  $p=0,007$ ) (табл. 17).

Таблица 17. Распределение относительного содержания Treg у больных различными типами СМТ в зависимости от экспрессии рецепторов хемокинов и Nrp1

Параметры	Липосаркома	Синовиальная саркома	Лейомиосаркома
Treg (%)			
n	11	11	5
Медиана	9,5	7,4	5,8
25-75 процентиля	6,7 – 10,2	5,7 – 9,3	5,55 – 7,4
Min - Max	3,0 – 16,0	5,3 – 10,4	5,4 – 7,8
p	0,101		
CCR4 <sup>+</sup> Treg (%)			
n	9	10	5
Медиана	<b>68,3*</b>	<b>3,95*</b>	6,0
25-75 процентиля	7,25 – 71,6	2,22 – 5,52	2,32 – 9,6
Min - Max	3,4 – 75,7	0,7 – 11,1	1,9 – 10,0
p	0,012		
CCR10 <sup>+</sup> Treg (%)			
n	11	11	5
Медиана	<b>9,5**</b>	<b>2,93**</b>	8,2
25-75 процентиля	5,1 – 14,9	2,4 – 5,9	7,0 – 9,3
Min - Max	2,08 – 20,0	1,3 – 9,1	6,1 – 9,7
p	0,006		
Nrp1 <sup>+</sup> Treg (%)			
n	9	11	5
Медиана	4,5	4,2	6,7
25-75 процентиля	3,05 – 9,05	3,1 – 7,1	2,8 – 19,1
Min - Max	2,1 – 11,4	1,8 – 17,5	2,7 – 30,1
p	0,814		

\* апостериорный тест -  $p=0,012$

\*\* апостериорный тест -  $p=0,007$

Измерение количества VEGF и хемокина CCL2 в супернатантах клеточных культур СМТ позволило установить, что культивируемые опухолевые клетки, независимо от их гистотипической принадлежности, продуцируют значительные количества этих факторов. Наибольшее количество VEGF продуцировали клетки лейомиосарком и миксофибросарком. Максимальное содержание VEGF в клеточных супернатантах СМТ составило 9,49 нг/мл, минимальное – 1,54 нг/мл в сравнении с содержанием VEGF в контрольных супернатантах культуры нормальных фибробластов кожи человека 0,14 нг/мл. СМТ демонстрировали большую вариабельность в продукции CCL2, наиболее активными продуцентами были липосаркомы, хондросаркомы и лейомиосаркомы. Максимальное содержание CCL2 составило 2895,0 пг/мл, минимальное – 44,02 пг/мл.

Была обнаружена прямая корреляция высокой силы между продукцией клетками СМТ VEGF и экспрессией на Treg Nrp1<sup>+</sup> ( $r=0,93$ ,  $p=0,001$ ) и VEGFR-2<sup>+</sup> ( $r=0,88$ ,  $p=0,007$ ) (рис. 40).

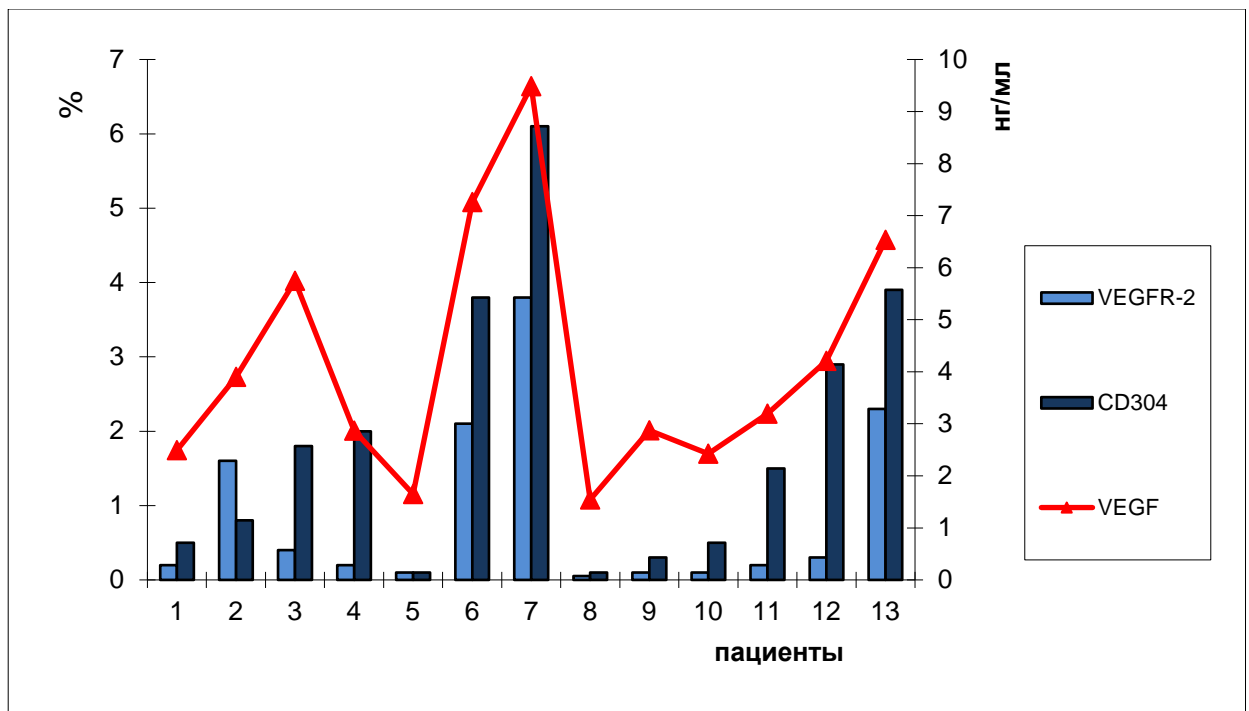


Рисунок 40. Графическое изображение зависимости продукции клетками СМТ VEGF и экспрессии на Treg Nrp1<sup>+</sup> (CD304) и рецептора VEGFR-2 (CD309).

Изучение системы CCR4/CCL2 также показало наличие прямой корреляции высокой силы ( $r=0,81$ ,  $p=0,024$ ) (рис. 41).

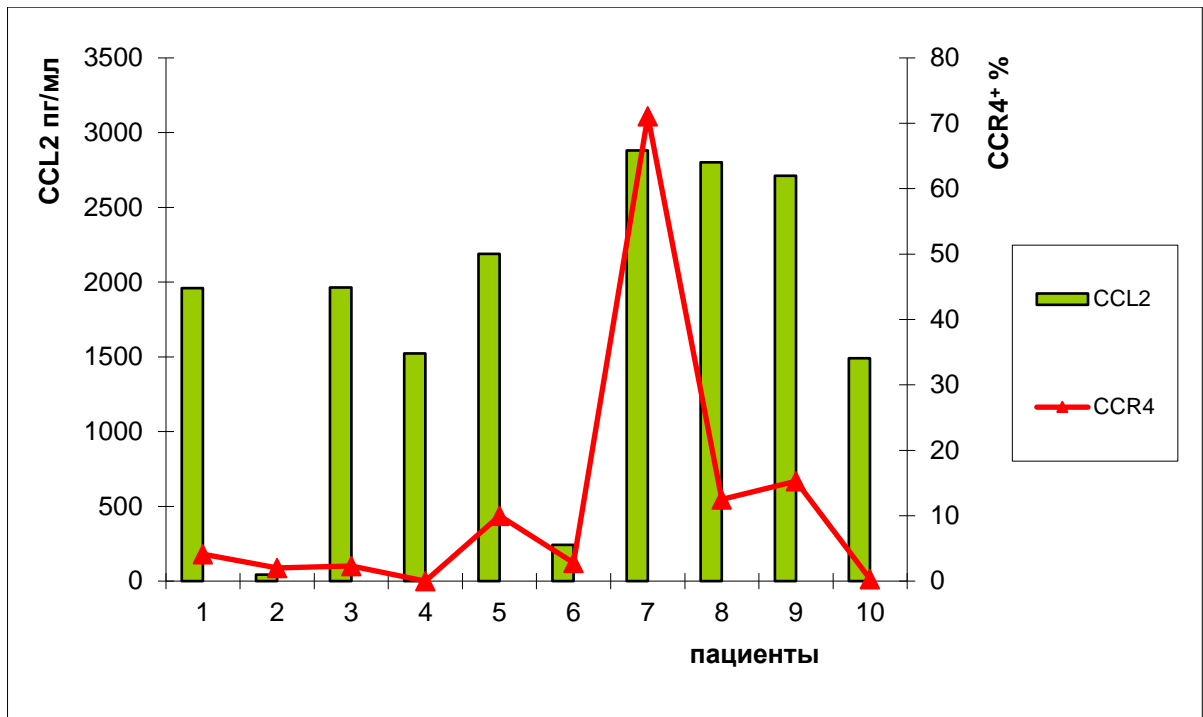


Рисунок 41. Графическое изображение зависимости продукции клетками СМТ хемокина CCL2 и экспрессии на Treg хемокинового рецептора CCR4 (CD194).

Таким образом можно сказать, что у больных метастатическими СМТ при ПЗ статистически значимо увеличивается количественное содержание CCR10<sup>+</sup>Treg ( $p=0,001$ ), CCR4<sup>+</sup>Treg ( $p=0,001$ ), Nrp1<sup>+</sup>Treg ( $p=0,021$ ). В группах больных липосаркомой ( $n=11$ ) и синовиальной саркомой ( $n=11$ ) установлены статистически значимые различия в содержании CCR10<sup>+</sup>Treg (9,5 % и 2,93%, соответственно,  $p=0,012$ ) и CCR4<sup>+</sup>Treg (68,3% и 3,95%, соответственно,  $p=0,007$ ). Выявлена прямая корреляция высокой силы между продукцией клетками метастатических СМТ VEGF, CCL2 и экспрессией на Treg Nrp1 ( $r=0,93$ ,  $p=0,001$ ), VEGFR-2 ( $r=0,88$ ,  $p=0,007$ ), CCR4 ( $r=0,81$ ,  $p=0,024$ ). Выявленные закономерности могут быть использованы для планирования дальнейших экспериментальных исследований, в том числе адьювантной и/или паллиативной иммунотерапии у некоторых категорий больных СМТ.

### 3.4.2 Обсуждение

Как известно, Treg играют центральную роль в обеспечении аутоотолерантности и поддержании иммунологического гомеостаза. При злокачественных новообразованиях их функционирование может способствовать опухолевой прогрессии, так как они оказывают супрессивное воздействие на противоопухолевые иммунные реакции [244, 254]. В нашем исследовании было обнаружено, что у больных СМТ до лечения наблюдается повышенное содержание Treg в периферической крови по сравнению с референсными значениями, предлагаемыми В.С. Хайдуковым и соавт. (2009) (min-max 4,5 – 10,2% и 1,65–5,75%



соответственно) [28]. При прогрессировании заболевания наблюдали тенденцию к увеличению этого показателя: медиана относительного содержания Treg в крови пациентов с ПЗ была равна 8,9% с ИКР 7,05-10,20%, тогда как у больных с СЗ медиана составила 8,75% (ИКР 6,80 – 9,37%).

Опухолевые клетки синтезируют целый спектр факторов, способствующих развитию индуцированной иммуносупрессии: в опухолевом микроокружении повышается концентрация хемоаттрактантов и ростовых факторов, создающих направленную миграцию к опухоли клеточных элементов иммунной системы [244]. Нами проведено сравнительное изучение продукции культивируемыми клетками СМТ хемокина CCL2, фактора VEGF и экспрессии на Treg периферической крови у этих же больных рецепторов, специфичных к данным молекулам. Мы исходили из предположения, что Treg, находящиеся в кровотоке, уже должны обладать необходимым рецепторным аппаратом, на который могут воздействовать опухолевые клетки, формируя направленную миграцию. В результате было обнаружено наличие прямой корреляции высокой силы при анализе систем взаимодействия CCR4/CCL2, VEGFR-2/VEGF, Nrp1<sup>+</sup> /VEGF. Были выявлены статистически значимые различия в процентном содержании Treg, экспрессирующих на своей поверхности CCR10 ( $p=0,001$ ), CCR4 ( $p=0,001$ ) и Nrp1<sup>+</sup> ( $p=0,021$ ) между группами больных с ПЗ и СЗ. Интересно, что в работе A. Overacre и соавт. (2014) была выдвинута идея о роли Nrp1 в стабилизации иммуносупрессивных свойств Treg как одном из механизмов поддержания опухолевого роста [197]. Показано, что выраженность экспрессии Nrp1 на Treg ассоциирована с их иммуносупрессивной активностью, но механизм этого феномена пока еще не совсем ясен [73]. Тем не менее, в настоящее время ряд исследователей рассматривает Nrp1 как маркер активации Treg и связывает уменьшение этого показателя в процессе химиотерапии с положительным эффектом лечения.

В исследовании L. Chen и соавт. (2014) была показана значимость CCR10 в пролиферации и инвазии злокачественных клеток глиобластомы [75]. В нашем исследовании относительное содержание CCR10<sup>+</sup>Treg увеличивалась при ПЗ, медиана распределения этого показателя составила 9,1% (ИКР 5,8 – 19,35%) по сравнению с 4,5% (ИКР 2,6 – 6,2,  $p=0,001$ ) при СЗ. Таким образом, можно предполагать, что увеличение экспрессии CCR10 на Treg у больных СМТ ассоциировано с диссеминацией опухолевого процесса. Повышенное количество опухоль-инфильтрирующих CCR4<sup>+</sup>Treg обнаруживается при лимфоме Ходжкина, метастатическом раке легкого и молочной железы, раке предстательной железы [72]. В экспериментальных исследованиях *in vitro* лимфомы Ходжкина блокада CCR4 моноклональными антителами, специфическими к этому рецептору, значительно подавляла миграцию Treg в опухоль [124]. Мы выявили статистически значимое ( $p=0,001$ ) увеличение количества CCR4<sup>+</sup>Treg в периферической крови больных СМТ при прогрессировании

заболевания: 10 % (4,0 – 51,25%) в сравнении с 3,3 % (1,95 – 4,5%) у пациентов со СЗ. Однако не было обнаружено значимых различий в экспрессии рецептора VEGFR-2 у больных с ПЗ и СЗ, в то время как наблюдалась корреляция между присутствием VEGFR-2 на поверхности Treg и продукцией VEGF опухолевыми клетками пациентов СМТ. Можно выдвинуть гипотезу, что злокачественные клетки используют несколько альтернативных механизмов привлечения Treg и при СМТ система взаимодействия Ngr1/VEGF является преобладающей для формирования их направленной миграции.

Интересно, что существуют явные количественные различия субпопуляций Treg при разных нозологических формах СМТ. Использование непараметрического критерия Краскела – Уоллиса и критерия Данна для множественного сравнения выборок позволило установить наличие статистически значимых различий в содержании CCR4<sup>+</sup>Treg и CCR10<sup>+</sup>Treg между группами больных липосаркомой и синовиальной саркомой. В случае липосарком экспрессия этих хемокиновых рецепторов была значительно более выражена. Можно предположить, что липосаркомы, и, в меньшей степени, лейомиосаркомы являются более иммунозависимыми. Мы зарегистрировали положительный клинический ответ на иммунотерапию аутологичными дендритными клетками у пациентов с липосаркомой, в том числе частичный регресс брюшинной опухоли у одного больного. При этом в периферической крови пациентов происходило снижение количества Treg с экспрессией поверхностных рецепторов CCR4, CCR10 и Ngr1 в процессе лечения и повышение их уровня перед прогрессированием заболевания.

Ранее было установлено, что клетки метастатических СМТ способны продуцировать высокие уровни хемокина CCL2, количество которого находится в прямой зависимости высокой силы от содержания в периферической крови больных CCR4<sup>+</sup>Treg. По данным литературы продукция CCL2 клетками опухоли носит неоднозначный характер, так как этот хемокин способен привлекать различные клетки иммунной системы: Treg, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), моноциты, макрофаги, что было отмечено для колоректального рака, рака эндометрия, метастатического рака молочной железы [149, 197]. В частности, для глиомы установлено, что злокачественные клетки синтезируют CCL2, который рекрутирует CCR4<sup>+</sup>Treg и CCR2<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup> миелоидными супрессорными клетками MDSC, создает условия локальной иммуносупрессии, способствует дальнейшей прогрессии опухоли [64]. В тоже время, опубликованы данные об увеличении общей выживаемости пациентов с глиомой и раком поджелудочной железы, которая ассоциирована с повышенной продукцией CCL2 опухолевыми клетками и привлечением в опухоль моноцитарных клеток и макрофагов с провоспалительным иммунофенотипом [64, 161].

Таким образом, у больных метастатическими СМТ обнаружена система направленной миграции Treg в опухолевое микроокружение, обеспечивающая создание опухолеиндуцированной толерантности, которая ассоциирована с ПЗ. Выявленные закономерности могут быть использованы для планирования дальнейших экспериментальных исследований, в том числе адъювантной и/или паллиативной иммунотерапии у некоторых категорий больных СМТ.

### 3.5. МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ПАНЕЛИ ОНКОМАРКЕРОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР БОЛЬНЫХ СМТ

#### 3.5.1. Результаты

В супернатантах, полученных при культивировании 23 культур сарком мягких тканей, определили концентрацию онкомаркеров. Четырнадцать культур СМТ исследовали на предмет секреции белков, входящих в панель №1 биологических маркеров злокачественных опухолей человека Bio-Plex Pro™ (Bio-Rad, США). Продукцию белков панели №2 человеческих онкомаркеров Bio-Plex Pro™ (Bio-Rad, США) оценили в 9 культурах СМТ. Была изучена секреция опухолевыми клетками биологически активных веществ, которые способны модулировать противоопухолевый иммунный ответ, или усиливая его, или способствуя иммуносупрессии.

Растворимый лиганд CD40 (sCD40L) играет важную роль в созревании дендритных клеток и способствует распознаванию опухолевых антигенов Т-лимфоцитами. В нашем исследовании медиана концентрации sCD40L составила 305,74 пг/мл (интерквартильный размах (ИКР) 196,87 - 316,29). Уровень секреции этого белка отдельными культурами СМТ представлен на рис. 42.

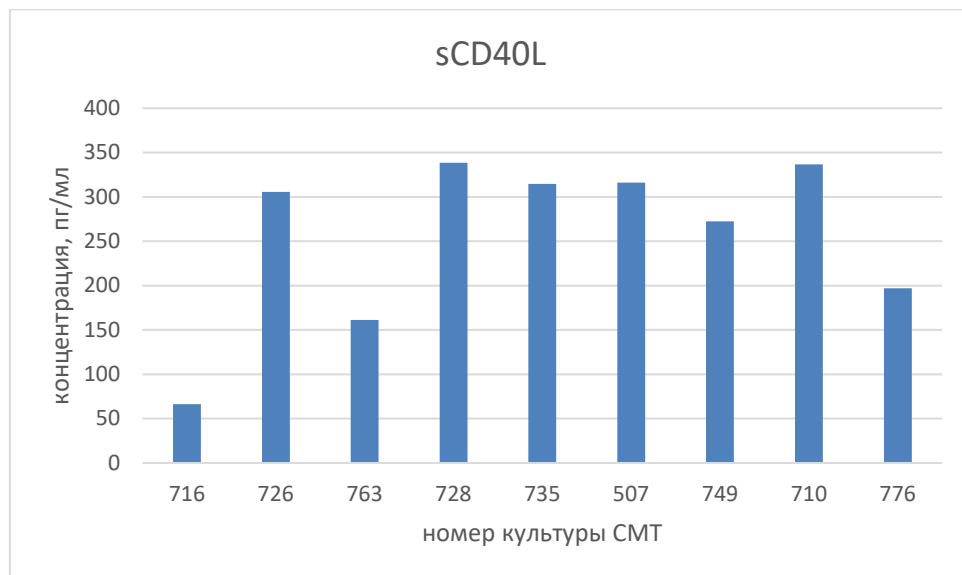


Рисунок 42. Концентрация sCD40L в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Все изученные нами культуры СМТ секретировали растворимый лиганд FAS (sFASL), способный взаимодействовать с FAS-рецептором на иммунокомпетентных клетках и вызывать их апоптоз. Медиана уровня sFASL в супернатантах клеточных культур СМТ была равна 148,98 пг/мл (ИКР 122,21 - 160,45). Концентрации sFASL в супернатантах культур отражены на рис. 43.

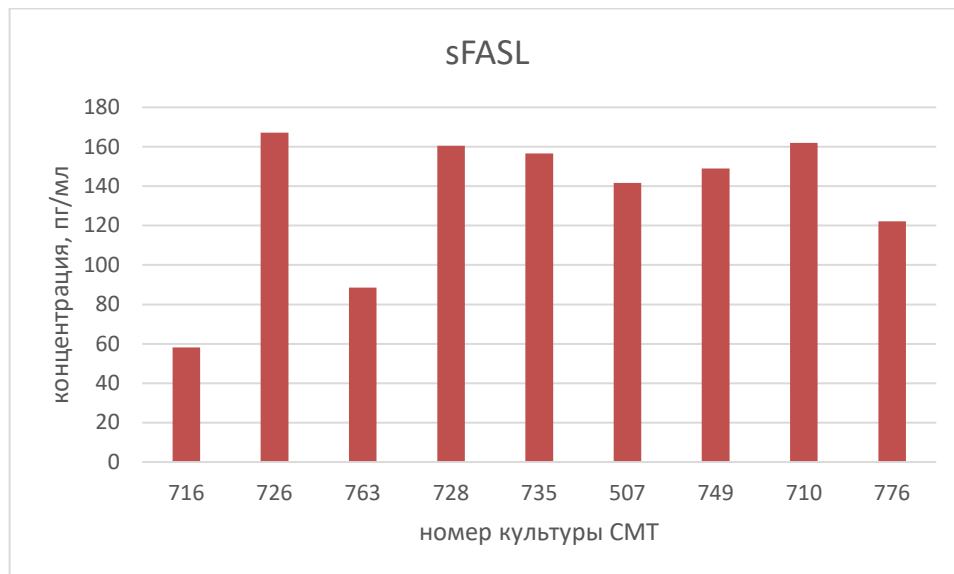


Рисунок 43. Концентрация sFASL в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Была проведена оценка секреция TNF- $\alpha$ , основного провоспалительного цитокина, воздействующего на различные фазы противоопухолевого иммунного ответа. Во всех супернатантах культур СМТ был обнаружен низкий уровень TNF- $\alpha$  (медиана 7,71 пг/мл, ИКР 6,88 - 8,41) (рис. 44).

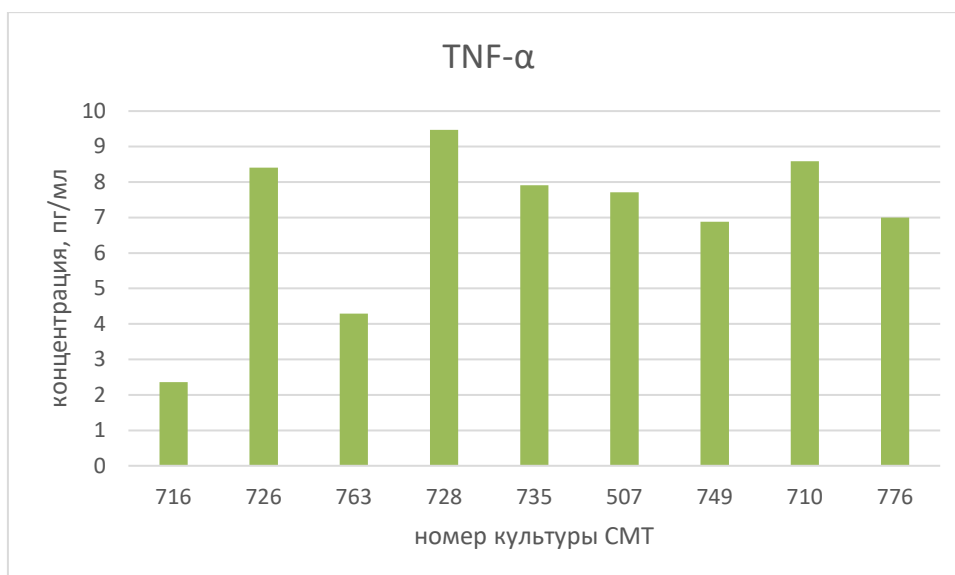


Рисунок 44. Концентрация TNF- $\alpha$  в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Также в настоящее время активно изучается роль фактора роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF) в модуляции иммунного окружения опухоли. В данном исследовании было показано, что культуры СМТ могут секретировать HGF в разных количествах: медиана

концентрации составила 282,40 пг/мл (ИКР 74,89 - 1744,87), при этом максимальный уровень этого анализита достигал 10551,21 пг/мл в культуре СМТ №782/1 (рис. 45).

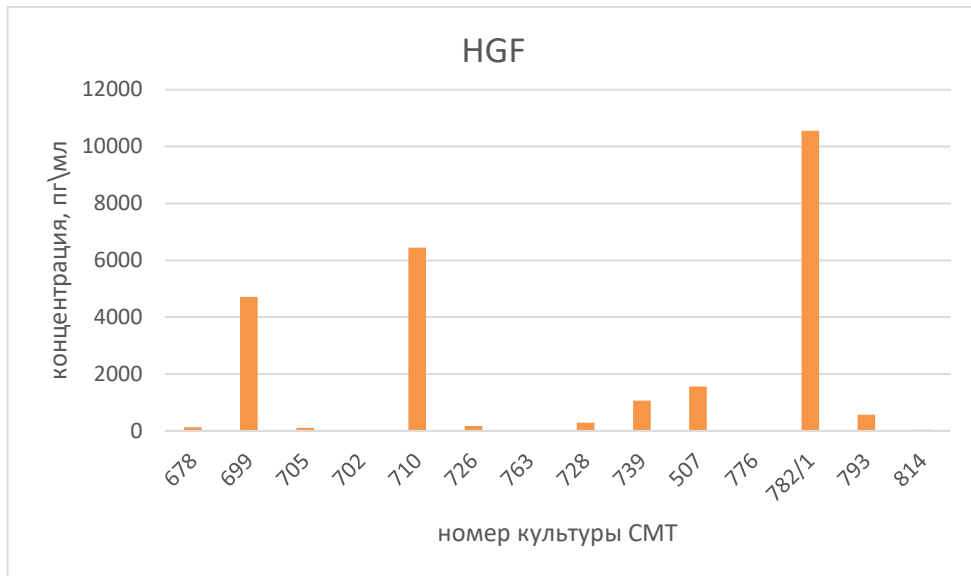


Рисунок 45. Концентрация HGF в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Кроме того, особый интерес представляют белки VEGF-A, PLGF и их растворимый рецептор sVEGFR-1, так как, помимо хорошо изученной роли в ангиогенезе, они влияют на иммунное микроокружение опухоли. Секреция VEGF-A была показана для всех изученных нами культур СМТ, медиана концентрации составила 3441,83 пг/мл (ИКР 1612,45 - 3550,64). При этом наблюдался существенный разброс полученных значений: минимальный уровень (28,37 пг/мл) был выявлен в супернатанте культуры СМТ №716, максимальное количество (8467,84 пг/мл) секретировалось культурой СМТ №728. На рис. 46 представлены концентрации VEGF-A, а также VEGF-C и VEGF-D, которые принимают участие в опухолевом лимфоангиогенезе.

Плацентарный ростовой фактор определялся в супернатантах всех культур СМТ, хотя его уровень был относительно низким (медиана 26,49 пг/мл, ИКР 21,43 - 41,33) (рис. 47).

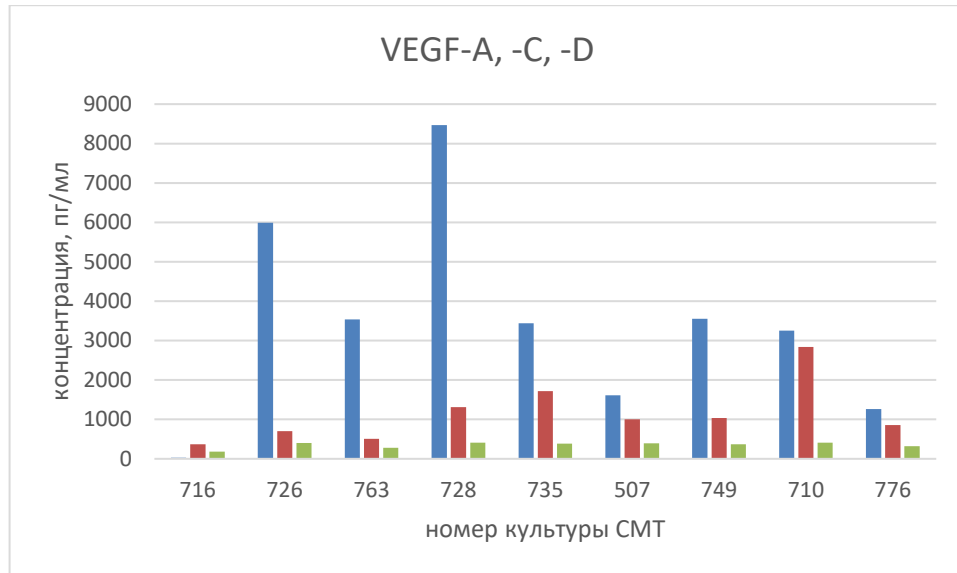


Рисунок 46. Концентрации VEGF-A, -C и -D в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

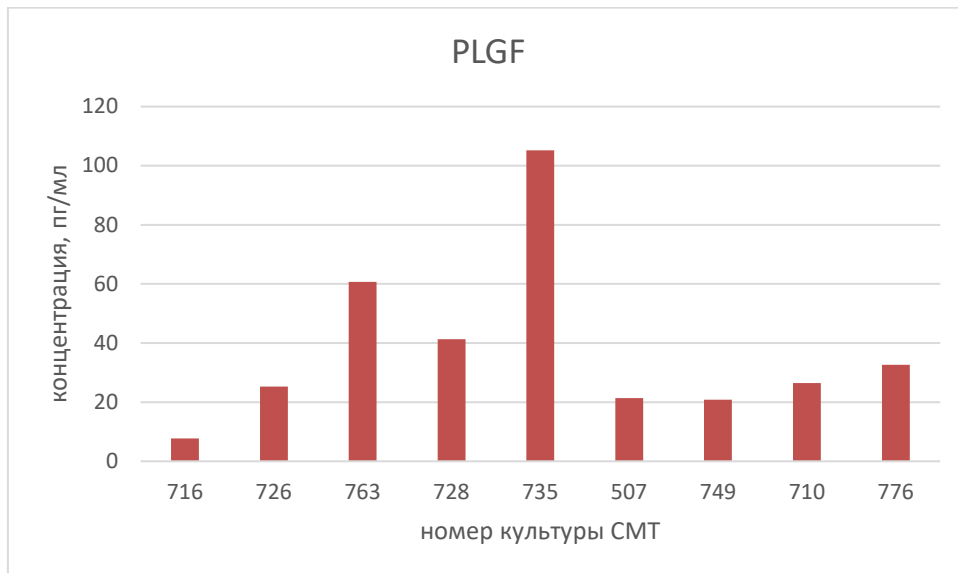


Рисунок 47. Концентрация PLGF в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Растворимый белок sVEGFR-1, способный связывать VEGF-A и PLGF и блокировать их эффекты, был обнаружен не во всех супернатантах СМТ. Медиана концентрации этого анализа составила 65,47 пг/мл (ИКР 5,08 - 225,27), максимальный уровень был равен 527,1 пг/мл (культура СМТ №710) (рис. 48).

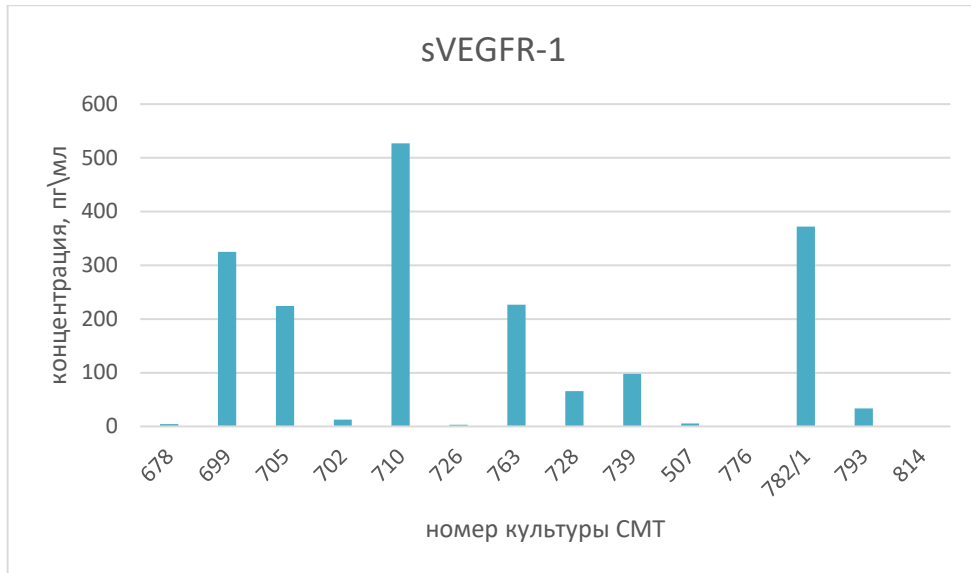


Рисунок 48. Концентрация sVEGFR-1 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Кроме того, был определен уровень секреции ангиогенного фактора ангиопоэтина-2, который может вносить вклад в регуляцию иммунного микроокружения опухоли. Однако практически все культуры СМТ не секретировали этот белок. Исключение составили образцы СМТ №716 и №763, которые представляли собой культуры опухолевых клеток, полученных в разное время от одного пациента. В супернатантах этих культур обнаружены высокие концентрации ангиопоэтина-2 (11,12 нг/мл и 2,83 нг/мл соответственно) (рис. 49).

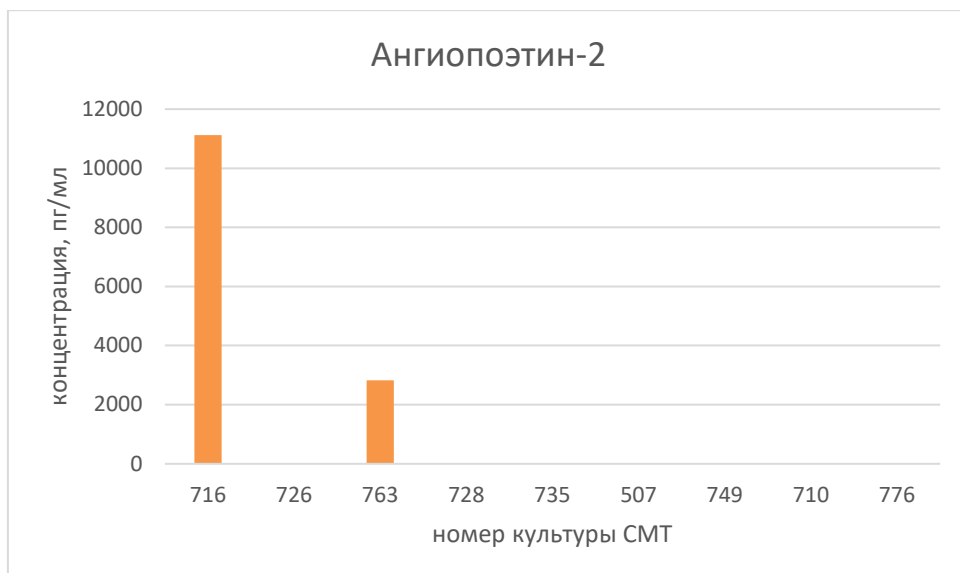


Рисунок 49. Концентрация ангиопоэтина-2 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).



Также была оценена секреция растворимого рецептора ангиопоэтина-2, TIE-2. Этот белок секретировали все культуры СМТ, медиана концентрации была равна 70,85 пг/мл (ИКР 45,99 - 256,59), полученные значения находились в диапазоне 565,57 - 16,96 пг/мл (рис. 50).

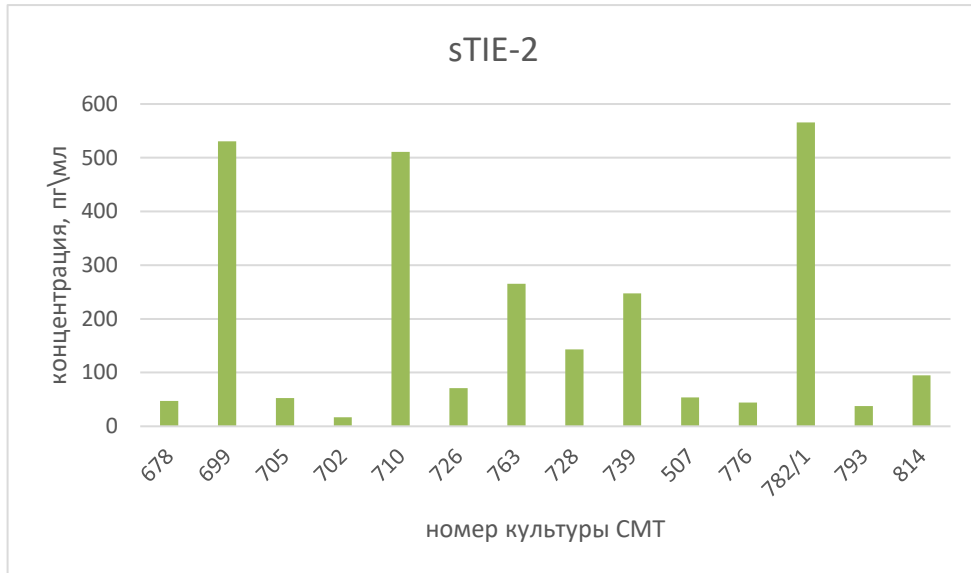


Рисунок 50. Концентрация sTIE-2 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Еще одним маркером, традиционно изучаемым в контексте опухолевого ангиогенеза, для которого показано иммуносупрессирующее действие, является PDGF-AB/BB. Медиана концентрации этого маркера составила 9,51 пг/мл (ИКР 5,39 - 40,60), диапазон полученных значений - от 0,9 до 92,48 пг/мл (рис. 51).

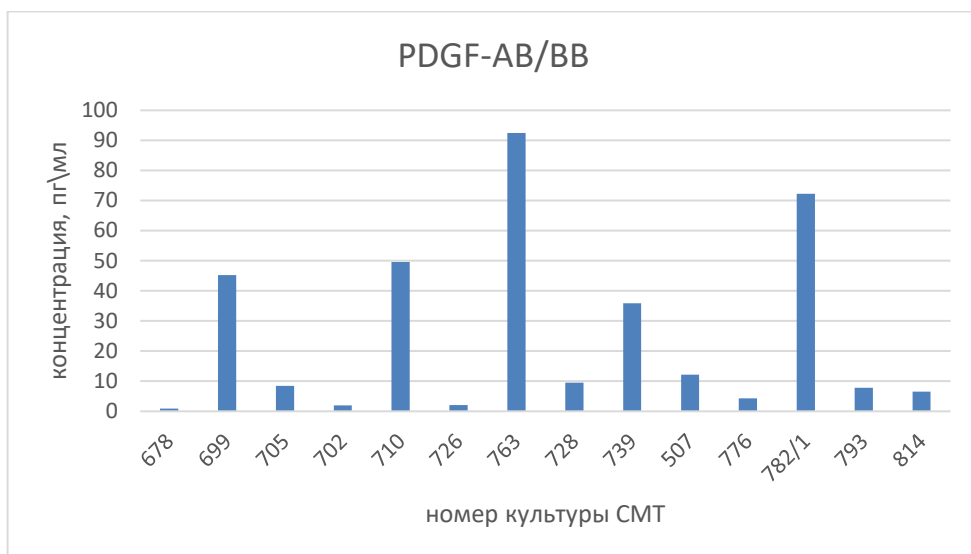


Рисунок 51. Концентрация PDGF-AB/BB в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Все изученные культуры СМТ секретировали IL-6 (медиана концентрации - 4288,29 пг/мл, ИКР 2587,9-5581,9), максимальное значение было показано для культуры СМТ №728 (9072,17 пг/мл). Однако для некоторых культур был характерен низкий уровень продукции IL-6 (СМТ №716 - 14,12 пг/мл, СМТ №763 - 57,43 пг/мл) (рис. 52). Для реализации ряда эффектов IL-6 необходимо присутствие растворимого рецептора IL-6 (sIL-6Ra). Секреция этого белка наблюдалась во всех культурах СМТ, включенных анализ, однако концентрация sIL-6Ra в супернатантах была невысокой (медиана 2,80 пг/мл, ИКР 1,78 - 8,49), как показано на рис. 53.

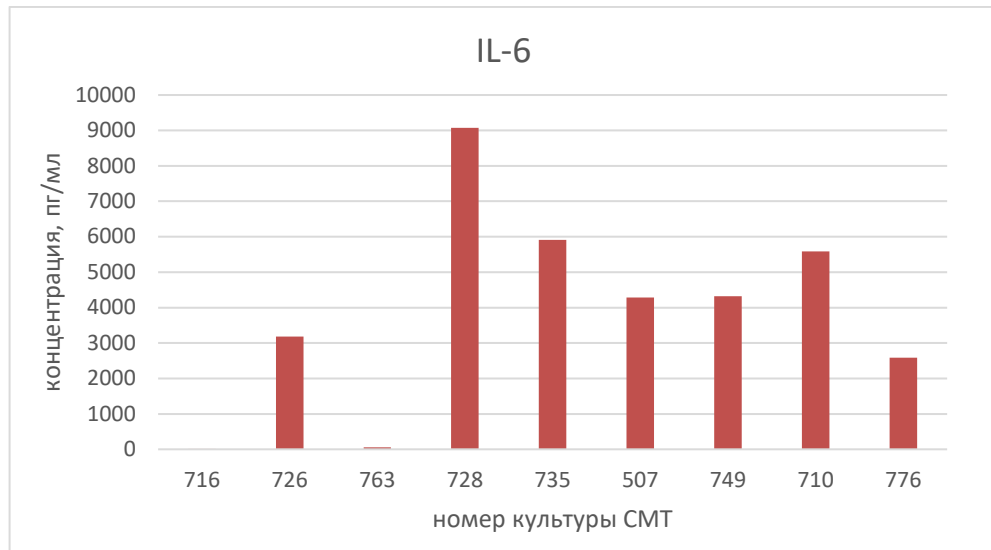


Рисунок 52. Концентрация IL-6 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

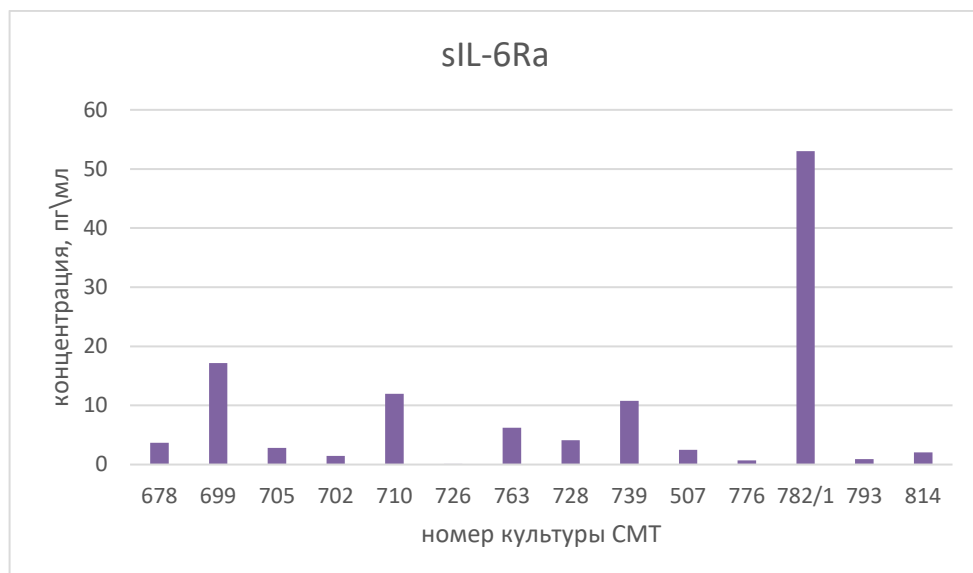


Рисунок 53. Концентрация sIL-6Ra в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Практически для всех изученных СМТ был характерен довольно высокий уровень секреции IL-8 (медиана 3158,15 пг/мл, ИКР 603,51 - 6936,72), однако выявлены культуры с

низкой секрецией этого цитокина (СМТ №716 - 2,81 пг/мл, СМТ №763 - 16,92 пг/мл) (рис. 54). Обнаружена секреция относительно низких уровней IL-18 всеми культурами СМТ с медианой концентрации 25,48 пг/мл (ИКР 22,98 - 28,86), при этом наименьшие значения определялись в супернатантах культур СМТ №716 и №763 (4,32 и 7,35 пг/мл соответственно) (рис. 55).

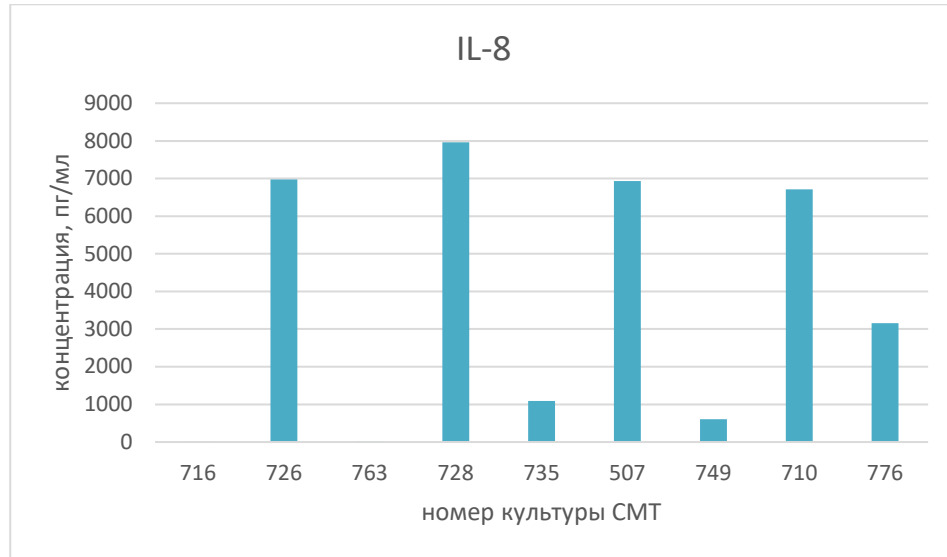


Рисунок 54. Концентрация IL-8 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

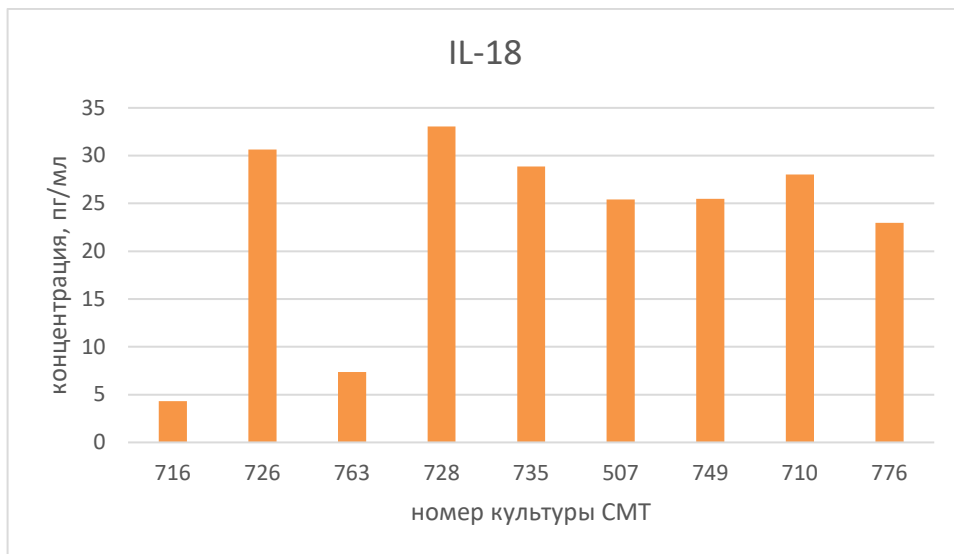


Рисунок 55. Концентрация IL-18 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Среди изученных онкомаркеров также можно выделить гормоны фоллистатин и лептин, которые оказывают выраженное воздействие на иммунный ответ.

Фоллистатин секретируют практически культуры СМТ, которые были получены в настоящем исследовании, за исключением культуры СМТ №699. Медиана концентрации фоллистатина составила 2293,58 пг/мл (ИКР 430,14 - 26135,46). Самый высокий уровень фоллистатина (123,7 нг/мл) обнаружен в культуре СМТ №710 пациента К., 26 лет, с

синовиальной саркомой. При этом в более ранней культуре опухолевых клеток, полученной от того же пациента (СМТ №507), концентрация этого гормона составляла 279,36 пг/мл. Следует отметить, что культура СМТ №710 получена из метастатического легочного очага, в то время как СМТ №507 – местный рецидив опухоли. Также высокий уровень фоллистатина обнаружен в культуре СМТ №728 пациента П. в возрасте 68 лет с диагнозом миксофибросаркома. Наблюдался рост концентрации по сравнению с культурой, ранее выделенной из новообразования этого пациента, в 19,79 раза (рис. 56).

Секрция лептина наблюдалась во всех изученных образцах (медиана 65,89 пг/мл, ИКР 34,74 - 258,60) с довольно выраженным разбросом полученных значений концентрации (от 5,75 до 2380,29 пг/мл). Максимальная концентрация лептина была выявлена в супернатанте культуры СМТ №793 (619,07 пг/мл) (рис. 57).



Рисунок 56. Концентрация фоллистатина в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).



Рисунок 57. Концентрация лептина в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Все изученные нами культуры СМТ продуцировали высокие уровни ингибитора активатора плазминогена-1 (РАI-1) с медианой концентрации 3471,31 пг/мл (ИКР 1999,25-4055,76) и диапазоном значений 439,19 - 6004,84 пг/мл (рис. 58).

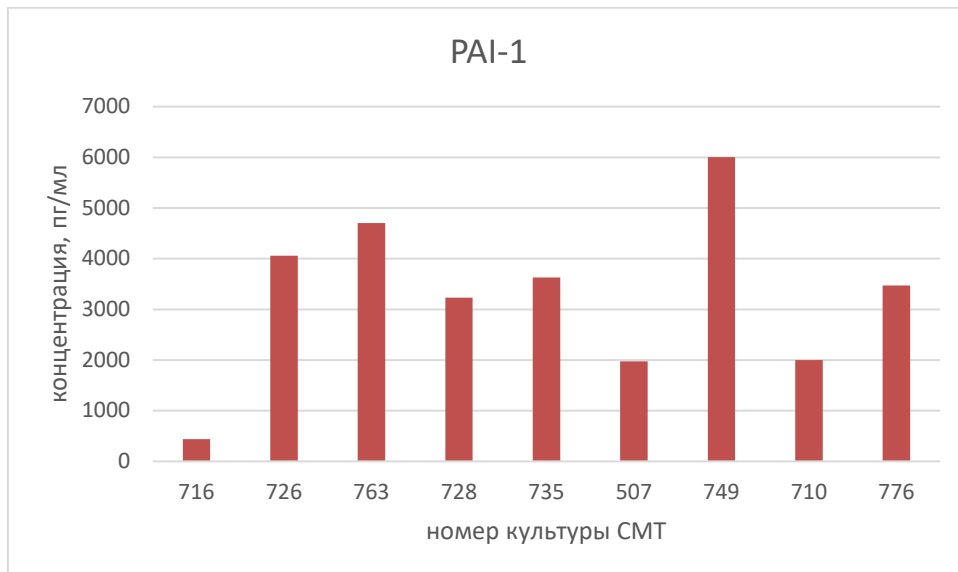


Рисунок 58. Концентрация РАI-1 в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Кроме того, была изучена секреция гемопоэтических ростовых факторов, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) и фактора стволовых клеток (stem cell factor, SCF).

G-CSF выявлен во всех изученных супернатантах СМТ, медиана концентрации составила 58,11 пг/мл (ИКР 29,25 - 357,45), при этом максимальное содержание G-CSF было

равно 8340,97 пг/мл, минимальное - 3,36 пг/мл (рис. 59). Всеми изученными культурами СМТ на более низком уровне секретировался SCF (медиана 15,84 пг/мл, ИКР 8,70 - 38,02) (рис. 60).

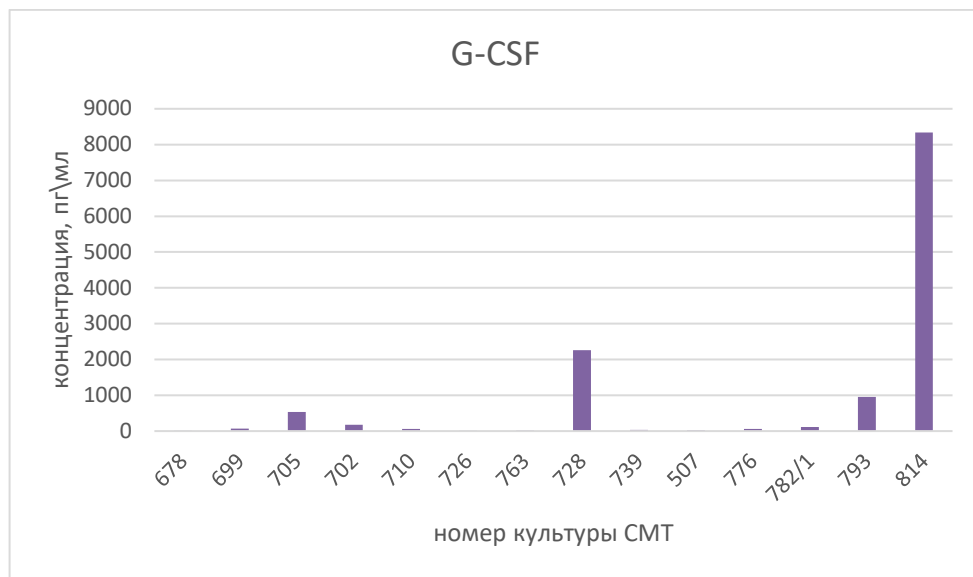


Рисунок 59. Концентрация G-CSF в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

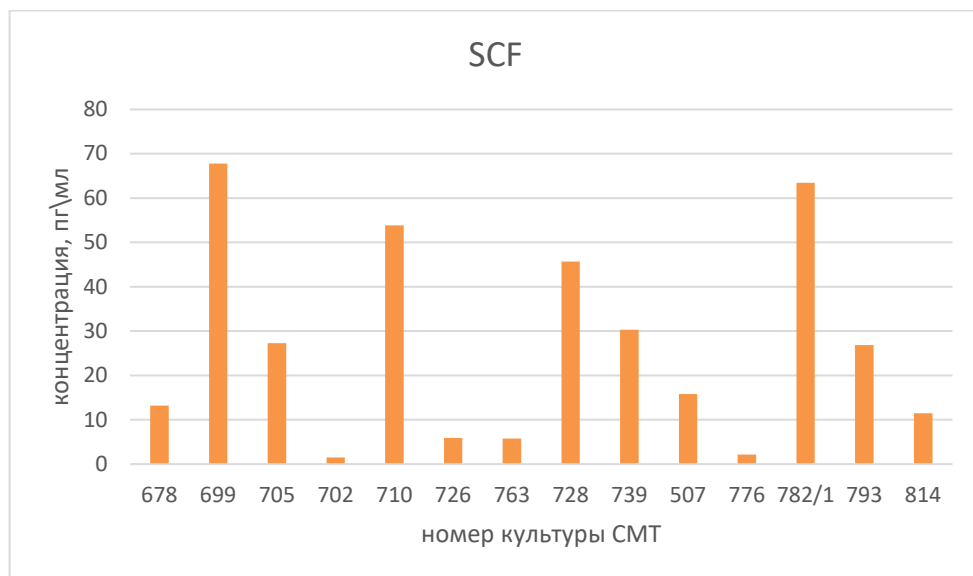


Рисунок 60. Концентрация SCF в супернатантах клеточных культур больных СМТ (пг/мл).

Был проведен корреляционный анализ для определения статистических связей между секрецией изученных онкомаркеров. Обнаружена сильная прямая корреляция (Spearman's  $\rho > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) между уровнем секреции ряда белков, входящих в панель биологических маркеров №1 (рис. 61). Так, концентрация sVEGFR-1 в супернатантах изученных нами клеточных культур СМТ коррелировала с содержанием sIL-6Ra, sHER2-neu, SCF, пролактина, PECAM-1 и PDGF-AB/BB. Уровень растворимого рецептора ангиопоэтина, sTIE-2, коррелировал с концентрацией sIL-6Ra, sHER2-neu, sEGFR, пролактина и PDGF-AB/BB.

Наблюдалась корреляция секреции клеточными культурами СМТ sIL-6Ra и sHER2-neu, sEGFR, SCF, пролактина и PDGF-AB/BB. С концентрацией HGF в супернатантах коррелировал уровень продукции SCF и PECAM-1.

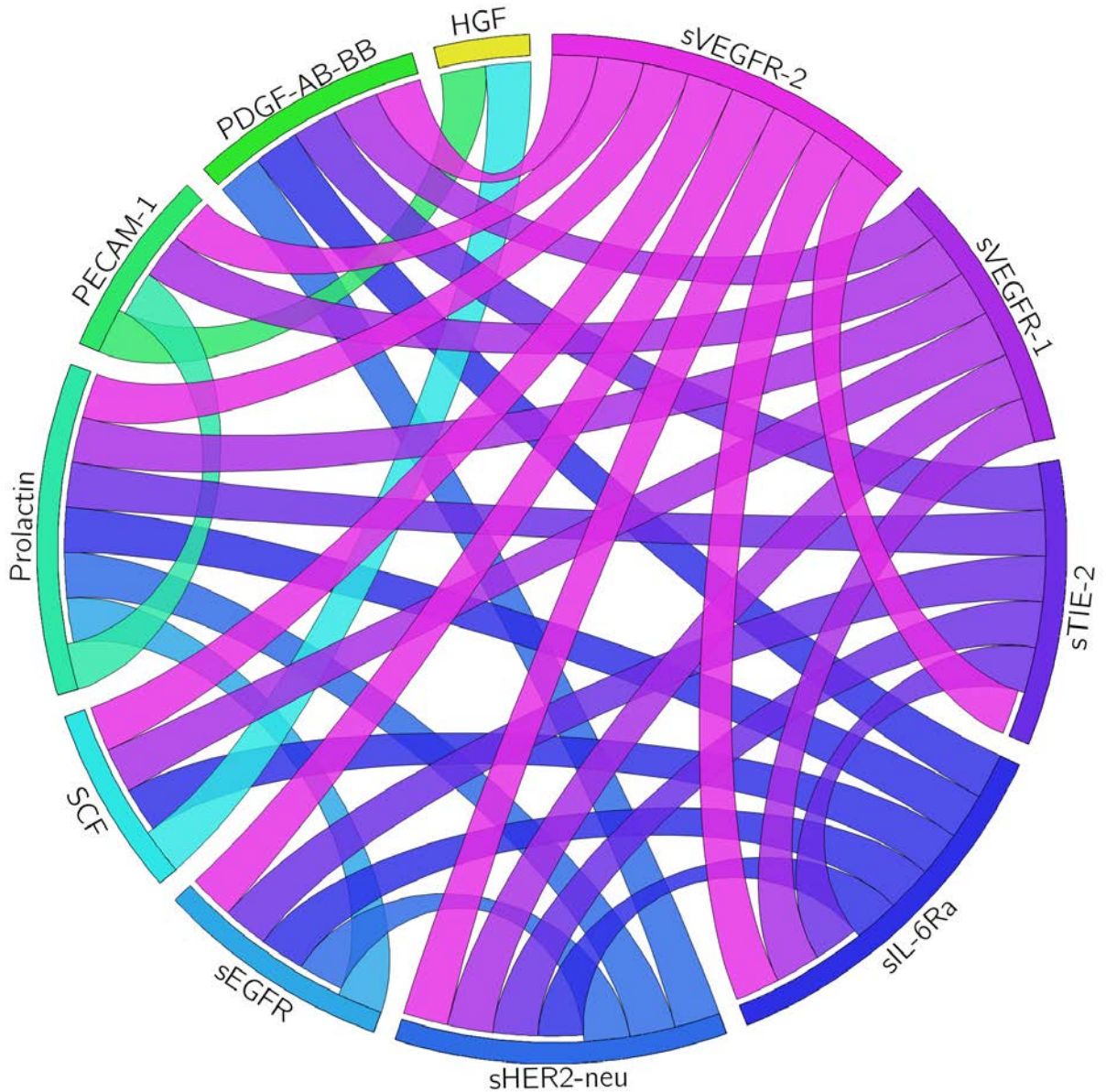


Рисунок 61. Корреляция между концентрациями онкомаркеров, входящих в панель 1, в супернатантах клеточных культур больных СМТ ( $\rho > 0,7$ ,  $p < 0,05$ ).

Также был выявлен ряд онкомаркеров, входящих в панель №2, для которых была характерна сильная прямая корреляция ( $\rho > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) (рис. 62). Среди них sFASL, секреция которого клетками культур СМТ была связана с продукцией sCD40L, VEGF-D, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-18, IGFBP-1, HB-EGF и эндоглина. Концентрация sCD40L также коррелировала с уровнем многих изученных биологических субстанций, среди которых VEGF-D и -C, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-18, HB-EGF и эндоглин. Продукция опухолевыми клетками VEGF-A была

связана с секрецией IL-18 и EGF. Концентрация TNF- $\alpha$  коррелировала с уровнем EGF, эндоглина, HB-EGF, IGFBP-1, IL-8, IL-6, IL-18, а также с уровнем TGF- $\alpha$ , помимо описанных выше биомаркеров. Наблюдалась корреляция между концентрациями IL-6 и IL-18, IL-8 и IL-18, однако уровни интерлейкинов IL-6 и IL-8 не были связаны.

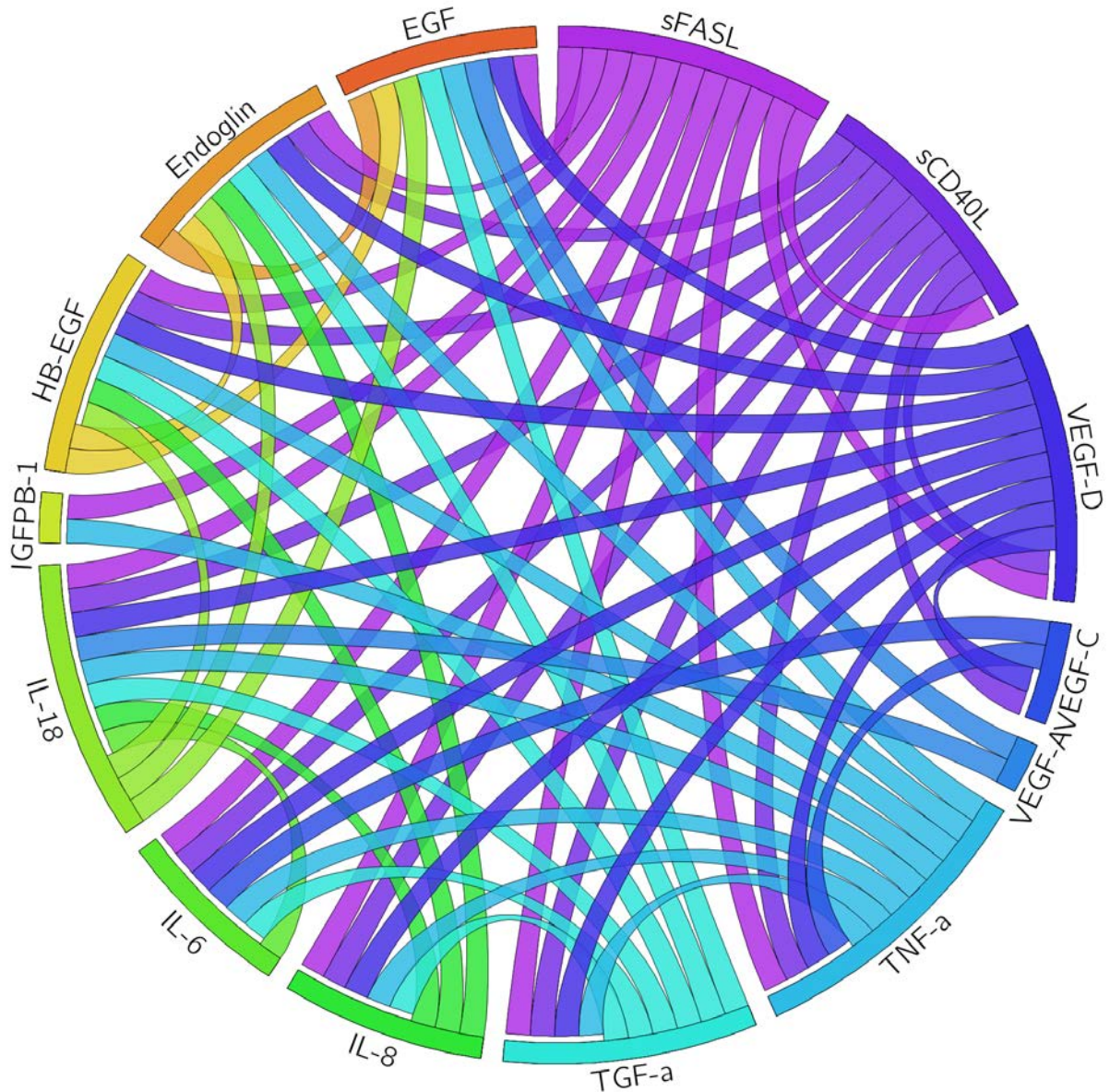


Рисунок 62. Корреляция между концентрациями онкомаркеров, входящих в панель 2, в супернатантах клеточных культур больных СМТ ( $\rho > 0,7$ ,  $p < 0,05$ ).

### 3.5.2. Обсуждение

Цитокины, ростовые факторы и гормоны в микроокружении опухоли играют важную роль в модуляции иммунного ответа. Описаны белки с выраженным противоопухолевым или иммуносупрессирующим эффектом, который опосредован их действием на иммунокомпетентные клетки. Однако большинство биологических субстанций способны



оказывать различное воздействие на противоопухолевый иммунный ответ в зависимости от клеток-мишеней в опухолевом микроокружении и комбинаций с другими биологически активными веществами. Изучение секретома<sup>1</sup> опухолевых клеток необходимо для выявления прогностических и предиктивных маркеров в иммунотерапии и химиотерапии злокачественных новообразований, а также для прогнозирования эффективности методов иммунотерапии.

Растворимая форма лиганда CD40 (sCD40L) в опухолевом микроокружении индуцирует секрецию ДК IL-12p70 и Th1-клеточный иммунный ответ [238], благодаря чему присутствие этого белка может усиливать эффективность ДК-вакцины. С другой стороны, sCD40L может способствовать подавлению противоопухолевого иммунного ответа, взаимодействуя CD40 на поверхности MDSC, вызывая секрецию иммуносупрессивных IL-10 и IL-6 и экспансию Treg, а также экспрессию PD-1 Т-лимфоцитами [42].

Пациенты с онкологическими заболеваниями демонстрируют более высокие уровни sCD40L в периферической крови по сравнению со здоровыми лицами [39]. Выявлена связь концентрации этого белка с прогрессированием при раке поджелудочной железы [42] и с неблагоприятным прогнозом при немелкоклеточном раке легких [183]. Однако sCD40L может продуцироваться не только опухолевыми клетками, но и активированными CD4+ Т-лимфоцитами и тромбоцитами [42]. В нашем исследовании уровень продукции sCD40L опухолью был различным (медиана 305,74 пг/мл, ИКР 196,87 - 316,29) Однако, по всей вероятности, он является достаточным для того, чтобы обеспечить локальные эффекты этого растворимого лиганда, которые могут как усилить действие ДК-вакцины, так и ослабить его. У 4 из 5 пациентов, чьи опухолевые клетки секретировали sCD40L в концентрациях, превышающих среднее значение, наблюдалось снижение иммунорегуляторного индекса (соотношения CD4+/CD8+ Т-лимфоцитов), что свидетельствует об активации адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Однако содержание ЦТЛ было повышено только у двоих больных: у одного выявлено снижение этого показателя. Вероятно, это связано с супрессирующим действием sCD40L или эффектами других факторов.

Секреция опухолевыми клетками растворимого лиганда FAS (sFASL) способствует защите от эффекторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих FASR, а также препятствует апоптозу FAS+ злокачественных клеток [179, 193]. Повышение уровня растворимого FASL часто наблюдается после химиотерапии, в результате чего опухолевые клетки достигают устойчивости к апоптозу [144]. Действие некоторых химиопрепаратов, таких как

---

<sup>1</sup> Секретом – глобальная группа белков, секретируемых в экстрацеллюлярное пространство клеткой, тканью, органом или организмом в произвольный момент времени и в произвольных условиях через известные и неизвестные секреторные механизмы, включающие нерегулируемые и регулируемые секреторные органеллы.

доксориубин, основано на активации FAS/FASL пути. Поэтому секреция sFASL может рассматриваться как один из механизмов резистентности к этому препарату [180].

В супернатанте культуры СМТ №507 выявлен относительно высокий уровень sFASL (141,72 пг/мл). Эта культура демонстрировала снижение чувствительности к эпирубицину (аналогу доксориубину) в исследовании с помощью Cell-IQ (максимальный цитотоксический эффект не достигал 20%). Несмотря на это, есть данные, что при некоторых опухолях высокий уровень sFASL в сыворотке может быть благоприятным прогностическим фактором [46], однако в настоящей работе таких закономерностей не выявлено.

Другой белок, TNF- $\alpha$ , демонстрирует как антиапоптотическую, так и проапоптотическую активность в зависимости от дозы [189]. Он может способствовать активации, выживанию и функционированию цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [266], но при длительном воздействии приводит к их истощению или элиминации [223]. Иммуносупрессирующий эффект TNF- $\alpha$  опосредован Treg [45, 74, 223] и MDSC [131].

В нашем исследовании в супернатантах культур СМТ концентрация TNF- $\alpha$  была крайне низкой (медиана 7,71 пг/мл, ИКР 6,88 - 8,41), в связи с этим отсутствие эффекта на усиление противоопухолевого иммунного ответа и эффективность ДК-вакцины было ожидаемым.

Гормон фоллистатин блокирует активин А, который подавляет секрецию цитокинов ДК. Показана способность фоллистатина усиливать пролиферацию и активность CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток при их культивировании с ДК [127, 216, 217]. Можно предположить, что этот гормон будет усиливать эффективность ДК-вакцины. Кроме того, активин А способствует развитию Treg [134] и иммуносупрессивных M2-макрофагов [127], а фоллистатин может блокировать эти эффекты.

Фоллистатин рассматривается как биомаркер или терапевтическая мишень при различных ЗНО, при синовиальной саркоме повышенная экспрессия этого гормона ассоциирована с резистентностью к пазопанибу [207]. В исследовании, проведенном А.Б. Даниловой и соавт. (2017) методом мультиплексного анализа в Научном отделе онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ им. Н. Н. Петрова», культуры СМТ характеризовались высокой продукцией фоллистатина (19,68 $\pm$ 2,34 нг/мл) [11]. В нашем исследовании в супернатантах большинства культур СМТ также показан высокий уровень этого гормона (медиана концентрации 2293,58 пг/мл, ИКР 430,14 - 26135,46). Отсутствие секреции выявлено для культуры СМТ №699 и относительно низкие концентрации определены в супернатантах культур СМТ №507 (279,36 пг/мл), №776 (114,49 пг/мл) и №793 (219,98 пг/мл). Самый высокий уровень фоллистатина (123709,87 пг/мл) обнаружен в культуре СМТ №710. При этом по сравнению с более ранней культурой, полученной от того же пациента (СМТ №507), наблюдался рост концентрации этого гормона в 442,83 раза. Следует отметить, что культура

СМТ №710 получена из метастатического очага, в то время как культура СМТ №507 – при местном рецидиве. Кроме того, высокий уровень фоллистатина выявлен в культуре №728, по сравнению с культурой, ранее выделенной из первичного новообразования этого пациента, концентрация этого гормона увеличилась 19,79 раза.

Пациенты, из опухоли которых были получены культуры с высоким уровнем продукции фоллистатина, демонстрировали клинический ответ на применение ДК-вакцины «CaTeVac». Можно предположить, что продукция данного гормона опухолью могла внести вклад в повышение эффективности активации адаптивного специфического противоопухолевого иммунного ответа ДК, нагруженными РТА, путем увеличения секреции цитокинов с противоопухолевым эффектом, в том числе, секреции IL-12p70.

Лептин, другой гормон, взаимодействует с рецептором на Т-лимфоцитах, способствуя их пролиферации, выживанию и усилению эффекторных функций [188, 199, 224]. Он стимулирует Th1 Т-клеточный иммунный ответ, воздействуя как на CD8+ ЦТЛ, так и на ДК [196, 206]. Кроме того, лептин подавляет развитие Treg [255], но может способствовать иммуносупрессии, повышая количество MDSC в опухоли [77]. Для разных ЗНО показано различное прогностическое значение содержания лептина, при СМТ уровень лептина коррелирует с высоким показателем выживаемости без отдаленных рецидивов [162].

В нашем исследовании изучение секреции лептина культурами СМТ выявило существенный разброс концентраций этого белка (от 5,75 до 2380,29 пг/мл), однако каких-либо взаимосвязей с параметрами иммунного статуса не было обнаружено.

Фактор роста гепатоцитов (HGF) также активно влияет на функционирование ДК и эффекторных клеток в микроокружении опухоли. Он способствует приобретению ДК толерогенного фенотипа [133, 137] и нарушению их функций [54], но также миграции некоторых типов ДК в лимфатические узлы [44].

В исследовании А.Б. Даниловой и соавт. (2017), проведенном методом мультиплексного анализа, культуры СМТ характеризовались высокой продукцией HGF ( $2633,07 \pm 134,05$  пг/мл) [11]. В нашей работе медиана секреции фактора роста гепатоцитов составила 282,40 пг/мл (ИКР 74,89 - 1744,87). Однако некоторые культуры СМТ продуцировали более высокие уровни этого белка (СМТ №699 - 4709,91 пг/мл, СМТ №710 - 6450,21 пг/мл, СМТ №782/1 - 10551,21 пг/мл). У пациентов, из образцов опухолей которых были получены культуры СМТ №710 и №782/1, наблюдалось снижение абсолютного и/или относительного содержания активированных Т-хелперов, экспрессирующих HLA-DR (СМТ №710 - 0,4% или  $0,01 \cdot 10^9$ /л, СМТ №782 - 3,7% или  $0,076 \cdot 10^9$ /л). При этом в иммунных статусах, соответствующих культурам СМТ №699 и №710, повышено относительное количество CD3+CD4+CD25+ клеток, а у одного пациента (СМТ

№699) выявлено увеличение Treg с фенотипом CD4+CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>low</sup>. Такие результаты могут быть следствием влияния HGF на ДК.

Было показано, что использование G-CSF для лечения нейтропении при ЗНО повышает уровень HGF в плазме [137]. В нашем исследовании корреляционный анализ не выявил связи между продукцией этих белков опухолевыми клетками ( $\rho=-0,032$ ,  $p=0,91$ ). Это может свидетельствовать о том, что продукция HGF под действием G-CSF осуществлялась не опухолью, а другими клетками организма, например, нейтрофилами.

На сегодняшний день доказана роль семейства факторов роста эндотелия сосудов в регуляции иммунного микроокружения опухоли. VEGF-A ингибирует созревание ДК и снижает их функциональную активность [88, 132]. Показано супрессирующее действие этого ростового фактора на Т-лимфоциты [156, 251, 264]. Кроме того, VEGF-A повышает содержание MDSC [185], способствует привлечению Treg в опухоль и их пролиферации [105, 124, 244].

В нашем исследовании только у двух пациентов, опухоли которых секретировали относительно высокие уровни VEGF-A (СМТ №763 – 3534,04 мг/мл и СМТ №726 – 5992,6 пг/мл), наблюдалось снижение относительных и/или абсолютных количеств ЦТЛ, при этом повышения содержания Treg выявлено не было.

Иммуномодулирующие свойства демонстрирует также плацентарный фактор роста (PLGF). Аналогично VEGF-A, он подавляет созревание ДК и их функции [88]. Кроме того, PLGF увеличивает содержание опухоли в иммуносупрессивных M2 макрофагов [86, 138]. Уровень этого белка коррелирует со стадией опухоли и инвазивным потенциалом, кроме того, наблюдается обратная корреляция с выживаемостью при различных солидных опухолях [86].

Ранее А.Б. Данилова и соавт. (2014) показали, что PLGF определяется в кондиционированных средах культур СМТ на уровне  $1883,42 \pm 188,43$  пг/мл [10]. Однако в настоящем исследовании его секреция клеточными культурами СМТ не превышала 105,25 пг/мл. В связи с невысоким уровнем продукции этого ростового фактора не выявлено его влияния на параметры иммунного статуса.

Более того, нами была изучена секреция клеточными культурами СМТ растворимого рецептора сосудистого фактора роста 1 (sVEGFR-1). Этот белок связывается с VEGF-A [30] и PLGF [86] и может блокировать их эффекты на иммунное микроокружение, например, снижая содержание Treg в опухоли [161]. В исследовании, проведенном К. Науано и соавт. (2015), у пациентов с СМТ уровень sVEGFR-1 в плазме крови коррелировал со степенью гетерогенности опухоли на компьютерной томограмме, связанной с неравномерным кровоснабжением [126].

В нашем исследовании благодаря относительно низким концентрациям sVEGFR-1 (медиана 65,47 пг/мл, ИКР 5,08 - 225,27) данный растворимый рецептор мог не оказать влияния на иммуномодулирующие эффекты VEGF-A и PLGF.

Еще одним ангиогенным ростовым фактором, для которого была показана способность модулировать иммунный ответ, является PDGF-AB/BB, который подавляет созревание ДК и повышает содержание Treg [31]. Показана экспрессия PDGF и его рецептора клетками различных опухолей, в том числе, СМТ [128].

Секреция PDGF-AB/BB культурами СМТ в нашей работе была низкой (медиана 9,51 пг/мл, ИКР 5,39 - 40,60), поэтому маловероятно, что PDGF-AB/BB мог оказывать выраженное влияние на противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с СМТ, включенных в исследование.

Более того, ангиопоэтин-2 также может влиять на иммунное микроокружение опухоли, привлекая в опухоль TIE-2+ моноциты [160]. В работе S. Yoop и соавт. (2006) у пациентов с первичной СМТ (n=108) средний уровень ангиопоэтина-2 в плазме был на 40% выше, чем в контроле, при этом концентрация данного белка коррелировала с размером опухоли, а наибольший уровень наблюдался при СМТ туловища [267]. А.Б. Даниловой и соавт. (2014) была показана секреция ангиопоэтина-2 культурами СМТ со значениями концентрации в диапазоне 72,5 до 1873,5 пг/мл [10].

В нашем исследовании клетки СМТ не секретировали ангиопоэтин-2, кроме культур, полученных от одного пациента (СМТ №716 и №763). Был зарегистрирован высокий уровень продукции (11,12 нг/мл и 2,83 нг/мл соответственно). У этого пациента с забрюшинной монофазной синовиальной саркомой высокой степени злокачественности наблюдалось прогрессирование заболевания. В иммунном статусе было выявлено снижение количества ЦТЛ и высокий иммунорегуляторный индекс, а применение ДК-вакцины «CaTeVac» было неэффективным. Однако маловероятно, что эти изменения были связаны с иммуномодулирующим эффектом ангиопоэтина-2. Скорее всего, быстрый рост высокозлокачественной опухоли, поддерживаемый соответствующим ангиогенезом, привел к истощению эффекторных иммунокомпетентных клеток.

Различные ЗНО, в том числе, СМТ, иногда секретируют ростовые факторы G-CSF [123, 186] и SCF [241]. Эти белки они участвуют в дифференцировке MDSC, оказывая влияние на иммунное микроокружение опухоли [227, 256].

Культуры СМТ в настоящей работе секретировали относительно низкие уровни G-CSF (медиана 58,11 пг/мл), однако выявлены культуры с высокой продукцией этого фактора (например, СМТ №728 и 814). Культура СМТ №728 (концентрация G-CSF - 2260,55 пг/мл) была получена после местного рецидива СМТ, по сравнению с более ранней культурой опухоли того же пациента продукция G-CSF повысилась в 289,07 раз, что свидетельствует о выживании более агрессивных клонов злокачественных клеток, эффективно стимулирующих свой рост. В иммунном статусе этого пациента наблюдалось снижение активированных Т-хелперов, что

может свидетельствовать о вкладе продукции G-CSF в это изменение посредством стимуляции MDSC.

Помимо ростовых факторов и гормонов опухолевые клетки способны продуцировать цитокины, которые активно влияют на антиген-специфический противоопухолевый иммунный ответ. IL-6 характеризуется различными эффектами в опухолевом микроокружении, для реализации которых необходимо присутствие растворимой субъединицы его рецептора, sIL-6Ra [101, 218]. Этот цитокин способствует дифференцировке миелоидных предшественников в иммуносупрессирующие OAM или MDSC [71, 101, 218], приобретению толерогенного фенотипа ДК [58]. Однако IL-6 участвует в дифференцировке, активации и пролиферации Т-клеток, в миграции ЦТЛ в лимфатические узлы и опухоль и повышает их активность [100, 101, 165].

Повышение сывороточной концентрации IL-6 наблюдается при различных ЗНО (рак молочной железы, легких, желудка, колоректальный рак и др.) и, несмотря на роль в противоопухолевом иммунном ответе, является отрицательным прогностическим фактором [165]. Высокий уровень экспрессии этого цитокина опухолевыми клетками коррелирует с распространенной стадией заболевания [71].

В нашем исследовании методом мультиплексного анализа был зарегистрирован высокий уровень секреции IL-6 культурами СМТ (медиана 4288,29 пг/мл, ИКР 2587,9 - 5581,9), при этом концентрация sIL-6Ra во всех супернатантах была минимальной (медиана 2,80 пг/мл, ИКР 1,78 - 8,49). В связи с низкой концентрацией растворимого рецептора как противоопухолевые, так и иммуносупрессивные эффекты IL-6 могут не проявляться.

Другой цитокин, IL-8, оказывает иммуносупрессирующее действие, привлекая в опухоль нейтрофилы, макрофаги и MDSC, что подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов [34, 82, 166].

Была показана продукция IL-8 различными опухолевыми клетками [82, 165, 166], при этом секрецию могли индуцировать гипоксия и химиотерапевтические препараты [260].

В нашем исследовании IL-8 секретировался клеточными культурами СМТ в больших количествах (медиана 3158,15 пг/мл, ИКР 603,51 - 6936,72).

Пациент П., чьи опухолевые клетки (культура СМТ №728) продуцировали наибольшее количество IL-6 (9072,17 пг/мл) и IL-8 (7957,75 пг/мл), демонстрировал снижение содержания активированных Т-хелперов с фенотипом CD3+CD4+HLA-DR+. Две культуры пациента М., полученные в разное время (СМТ №716 и №763), секретировали низкие уровни IL-6 (14,12 пг/мл и 57,43 пг/мл соответственно) и IL-8 (2,81 пг/мл и 16,92 пг/мл соответственно). У этого пациента зафиксировано повышение иммунорегуляторного индекса, что свидетельствует об угнетении эффективного адаптивного иммунного ответа. Однако для объяснения причин этого

явления следует оценивать в комплексе весь спектр цитокинов и ростовых факторов, продуцируемых как опухолью, так и ее микроокружением.

Выявлена роль еще одного изученного цитокина, IL-18, в Th1 T-клеточном противоопухолевом иммунном ответе [94, 192]. Однако для ее реализации необходимо присутствие IL-12 или IL-15 [95], без которых IL-18 демонстрирует провоспалительную активность [192], способствует развитию Th2-клеток [94, 95] и иммуносупрессирующих M2 макрофагов [151].

Показана связь IL-18 с опухолевой прогрессией и метастазированием, его сывороточная концентрация ассоциирована с распространенным заболеванием при раке легких, молочной железы, почки и др. [165].

В нашей работе секреция IL-18 культурами СМТ определялась на низком уровне, концентрация этого цитокина в супернатантах не превышала 33,05 пг/мл. L. Yao и соавт. (2011) показали, что резистентность клеточных линий рака молочной железы к доксорубину связана с секрецией IL-18, однако механизм до конца не ясен [265]. В нашем исследовании культура СМТ №763, демонстрировавшая очень низкий уровень IL-18 (7,35 пг/мл), была чувствительна к эпирубицину, аналогу доксорубина. При этом для культуры СМТ №507, которая секретировала немного больше этого цитокина (25,43 пг/мл), было показано снижение чувствительности к данному препарату. Таким образом, можно предположить, что IL-18 способен вносить вклад в резистентность СМТ к доксорубину и его аналогам.

Ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), продуцируемый злокачественными клетками, может оказывать иммуносупрессирующее действие, влияя на макрофаги в опухоли [117, 272].

Все изученные в настоящем исследовании культуры СМТ секретировали высокие уровни PAI-1 (медиана 3471,31 пг/мл). В ряде исследований уровень этого белка в крови и опухоли был связан с неблагоприятным клиническим прогнозом и плохим ответом на терапию [204, 240]. В работе M. Osmak и соавт. (1999) в супернатантах клеточных линий рака шейки матки, демонстрировавших резистентность к доксорубину, была выявлена повышенная концентрация PAI-1 [195]. Позже было показано, что внутриклеточный ингибитор активатора плазминогена-1 защищает опухолевые клетки от апоптоза, вызванного химиотерапевтическими препаратами, в том числе, доксорубином, ингибируя каспазу-3 [204].

В нашей работе культура СМТ №507 секретировала PAI-1 в количестве 1975,39 пг/мл, при этом цитолитический эффект эпирубицина был существенно снижен. Однако содержание этого белка в супернатанте культуры СМТ №763, которая демонстрировала чувствительность к эпирубицину, составляло 4704,27 пг/мл. Возможно, полученные результаты связаны с тем, что секреция PAI-1 не является свидетельством активности этого белка внутри клетки.

Также есть данные, что PAI-1 ограничивает расщепление мембранного FASL плазмином и снижает продукцию sFASL [204]. Однако в настоящем исследовании не было выявлено отрицательной корреляции между концентрацией PAI-1 и sFASL в супернатантах клеточных культур ( $\rho=0,183$ ;  $p>0,637$ ). Объяснением может служить отсутствие плазмينا в среде при культивировании клеток *in vitro*.

Таким образом, в нашей работе продемонстрирована сложная взаимосвязь опухолевых клеток, клеток иммунного микроокружения и продуцируемых ими биологически активных веществ и их роль в формировании иммунного ответа, а также в эффективности химиотерапии и иммунотерапии, в частности, применении ДК-вакцины собственного производства. Ряд факторов, секретируемых опухолью, может оказывать влияние на функции ДК. Растворимый лиганд CD40L, фоллистатин и лептин, а также IL-18 в комбинации с IL-12 или IL-15 способны повышать продукцию IL-12p70, необходимого для поляризации противоопухолевого иммунного ответа. HGF стимулирует миграцию ДК в лимфатические узлы, однако он может способствовать приобретению этими клетками толерогенного фенотипа. Такой же эффект оказывают VEGF-A, PDGF-AB/BB и IL-6. Также показано прямое воздействие опухоли посредством секреции различных молекул на эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, причем как стимулирующее (фоллистатин, лептин, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18 с IL-12/IL-15), так и супрессирующее (VEGF-A, sFASL, TNF- $\alpha$ ). Помимо этого, многие факторы опосредованно влияют на антиген-специфический противоопухолевый иммунный ответ, привлекая, активируя или подавляя различные иммунокомпетентные клетки. В связи с этим для понимания реализации эффекта ДК-вакцины при СМТ необходимо комплексное изучение взаимодействия цитокинов, ростовых факторов, гормонов и других соединений с клетками иммунного опухолевого микроокружения.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе произведен анализ отечественных и зарубежных достижений в лекарственном лечении метастатических СМТ. Установлено, что лекарственное лечение рецидивирующих и метастатических форм СМТ ограничено и не приводит к излечению. Общая выживаемость этой категории больных низкая и не превышает 12-18 мес.

Прогрессирование СМТ, формирование опухолевого микроокружения, взаимоотношение опухолевых клеток и клеток иммунной системы, эффекторных лимфоцитов, разрушающих опухоль, до настоящего времени остаются малоизученной. Более того, в настоящее время остаются неизученными возможности современной иммунотерапии (вакцинотерапии) в паллиативном, терапевтическом и адьювантном режимах лечения метастатических СМТ, которые показали свою эффективность в ранее проведенных экспериментальных и ограниченных клинических исследованиях. Несомненно, это вызвало научный интерес, определило цель и задачи настоящего исследования.

При выполнении исследования получено подтверждение сложного реципрокного взаимодействия опухолевых клеток, лимфоцитов, цитокинов, аутологичных дендритноклеточных вакцин (ДК-вакцин) в моделируемом микроокружении метастатических СМТ *in vitro* в экспериментальных аналитических системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence. Аналитические системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence позволили изучить взаимодействие опухолевых клеток и клеток микроокружения в режиме реального времени, определить роль биологических молекул в этих взаимодействиях, оценить чувствительность отдельных опухолевых образцов СМТ к химиотерапевтическим агентам и иммунотерапии.

Моделирование *in vitro* индивидуального опухолевого микроокружения у больных СМТ с использованием культур опухолевых клеток и МНК (лимфоциты, моноциты) периферической крови, полученных от пациентов, включенных в исследование, реалистично приближено к отражению межклеточного взаимодействия, протекающего *in vivo*. Это создает возможность апробации различных методов лечения в контролируемых условиях без вреда для пациента, что делает моделирование *in vitro* многообещающим высокотехнологичным методом лабораторной диагностики в подборе терапевтического лечения больных СМТ в повседневной клинической практике.

Обнаружены сложные связи в продукции опухолевыми клетками СМТ цитокинов, хемокинов, ростовых факторов при культивировании изолированных опухолевых клеточных культур *in vitro* в системе мультиплексного анализа Bioplex Pro 200. Изучение компонентов, взаимодействующих в экосистеме метастатической опухоли способствует открытию новых

горизонтов в поиске предикторов эффективности иммунотерапии и мишеней для таргетной терапии больных метастатическими СМТ.

Исследован рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) в зависимости от продукции опухолевыми клетками метастатических СМТ ростовых факторов и хемокинов в условиях *in vitro*. Обнаружена прямая корреляция высокой силы между продукцией VEGF и CCL2 клеточными культурами СМТ и экспрессией на Treg лимфоцитах рецепторов VEGFR-2, нейропиллина-1 и CCR4, что свидетельствует о наличии системы направленной миграции Treg лимфоцитов с супрессорным потенциалом в опухолевое микроокружение метастатических СМТ.

Изучена цитотоксическая и супрессорная активность основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных СМТ в зависимости от активности опухолевого процесса. Установлено статистически значимое снижение абсолютного количества НК-клеток при прогрессировании заболевания, при этом статистически значимых изменений абсолютного содержания цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов обнаружено не было. Обнаружено статистически значимое увеличение относительного содержания Treg, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR10 ( $p=0,001$ ), CCR4 ( $p=0,001$ ), и нейропиллин-1 ( $p=0,021$ ) при прогрессировании заболевания, которое косвенно свидетельствует о способности Treg мигрировать в опухолевое микроокружение в ответ на продукцию опухолевыми клетками СМТ соответствующих к ним лигандов. Разработаны индивидуальные экспериментальные модели опухолевого микроокружения СМТ для изучения взаимодействия клеток метастатической опухоли с клетками иммунной системы и РТА<sup>+</sup> ДК-вакциной собственного производства. Выявлено усиление эффекторной функции цитотоксических лимфоцитов в разрушении опухолевых клеток под воздействием аутологичной ДК-вакцины *in vitro*, что позволяет экстраполировать противоопухолевую активность ДК-вакцины *in vivo*.

Иммунотерапия ДК-вакциной собственного производства «CaTeVac» увеличила продолжительность жизни и снизила риск смерти в 2 раза у больных распространенными или метастатическими формами СМТ по сравнению с контрольной группой больных. Общая выживаемость (ОВ) в контрольной группе больных (1 гр. - только стандартное лечение) составила 25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес), против 34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес) во 2-й гр. пациентов с ДК-вакциной «CaTeVac» (Log-Rank  $p = 0,036$ , Breslow  $p = 0,006$ ). Отношение рисков (ОР) наступления смерти [ $\exp(B)$ ] в 1-й гр. пациентов, получавших только стандартную терапию, составило ОР=0,492 (95% ДИ 0,250-0,969) в регрессии Кокса. Пол и возраст не влияли на ОВ ( $p > 0,05$ ).

Зарегистрирован частичный регресс у одной больной с ангиосаркомой на фоне терапии ДК-вакциной «CaTeVac» продолжительностью 41 мес.+, и минимальный регресс на 26,6%.у

пациента с липосаркомой забрюшинного пространства в течении 12 мес. Стабилизация опухолевого процесса была достигнута в у 21 из 45 (47%) пациентов, прогрессирование у 23 (51%) больных после «второй» и более (до  $\geq 4$ ) линий лекарственного лечения.

Таким образом, на основании результатов моделирования опухолевого микроокружения СМТ, рецепторного статуса Treg, эффекторной функции лимфоцитов, изучения активности ДК-вакцины собственного производства «CaTeVac *in vitro* и *in vivo*, разработана высокотехнологичная лабораторная методика оценки резистентности и/или чувствительности к химиотерапии и иммунотерапии, адаптирована и внедрена в клиническую практику иммунотерапия аутологичной ДК-вакциной для лечения больных метастатическими СМТ во «второй» и последующих линиях лекарственной терапии в условиях НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова. Полученные результаты что позволяют перейти к рандомизированным клиническим исследованиям с целью подтверждения эквивалентности или превосходства иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» над другими вариантами системного лечения метастатических СМТ, так как разрабатываемый подход обладает лучшими показателями соотношения риска и пользы из существующих на сегодняшний день подходов во «второй» линии химиотерапевтического лечения этой нозологической формы злокачественного новообразования и в будущем может быть рассмотрен в качестве адъювантной терапии у больных СМТ с высоким риском прогрессирования заболевания.

## Выводы

1. Моделирование индивидуального опухолевого микроокружения у больных СМТ в системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence *in vitro* становится высокотехнологичным методом лабораторной диагностики определения резистентности к химиотерапии и чувствительности к иммунотерапии.
2. Посредством описательных статистик и корреляционного анализа продемонстрирована сложная взаимосвязь опухолевых клеток, клеток иммунного микроокружения СМТ, продуцируемых ими биологически активных веществ, что получило отражение в формировании иммунного ответа, эффективности химиотерапии и иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» собственного производства.
3. Выявлена прямая корреляция высокой силы между продукцией опухолевыми клетками метастатических СМТ *in vitro* сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, С-С хемокинового лиганда CCL2 и экспрессией на Т-регуляторных лимфоцитах периферической крови нейропилина-1 ( $r=0,93$ ,  $p=0,001$ ), рецептора сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGFR-2 ( $r=0,88$ ,  $p=0,007$ ), С-С хемокиновому рецептору CCR4 ( $r=0,81$ ,  $p=0,024$ ).

4. При прогрессировании опухолевого процесса у больных СМТ статистически значимо снижается абсолютное содержание натуральных киллеров ( $p=0,031$ ), увеличивается относительное число Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR10 ( $p=0,001$ ), CCR4 ( $p=0,001$ ), нейропилин-1 ( $p=0,021$ ) и отсутствуют статистически значимые изменения в абсолютном содержании цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов ( $p=0,511$ ).
5. Активация эффекторной функции лимфоцитов на фоне иммунотерапии дендритноклеточной вакциной собственного производства «CaTeVac» подтверждается снижением риска смерти в 2 раза у больных СМТ [ОР=0,492 (95% ДИ 0,250-0,969)] и увеличением общей выживаемости [34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес)] по сравнению с контрольной группой пациентов, которые не получали «CaTeVac» в качестве системного лечения [25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес)], log rank  $p=0,036$ .

### **Практические рекомендации**

1. Разработанная высокотехнологичная лабораторная методика оценки резистентности и чувствительности к химиотерапии и/или иммунотерапии в экспериментальной модели опухолевого микроокружения *in vitro* в системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence может использоваться для определения подходов индивидуализации лечения больных СМТ.
2. Анализ рецепторного статуса Treg лимфоцитов и цитотоксических эффекторных клеток периферической крови больных СМТ, определяемых с помощью проточной цитофлуориметрии, целесообразно проводить для оценки течения опухолевого процесса и определения эффективности проводимой иммунотерапии.
3. Результаты работы могут служить основанием для планирования рандомизированных проспективных клинических исследований с целью подтверждения эквивалентности или превосходства иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» над другими вариантами системного лечения метастатических СМТ, и изучения эффективности «CaTeVac» в адьювантом лечении больных СМТ в группах высокого риска прогрессирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакушина, Е.В. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с включением адоптивной иммунотерапии / Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, И.А. Пасова, Н.В. Селиванова // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Т. 1. – С. 45–50.
2. Акинфиева, О.В. НКТ-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа / О.В. Акинфиева, Л.Н. Бубнова, С.С. Бессмельцев // Онкогематология. – 2010. – Т. 4. – С. 39–47.
3. Балдуева, И.А. Дендритные клетки, активированные раково-тестикулярными антигенами (РТА+), в лечении метастатических сарком мягких тканей / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, А.В. Новик, Ю.И. Комаров, Т.Л. Нехаева, С.А. Проценко, А.И. Семенова, Н.П. Пипиа, Е.В. Воробейчиков, А.П. Карицкий, В.Ф. Климашевский, Е.Н. Имянитов, А.М. Беляев // Вопросы онкологии. – 2014. – Т. 60 – № 6. – С. 700–706.
4. Балдуева, И.А. Иммуноterapia рака: современное состояние проблемы / И.А. Балдуева, А.В. Новик, А.П. Карицкий, С.А. Кулева, Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, С.Л. Проценко, А.И. Семенова, Ю.И. Комаров, Н.П. Пипиа, Т.А. Славянская, Н.А. Авдонкина, С.В. Сальникова, А.М. Беляев, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16 – № 4. – С. 354–357.
5. Балдуева, И.А. Моделирование воздействия химиотерапевтических агентов на первичные культуры метастатических сарком мягких тканей в автоматизированной аналитической системе CELL-IQ / И.А. Балдуева, А.В. Новик, Г.И. Гафтон, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, Ю.И. Комаров, Т.А. Евдокимова // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62 – № 2. – С. 340–350.
6. Барышников, А.Ю. Вакциноterapia рака: от эксперимента к клинике / А.Ю. Барышников, Л.В. Демидов, И.Н. Михайлова, Н.Н. Петенко // Вестник Российской Академии Медицинских наук. – 2007. – Т. 10 – С. 46–48.
7. Гафтон, Г.И. Перспективные методы терапии больных саркомами мягких тканей конечности (изолированная регионарная перфузия, локальная гипертермия) / Г.И.

- Гафтон, Н.Р. Пхакадзе, К.Ю. Сенчик, В.М. Гельфонд // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5 – № 4. – С. 276–284.
8. Горбунова, В.А. Новые подходы в лекарственном лечении сарком мягких тканей / В.А. Горбунова // Поволжский онкологический вестник. – 2012. – № 2. – С. 25–34.
  9. Горбунова, Т.В. Клиническое значение анализа субпопуляций лимфоцитов костного мозга при рабдомиосаркоме и опухолях семейства саркомы Юинга у детей / Т.В. Горбунова, В.Г. Поляков, Н.Н. Тупицын, И.Н. Серебрякова, В.В. Тимошенко, Т.В. Шведова // Онкопедиатрия. – 2014. – № 2. – С. 27–36.
  10. Данилова, А.Б. Исследование продукции факторов ангиогенеза клетками солидных опухолей человека, культивируемых для приготовления противоопухолевых вакцин / А.Б. Данилова, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева // Вопросы онкологии. – 2014. – Т. 60. – № 6. – С. 728–735.
  11. Данилова, А.Б. Прогностическое значение экспрессии опухолеассоциированных антигенов и иммуносупрессивных факторов клетками солидных опухолей при проведении противоопухолевой вакцинотерапии / А.Б. Данилова, И.А. Балдуева, А.В. Новик, Т.Л. Нехаева, А.И. Кузнецова, Н.П. Пипиа, Н.В. Емельянова, О.А. Галлиулина // Тезис и доклад на III Петербургский онкологический форум «Белые ночи». – 2017. – С. 194.
  12. Егоренков, В.В. Изолированная гипертермическая химиоперфузия в лечении опухолей различных локализаций / В.В. Егоренков // Практическая онкология. – 2015. – Т. 16 – № 4. – С. 157–161.
  13. Кадагидзе, З.Г. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, А.А. Борунова, Е.Г. Славина // Иммуноонкология. – 2014. – Т. 2. – С. 64–67.
  14. Кадагидзе, З.Г. Новые возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Е.Г. Славина, А.А. Борунова // Злокачественные опухоли. – 2015. – Т. 1. – № 12. – С. 24–30.
  15. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова; под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – 236 с.
  16. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова; под ред. А.Д. Каприна,

- В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2018. – 250 с.
17. Комаров, Ю.И. Вакцина на основе аутологичных дендритных клеток в лечении хондросарком: клинический случай / Ю.И. Комаров, А.И. Семенова, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, Д.Х. Латипова, С.А. Проценко // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2012. – № 2. – С. 51–52.
  18. Комаров, Ю.И. Оценка роли экспрессии раково-тестикулярных антигенов в саркомах мягких тканей для прогноза течения заболевания и эффективности терапии: дис. ... канд. мед. наук : – 14.01.12; 14.03.09 / Комаров Юрий Игоревич – СПб, 2014. – 119 с.
  19. Кудрявцев, И.В. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции / И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, И.И. Кробинец, А.А. Савченко, М.К. Серебрякова, А.А. Тотолян // Medical Immunology (Russia). – 2016. – Т 18 – № 3 – С. 239–250.
  20. Мацко, Д.Е. Современные представления о морфологической классификации сарком мягких тканей и их практической значении / Д.Е. Мацко // Практическая онкология. – 2013. – Т. 14. – № 2. – С. 77–86.
  21. Мисюрин, В.А. Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза / В.А. Мисюрин // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 2. – № 14. – С. 23–30.
  22. Михайлова, И.Н. Внутрикожная клеточная реакция на фоне вакцинотерапии меланомы кожи / И.Н. Михайлова, П.В. Иванов, Н.Н. Петенко // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 1. – С. 63–67.
  23. Пипиа, Н.П. Изучение мишеней опухолевого микроокружения сарком мягких тканей – путь к персонализированной медицине / Н.П. Пипиа, И.А. Балдуева // Тезис и доклад на II Петербургский онкологический форум «Белые ночи». – 2016.
  24. Пономарев, А.В. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика / А.В. Пономарев // Иммунология. – 2016. – Т. 37. – № 1. – С. 47–50.
  25. Ризниченко, Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии / Г.Ю. Ризниченко. – Изд-во РХД – М., Ижевск, 2011. – 560 с.
  26. Феденко, А.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению саркомы мягких тканей / А.А. Феденко, А.Ю. Бохан, В.А. Горбунова, А.Н. Махсон, В.В. Тепляков. – 2017. – Т. 7. – С. 216–224.
  27. Фрейдлин, И.С. Регуляторные Т клетки: происхождение и функции / И.С. Фрейдлин // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7. – № 4. – С. 347–354.

28. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови и их нормальные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // *Медицинская иммунология*. – 2009. – Т. 11. – № 2–3. – С. 227–238.
29. Шелехова, К.В. Изменения в классификации ВОЗ опухолей мягких тканей / К.В. Шелехова // *Архив патологии*. – 2015. – Т. 1. – С. 48–54.
30. Abou-Fayçal, C. Splice Variants of the RTK Family: Their Role in Tumour Progression and Response to Targeted Therapy / C. Abou-Fayçal, A.-S. Hatat, S. Gazzeri, B. Eymin // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – № 2. – P. 383. DOI: 10.3390%2Fijms18020383.
31. Agrawal, S. PDGF upregulates CLEC-2 to induce T regulatory cells / S. Agrawal, S. Ganguly, P. Hajian, J.-N. Cao, A. Agrawal // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 30. – P. 28621–28632.
32. Ahmed, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) –Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma / N. Ahmed, V.S. Brawley, M. Hegde, C. Robertson, A. Ghazi, C. Gerken, E. Liu, O. Dakhova, A. Ashoori, A. Corder, T. Gray, M.-F. Wu, H. Liu, J. Hicks, N. Rainusso, G. Dotti, Z. Mei, B. Grilley, A. Gee, C.M. Rooney, M.K. Brenner, H.E. Heslop, W.S. Wels, L.L. Wang, P. Anderson, S. Gottschalk // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33. – № 15. – P. 1688–1696.
33. Albini, A. Contribution to Tumor Angiogenesis From innate immune Cells within the Tumor Microenvironment : implications for immunotherapy / A. Albini, A. Bruno, D.M. Noonan, L. Mortara // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P.527. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00527.
34. Alfaro, C. Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) / C. Alfaro, A. Teixeira, C. Oñate, G. Perez, M.F. Sanmamed, M.P. Andueza, D. Alignani, S. Labiano, A. Azpilikueta, A. Rodriguez-Paulete, S. Garasa, J.P. Fusco, A. Aznar, S. Inoges, M. De Pizzol, M. Allegretti, J. Medina-Echeverz, P. Berraondo, J.L. Perez-Gracia, I. Melero // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – № 15. – P. 3924–3936.
35. Ali Osman, K. Efficacy and Toxicity of Gemcitabine Plus Docetaxel Combination as a Second Line Therapy for Patients with Advanced Stage Soft Tissue Sarcoma / K. Ali Osman, B. Suleyman, O. Metin, A. Necati, S. Alper, O. Nuriye Yildirim, A. Suleyman, E. Onur, B. Veli, C. Celalettin, U. Arife, C. Ugur, B. Mustafa, A.O. Kaya, S. Buyukberber, M. Ozkan, N. Alkis, A. Sevinc, N.Y. Ozdemir, S. Alici, O. Esbah, V. Berk, C. Camci, A. Ulas, U. Coskun,



- M. Benekli // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2012. – Vol. 13. – № 2. – P. 463–467.
36. Aliper, A.M. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers / A.M. Aliper, V.P. Frieden-Korovkina, A. Buzdin, S.A. Roumiantsev, A. Zhavoronkov // *Cancer Medicine*. – 2014. – Vol. 3. – № 4. – P. 737–746.
37. Anderson, P.M. Immune therapy for sarcomas / P.M. Anderson // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 995. – P. 127–140.
38. Andrews, L.P. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target / L.P. Andrews, A.E. Marciscano, C.G. Drake, D.A.A. Vignali // *Immunological Reviews*. – 2017. – Vol. 276. – № 1. – P. 80–96.
39. Angelou, A. The Role of Soluble CD40L Ligand in Human Carcinogenesis. / A. Angelou, E. Antoniou, N. Garmpis, C. Damaskos, S. Theocharis, G.-A. Margonis // *Anticancer research*. – 2018. – Vol. 38. – № 5. – P. 3199–3201.
40. Asano, N. Metastatic patterns of myxoid/round cell liposarcoma: A review of a 25-year experience / N. Asano, M. Susa, S. Hosaka, R. Nakayama, E. Kobayashi, K. Takeuchi, K. Horiuchi, Y. Suzuki, U. Anazawa, M. Mukai, Y. Toyama, H. Yabe, H. Morioka // *Sarcoma*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–6. DOI: 10.1155/2F2012/2F345161.
41. Ayyoub, M. The frequent expression of cancer/testis antigens provides opportunities for immunotherapeutic targeting of sarcoma / M. Ayyoub, R.N. Taub, M.L. Keohan, M. Hesdorffer, G. Metthez, L. Memeo, M. Mansukhani, H. Hibshoosh, C.S. Hesdorffer, D. Valmori // *Cancer Immun.* – 2004. – Vol. 4. – P. 7. Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/canimarch/4/1/7>.
42. Azzariti, A. Potential predictive role of chemotherapy-induced changes of soluble CD40 ligand in untreated advanced pancreatic ductal adenocarcinoma / A. Azzariti, O. Brunetti, L. Porcelli, G. Graziano, R.M. Iacobazzi, M. Signorelli, A. Scarpa, V. Lorusso, N. Silvestris // *OncoTargets and Therapy*. – 2016. – Vol. 9. – P. 4681–4686.
43. Badalamenti, G. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? / G. Badalamenti, D. Fanale, L. Incorvaia, N. Barraco, A. Listì, R. Maragliano, B. Vincenzi, V. Calò, J.L. Iovanna, V. Bazan, A. Russo // *Cellular Immunology*. – 2018. – Vol. S0008-8749. – № 18. – P. 30014– 30015.
44. Baek, J.-H. The HGF Receptor/Met Tyrosine Kinase Is a Key Regulator of Dendritic Cell Migration in Skin Immunity / J.-H. Baek, C. Birchmeier, M. Zenke, T. Hieronymus // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 189. – № 4. – P. 1699–1707.
45. Baeyens, A. Effector T Cells Boost Regulatory T Cell Expansion by IL-2, TNF, OX40, and Plasmacytoid Dendritic Cells Depending on the Immune Context / A. Baeyens, D. Saadoun,

- F. Billiard, A. Rouers, S. Grégoire, B. Zaragoza, Y. Grinberg-Bleyer, G. Marodon, E. Piaggio, B.L. Salomon // *The Journal of Immunology*. – 2015. – Vol. 194. – № 3. – P. 999–1010.
46. Bahria-Sediki, I. Ben Prognostic Value of Soluble Death Receptor Ligands in Patients with Transitional Cell Carcinoma of Bladder / I. Ben Bahria-Sediki, M. Chebil, C. Sampaio, V. Martel-Frchet, M. Cherif, R. Zermani, S. Rammeh, A. Ben Ammar Gaaied, A. Bettaieb // *Urol Int*. – 2018. – Vol. 100. – № 4. – P. 476–484.
  47. Balachandran, V.P. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido / V.P. Balachandran, M.J. Cavnar, S. Zeng, Z.M. Bamboat, L.M. Ocuin, H. Obaid, E.C. Sorenson, R. Popow, C. Ariyan, F. Rossi, P. Besmer, T. Guo, C.R. Antonescu, T. Taguchi, J. Yuan, J.D. Wolchok, J.P. Allison, R.P. Dematteo // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17. – № 9. – P. 1094–1100.
  48. Balch, C.M. Patterns of Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes in 120 Human Cancers / C.M. Balch, L.B. Riley, Y.J. Bae, M.A. Salmeron, C.D. Platsoucas, A. Von Eschenbach, K. Itoh // *Arch. Surg*. – 1990. – Vol. 125. – № 2. – P. 200–205.
  49. Basu, A. Cutting edge: Vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO+ CD4+ T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN-gamma production. / A. Basu, A. Hoerning, D. Datta, M. Edelbauer, M.P. Stack, K. Calzadilla, S. Pal, D.M. Briscoe // *J. Immunol*. – 2010. – Vol. 184. – № 2. – P. 545–549.
  50. Bayne, L.J. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer / L.J. Bayne, G.L. Beatty, N. Jhala, C.E. Clark, A.D. Rhim, B.Z. Stanger, R.H. Vonderheide // *Cancer Cell*. – 2010. – Vol. 21. – № 6. – P. 822–835.
  51. Beane, J.D. Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-Year follow-up of a randomized prospective trial / J.D. Beane, J.C. Yang, D. White, S.M. Steinberg, S.A. Rosenberg, U. Rudloff // *Ann. Surg. Oncol*. – 2014. – Vol. 21. – № 8. – P. 2484–2489.
  52. Belli, C. Targeting the microenvironment in solid tumors / C. Belli, D. Trapani, G. Viale, P. D'Amico, B.A. Duso, P. Della Vigna, F. Orsi, G. Curigliano // *Cancer Treat Rev*. – 2018. – Vol. 65. – P. 22–32.
  53. Ben-Ami, E. Immunotherapy with single agent nivolumab for advanced leiomyosarcoma of the uterus: Results of a phase 2 study / E. Ben-Ami, C.M. Barysaukas, S. Solomon, K. Tahlil, R. Malley, M. Hohos, K. Polson, M. Loucks, M. Severgnini, T. Patel, A. Cunningham, S.J. Rodig, F.S. Hodi, J.A. Morgan, P. Merriam, A.J. Wagner, G.I. Shapiro, S. George // *Cancer*. – 2017. – Vol. 123. – № 17. – P. 3285–3290.

54. Benkhoucha, M. Hepatocyte Growth Factor Limits Autoimmune Neuroinflammation via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Expression in Dendritic Cells / M. Benkhoucha, N. Molnarfi, I. Dunand-Sauthier, D. Merkler, G. Schneiter, S. Bruscoli, C. Riccardi, Y. Tabata, H. Funakoshi, T. Nakamura, W. Reith, M.-L. Santiago-Raber, P.H. Lalive // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 193. – № 6. – P. 2743–2752.
55. Berghuis, D. Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the Ewing sarcoma microenvironment determine CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte infiltration and affect tumour progression / D. Berghuis, S.J. Santos, H.J. Baelde, A.H.M. Taminiau, R. Maarten Egeler, M.W. Schilham, P.C.W. Hogendoorn, A.C. Lankester // *J. Pathol.* – 2011. – Vol. 223. – № 3. – P. 347–357.
56. Berry, V. REGOSARC: Regorafenib versus placebo in doxorubicin-refractory soft-tissue sarcoma—A quality-adjusted time without symptoms of progression or toxicity analysis / V. Berry, L. Basson, E. Bogart, O. Mir, J.Y. Blay, A. Italiano, F. Bertucci, C. Chevreau, S. Clisant-Delaine, B. Liegl-Antzager, E. Tresch-Bruneel, J. Wallet, S. Taieb, E. Decoupigny, A. Le Cesne, T. Brodowicz, N. Penel // *Cancer.* – 2017. – Vol. 123. – № 12. – P. 2294–2302.
57. Bettelli, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, V.K. Kuchroo // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – № 7090. – P. 235–238.
58. Binnewies, M. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy / M. Binnewies, E.W. Roberts, K. Kersten, V. Chan, D.F. Fearon, M. Merad, L.M. Coussens, D.I. Gabrilovich, S. Ostrand-rosenberg, C.C. Hedrick, R.H. Vonderheide, M.J. Pittet, R.K. Jain, W. Zou // *Nat. Med.* – 2018. – Vol. 24. – № 5. – P. 541–550.
59. Blackmon, S.H. Resection of pulmonary and extrapulmonary sarcomatous metastases is associated with long-term survival. / S.H. Blackmon, N. Shah, J.A. Roth, A.M. Correa, A.A. Vaporciyan, D.C. Rice, W. Hofstetter, G.L. Walsh, R. Benjamin, R. Pollock, S.G. Swisher, R. Mehran // *Ann. Thorac. Surg.* – 2009. – Vol. 88. – № 3. – P. 877–884.
60. Blakely, A.M. Role of immune microenvironment in gastrointestinal stromal tumours / A.M. Blakely, A. Matoso, P.A. Patil, R. Taliano, J.T. Machan, T.J. Miner, K.A. Lombardo, M.B. Resnick, L.J. Wang // *Histopathology.* – 2018. – Vol. 72. – № 3. – P. 405–413.
61. Blay, Y. Using biology to guide the treatment of sarcomas and aggressive connective-tissue tumours / Y. Blay // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 15. – № 7. – P. 443–458.
62. Boelens, M.C. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways / M.C. Boelens, T.J. Wu, B.Y. Nabet, B. Xu, Y. Qiu, T. Yoon, D.J. Azzam, C. Twyman-Saint Victor, B.Z. Wiemann, H. Ishwaran, P.J. Ter Brugge, J. Jonkers, J. Slingerland, A.J. Minn // *Cell.* – 2014. – Vol. 159. – P. 499–513.

63. Brennan, M.F. Lessons learned from the study of 10,000 patients with soft tissue sarcoma / M.F. Brennan, C.R. Antonescu, N. Moraco, S. Singer // *Ann Surg.* – 2014. – Vol. 260. – № 3. – P. 416–422.
64. Bruder, D. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells / D. Bruder, M. Probst-Kepper, A.M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, W. Hansen // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – Vol. 34. – P. 623–630.
65. Burgess, M. Immunotherapy in Sarcoma: Future Horizons / M. Burgess, V. Gorantla, K. Weiss, H. Tawbi // *Curr. Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 17. – №11. – P. 52. DOI: 10.1007/s11912-015-0474-7.
66. Caballero, O.L. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy / O.L. Caballero, Y.T. Chen // *Cancer Sci.* – 2009. – Vol. 100. – № 11. – P. 2014–2021.
67. Cantoni, C. NK Cells, Tumor Cell Transition, and Tumor Progression in Solid Malignancies: New Hints for NK-Based Immunotherapy? / C. Cantoni, L. Huergo-Zapico, M. Parodi, M. Pedrazzi, M.C. Mingari, A. Moretta, B. Sparatore, S. Gonzalez, D. Olive, C. Bottino, R. Castriconi, M. Vitale // *J. Immunol. Res.* – Hindawi Publishing Corporation, 2016. – Vol. 2016. DOI: 10.1155/2016/4684268.
68. Casali, P.G. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / P.G. Casali, N. Abecassis, S. Bauer, R. Biagini, S. Bielack, S. Bonvalot, I. Boukovinas, J.V.M.G. Bovee, T. Brodowicz, J.M. Broto // *Ann Oncol.* – 2018. – № 00 – P. 1–17.
69. Castelli, C. Modulation of the myeloid compartment of the immune system by angiogenic- and kinase inhibitor-targeted anti-cancer therapies / C. Castelli, L. Rivoltini, M. Rodolfo, M. Tazzari, C. Belgiovine, P. Allavena // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2015. – Vol. 64. – № 1. – P. 83–89.
70. Cavnar, M.J. KIT oncogene inhibition drives intratumoral macrophage M2 polarization / M.J. Cavnar, S. Zeng, T.S. Kim, E.C. Sorenson, L.M. Ocuin, V.P. Balachandran, A.M. Seifert, J.B. Greer, R. Popow, M.H. Crawley, N.A. Cohen, B.L. Green, F. Rossi, P. Besmer, C.R. Antonescu, R.P. DeMatteo // *J. Exp. Med.* – 2013. – Vol. 210. – № 13. – P. 2873–2886.
71. Chang, Q. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis / Q. Chang, E. Bournazou, P. Sansone, M. Berishaj, S.P. Gao, L. Daly, J. Wels, T. Theilen, S. Granitto, X. Zhang, J. Cotari, M.L. Alpaugh, E. de Stanchina, K. Manova, M. Li, M. Bonafe, C. Ceccarelli, M. Taffurelli, D. Santini, G. Altan-Bonnet, R. Kaplan, L. Norton, N. Nishimoto, D. Huszar, D. Lyden, J. Bromberg // *Neoplasia.* – 2013. – Vol. 15. – № 7. – P. 848–862.

72. Chang, A.L. CCL2 produced by the glioma microenvironment is essential for the recruitment of regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells / A.L. Chang, J. Miska, D.A. Wainwright, M. Dey, C. V. Rivetta, D. Yu, D. Kanojia, K.C. Pituch, J. Qiao, P. Pytel, Y. Han, M. Wu, L. Zhang, C.M. Horbinski, A.U. Ahmed, M.S. Lesniak // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 76. – № 19. – P. 5671–5682.
73. Chaudhary, B. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting / B. Chaudhary, E. Elkord, T.L. Whiteside // *Vaccines.* – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P.1–28.
74. Chen, X. TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4+Foxp3+ Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment / X. Chen, X. Wu, Q. Zhou, O.M.Z. Howard, M.G. Netea, J.J. Oppenheim // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190. – № 3. – P. 1076–1084.
75. Chen, L. Upregulation of chemokine receptor CCR10 is essential for glioma proliferation, invasion and patient survival / L. Chen, X. Liu, H.-Y. Zhang, W. Du, Z. Qin, Y. Yao, Y. Mao, L. Zhou // *Oncotarget.* – 2014. – Vol. 5. – № 16. – P.6576–6583.
76. Chow, M. Chemokines in Cancer / M. Chow, A. Luster // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2. – № 12. – P. 1125–1131.
77. Clements, V.K. Frontline Science: High fat diet and leptin promote tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells / V.K. Clements, C. Figley, D.M.C. Smith, S. Ostrand-rosenberg // *J. Leukoc. Biol.* – 2018. – Vol. 102. – № 3. – P. 395–407.
78. Coley, W.B. Contribution to the knowledge of sarcoma / W.B. Coley // *Ann. Surg.* – 1891. – Vol. 14. – № 199. – P. 199–200.
79. D’Angelo, S.P. A multi-center phase II study of nivolumab +/- ipilimumab for patients with metastatic sarcoma (Alliance A091401). / S.P. D’Angelo, M.R. Mahoney, B.A. Van Tine, J.N. Atkins, M.M. Milhem, W.D. Tap, C.R. Antonescu, L.E. Horvath, G.K. Schwartz, H. Streicher // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – № 15\_suppl – P. 11007.
80. Dagher, R. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: An inter-institute NIH study / R. Dagher, L.M. Long, E.J. Read, S.F. Leitman, C.S. Carter, M. Tsokos, T.J. Goletz, N. Avila, J.A. Berzofsky, L.J. Helman, C.L. Mackall // *Med. Pediatr. Oncol.* – 2002. – Vol. 38. – № 3. – P. 158–164.
81. Daukste, L. Mathematical Determination of Cell Population Doubling Times for Multiple Cell Lines / L. Daukste, B. Basse, B.C. Baguley, D.J.N. Wall // *Bull. Math. Biol.* – 2012. – Vol. 74. – № 10. – P. 2510–2534.

82. David, J. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance / J. David, C. Dominguez, D. Hamilton, C. Palena // *Vaccines*. – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P. 22. DOI: 10.3390/vaccines4030022.
83. David, J.M. MUC1 upregulation promotes immune resistance in tumor cells undergoing brachyury-mediated epithelial-mesenchymal transition / J.M. David, D.H. Hamilton, C. Palena // *OncoImmunology*. – 2016. – Vol. 5 – № 4. DOI:10.1080/2162402X.2015.1117738.
84. Davies, A.E. Microenvironmental Signals and Biochemical Information Processing: Cooperative Determinants of Intratumoral Plasticity and Heterogeneity / A.E. Davies, J.G. Albeck, A.E. Davies // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2018. – Vol. 6 – № 118. – P. 1–15.
85. Demetri, G.D. Efficacy and safety of trabectedin or dacarbazine for metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of conventional chemotherapy: Results of a phase III randomized multicenter clinical trial / G.D. Demetri, M. Von Mehren, R.L. Jones, M.L. Hensley, S.M. Schuetze, A. Staddon, M. Milhem, A. Elias, K. Ganjoo, H. Tawbi, B.A. Van Tine, A. Spira, A. Dean, N.Z. Khokhar, Y.C. Park, R.E. Knoblauch, T. V Parekh, R.G. Maki, S.R. Patel // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34. – № 8. – P. 786–793.
86. Dewerchin, M. Placental growth factor in cancer / M. Dewerchin, P. Carmeliet // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2014. – Vol. 18 – № 11. – P. 1339–1354.
87. Dhupkar, P. Interleukin-2: Old and new approaches to enhance immune-therapeutic efficacy / P. Dhupkar, N. Gordon // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – Vol. 995. – P. 33–51.
88. Dikov, M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1 and 2 in Dendritic Cell Differentiation / M. Dikov, J. Ohm, N. Ray // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – № 1. – P. 215–222.
89. Dillman, R. Phase I/II trial of autologous tumor cell line-derived vaccines for recurrent or metastatic sarcomas / R. Dillman, N. Barth, S. Selvan, L. Beutel, C. De Leon, C. DePriest, C. Peterson, S. Nayak // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2004. – Vol. 19. – № 5. – P. 581–588.
90. Dunn, G.P. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape / G.P. Dunn, A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3. – № 11. – P. 991–998.
91. Ehnman, M. Microenvironmental Targets in Sarcoma / M. Ehnman, O. Larsson // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 5. – P. 1–7.
92. Emori, M. Peptide vaccination therapy for bone and soft tissue sarcoma / M. Emori, T. Tsukahara, S. Kawaguchi, T. Wada // *Nihon Rinsho*. – 2011. – Vol. 69. – № 9. – P. 1670–1673.

93. Erskine, C.L. Determining Optimal Cytotoxic Activity of Human Her2neu Specific CD8 T cells by Comparing the Cr51 Release Assay to the xCELLigence System / C.L. Erskine, A.M. Henle, K.L. Knutson // *J. Vis. Exp.* – 2012. – № 66. DOI: 10.3791/3683.
94. Esmailbeig, M. Interleukin-18: a regulator of cancer and autoimmune diseases. / M. Esmailbeig, A. Ghaderi // *Eur. Cytokine Netw.* – 2017. – Vol. 28. – № 4. – P. 127–140.
95. Fabbi, M. Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP / M. Fabbi, G. Carbotti, S. Ferrini // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – Vol. 97. – № 4. – P. 665–675.
96. Ferry, J.A. HHV8-positive, EBV-positive hodgkin lymphoma-like large B-cell lymphoma and HHV8-positive intravascular large B-cell lymphoma / J.A. Ferry, A.R. Sohani, J.A. Longtine, R.A. Schwartz, N.L. Harris // *Mod. Pathol.* – 2009. – Vol. 22. – № 5. – P. 618–626.
97. Finisguerra, V. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils / V. Finisguerra, G. Di Conza, M. Di Matteo, J. Serneels, S. Costa, A.A.R. Thompson, E. Wauters, S. Walmsley, H. Prenen, Z. Granot, A. Casazza, M. Mazzone // *Nature.* – 2015. – Vol. 522 – № 7556. – P. 349–353.
98. Finkelstein, S.E. Combination of external beam radiotherapy (EBRT) with intratumoral injection of dendritic cells as neo-adjuvant treatment of high-risk soft tissue sarcoma patients / S.E. Finkelstein, C. Iclozan, M.M. Bui, M.J. Cotter, R. Ramakrishnan, J. Ahmed, D.R. Noyes, D. Cheong, R.J. Gonzalez, R. V. Heysek, C. Berman, B.C. Lenox, W. Janssen, J.S. Zager, V.K. Sondak, G.D. Letson, S.J. Antonia, D.I. Gabrilovich // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2012. – Vol. 82. – № 2. – P. 924–932.
99. Finkelstein, S.E. Cellular immunotherapy for soft tissue sarcomas / S.E. Finkelstein, M. Fishman, a P. Conley, D. Gabrilovich, S. Antonia, A. Chiappori // *Immunotherapy.* – 2012. – Vol. 4. – № 3. – P. 283–290.
100. Fisher, D.T. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. / D.T. Fisher, Q. Chen, J.J. Skitzki, J.B. Muhitch, L. Zhou, M.M. Appenheimer, T.D. Vardam, E.L. Weis, J. Passanese, W.C. Wang, S.O. Gollnick, M.W. Dewhirst, S. Rose-John, E.A. Repasky, H. Baumann, S.S. Evans // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121. – № 10. – P. 3846–3859.
101. Fisher, D.T. The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment / D.T. Fisher, M.M. Appenheimer, S.S. Evans // *Seminars in Immunology.* – 2014. – Vol. 26 – № 1 – P. 38–47.
102. Fletcher, C.D.M. WHO Classification of tumours of soft tissue and bone. / C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens. – 4rd ed. – Lyon: IARC, 2013 – 468 p.

103. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications / J. Folkman // *N. Engl. J. Med.* – 1971. – Vol. 285. – № 21. – P. 1182–1186.
104. Fridman, W.H. The immune contexture in cancer prognosis and treatment / W.H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès-Fridman, G. Kroemer // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 14. – № 12. – P. 717–734.
105. Gabrilovich, D.I. Tumor-Induced Immune Suppression / D.I. Gabrilovich, A.A. Hurrwitz // New York Heidelberg Dordrecht London: Springer. – 2014. – 464 p. DOI: 10.1007/978-1-4899-8056-4.
106. Gavalas, N.G. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2 / N.G. Gavalas, M. Tsiatas, O. Tsitsilonis, E. Politi, K. Ioannou, A.C. Ziogas, A. Rodolakis, G. Vlahos, N. Thomakos, D. Haidopoulos, E. Terpos, A. Antsaklis, M.A. Dimopoulos, A. Bamias // *Br. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 107. – № 11. – P. 1869–1875.
107. Geginat, J. Plasticity of human CD4 T cell subsets / J. Geginat, M. Paroni, S. Maglie, J.S. Alfen, I. Kastirr, P. Gruarin, M. De Simone, M. Pagani, S. Abrignani, A.G. Castro // *Front Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P.630. DOI:10.3389/fimmun.2014.00630.
108. Geiger, J.D. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression / J.D. Geiger, L.F. Hohenkirk, E.A. McKenna, G.A. Yanik, J.E. Levine, A.E. Chang, J.J. Mulé, R.J. Hutchinson, T.M. Braun // *Cancer Research.* – 2001. – Vol. 61. – № 23. – P. 8513–8519.
109. Gino, I.K. Treatment of advanced, metastatic soft tissue sarcoma: latest evidence and clinical considerations / I.K. Gino, J.S. Hu, W.W. Tseng // *Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2017. – Vol. 9. – № 8. – P. 533–550.
110. Goldman, C.K. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. / C.K. Goldman, R.L. Kendall, G. Cabrera, L. Soroceanu, Y. Heike, G.Y. Gillespie, G.P. Siegal, X. Mao, a J. Bett, W.R. Huckle, K. a Thomas, D.T. Curiel // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – Vol. 95. – № 15. – P. 8795–800.
111. Gooden, M.J.M., de Bock, G.H., Leffers, N., Daemen, T., and Nijman, H.W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis / Gooden, M.J.M., de Bock, G.H., Leffers, N., Daemen, T., and Nijman // *Br. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 105. – P. 93–103.
112. Graaf, W.T.A. van der Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. / W.T.A. van der Graaf, J.-Y. Blay, S.P. Chawla, D.-W. Kim, B. Bui-Nguyen, P.G. Casali, P. Schöffski, M. Aglietta, A.P.



- Staddon, Y. Beppu, A. Le Cesne, H. Gelderblom, I.R. Judson, N. Araki, M. Ouali, S. Marreaud, R. Hodge, M.R. Dewji, C. Coens, G.D. Demetri, C.D. Fletcher, A.P. Dei Tos, P. Hohenberger, EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, PALETTE study group // *Lancet*. – 2012. – Vol. 379. – № 9829. – P. 1879–1886.
113. Gravis, G. rIL-2 in metastatic soft tissue sarcomas refractory to chemotherapy: Response and enhancement of further chemosensitivity / G. Gravis, P. Viens, R. Delva, D. Baume, D. Blaise, F. Ternier, G. Houvenaeghel, M. Brandely, M. Resbeut, D. Maraninchi // *Anticancer Res*. – 1998. – Vol. 18. – № 5B. – P. 3699–3704.
114. Griffith, J.W. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity / J.W. Griffith, C.L. Sokol, A.D. Luster // *Annu. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 32. – № 1. – P. 659–702.
115. Groom, J.R. CXCR3 Chemokine Receptor-Ligand Interactions in the Lymph Node Optimize CD4+ T Helper 1 Cell Differentiation / J.R. Groom, J. Richmond, T.T. Murooka, E.W. Sorensen, J.H. Sung, K. Bankert, U.H. von Andrian, J.J. Moon, T.R. Mempel, A.D. Luster // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37. – № 6. – P. 1091–1103.
116. Guadagnolo, B.A. Excellent Local Control Rates and Distinctive Patterns of Failure in Myxoid Liposarcoma Treated With Conservation Surgery and Radiotherapy / B.A. Guadagnolo, G.K. Zagars, M.T. Ballo, S.R. Patel, V.O. Lewis, R.S. Benjamin, R.E. Pollock // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – Vol. 70. – № 3. – P. 760–765.
117. Gupta, K.K. Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like Receptor-4. / K.K. Gupta, Z. Xu, F.J. Castellino, V.A. Ploplis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 477. – P. 503–508.
118. Hadrup, S. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment / S. Hadrup, M. Donia, P. Thor Straten // *Cancer Microenviron.* – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 123–133.
119. Hamilton, D.H. WEE1 inhibition alleviates resistance to immune attack of tumor cells undergoing epithelial-mesenchymal transition / D.H. Hamilton, B. Huang, R.I. Fernando, K.Y. Tsang, C. Palena // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. – № 9. – P. 2510–2519.
120. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – P. 57–70.
121. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: The next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – № 5. – P. 646–674.
122. Hanahan, D. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment / D. Hanahan, L.M. Coussens // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 21. – № 3. – P. 309–322.

123. Hanaoka, T. A case of G-CSF-producing histiocytic sarcoma of the stomach / T. Hanaoka, K. Jingu, T. Tochigi, I. Hoshino, T. Uematu, H. Matsubara // *Int. Surg.* – 2015. – Vol. 100. – № 3. – P. 568–573.
124. Hansen, W. Neuropilin 1 guides regulatory T cells into vegf-producing melanoma / W. Hansen // *OncoImmunology.* – 2013. – Vol. 2. – № 2. – P.e23039. DOI: 10.4161/2Fonci.23039.
125. Harlin, H. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. / H. Harlin, Y. Meng, A.C. Peterson, Y. Zha, M. Tretiakova, C. Slingluff, M. McKee, T. Gajewski // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69. – № 7. – P. 3077–3085.
126. Hayano, K. Texture Analysis of Non-Contrast-Enhanced Computed Tomography for Assessing Angiogenesis and Survival of Soft Tissue Sarcoma / K. Hayano, F. Tian, A. Kambadakone, S. Yoon, D. Duda, B. Ganeshan, D. Sahani // *J. Comput. Assist. Tomogr.* – 2015. – Vol. 39. – № 4. – P. 607–612.
127. Hedger, M.P. The Regulation and Functions of Activin and Follistatin in Inflammation and Immunity / M.P. Hedger, W.R. Winnall, D.J. Phillips, D.M. de Kretser // *Vitam. Horm.* – 1st ed. – Elsevier Inc., 2011. – Vol. 85. – P. 255–297.
128. Heldin, C.H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment / C.H. Heldin // *Cell Commun Signal.* – 2013. – Vol. 11. – № 97. – P. 1–18.
129. Hembruff, S.L. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. / S.L. Hembruff, N. Cheng // *Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 7A. – P. 254–267.
130. Hou, C.H. The use of radiation therapy in localized high-grade soft tissue sarcoma and potential impact on survival. / C.H. Hou, A.L. Lazarides, P.J. Speicher, D.P. Nussbaum, D.G. Blazer, D.G. Kirsch, B.E. Brigman, W.C. Eward // *Ann. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 22. – № 9. – P. 2831–2838.
131. Hu, X. Transmembrane TNF- $\alpha$  Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2 / X. Hu, B. Li, X. Li, X. Zhao, L. Wan, G. Lin, M. Yu, J. Wang, X. Jiang, W. Feng, Z. Qin, B. Yin, Z. Li // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – № 3. – P. 1320–1331.
132. Huang, Y. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF / Y. Huang, X. Chen, M.M. Dikov, S. V. Novitskiy, C.A. Mosse, L. Yang, D.P. Carbone // *Blood.* – 2007. – Vol. 110. – № 2. – P. 624–631.
133. Hübel, J. HGF/Met-Signaling Contributes to Immune Regulation by Modulating Tolerogenic and Motogenic Properties of Dendritic Cells / J. Hübel, T. Hieronymus // *Biomedicines.* – 2015. – Vol. 3 – № 1. – P. 138–148.

134. Huber, S. Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. / S. Huber, F.R. Stahl, J. Schrader, S. Lüth, K. Presser, A. Carambia, R. a Flavell, S. Werner, M. Blessing, J. Herkel, C. Schramm // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – № 36. – P. 4633–4640.
135. Hui, L. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil / L. Hui, Y. Chen // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 368. – № 1. – P. 7–13.
136. Ida, K. Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A\*2402 anchor substitute. / K. Ida, S. Kawaguchi, Y. Sato, T. Tsukahara, Y. Nabeta, H. Sahara, H. Ikeda, T. Torigoe, S. Ichimiya, K. Kamiguchi, T. Wada, S. Nagoya, H. Hiraga, A. Kawai, T. Ishii, N. Araki, A. Myoui, S. Matsumoto, T. Ozaki, H. Yoshikawa, T. Yamashita, N. Sato // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173. – № 2. – P. 1436–1443.
137. Ilangumaran, S. The hepatocyte growth factor (HGF)-MET receptor tyrosine kinase signaling pathway: Diverse roles in modulating immune cell functions / S. Ilangumaran, A. Villalobos-Hernandez, D. Bobbala, S. Ramanathan // *Cytokine.* – 2016. – Vol. 82. – P. 125 – 139.
138. Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer / A. Lapeyre-Prost, M. Terme, S. Pernot, A.L. Pointet, T. Voron, E. Tartour, J. Taieb // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 1st ed. – Elsevier Inc., 2017. – Vol. 330. – P. 295-342.
139. Incio, J. PlGF/VEGFR-1 signaling promotes macrophage polarization and accelerated tumor progression in obesity / J. Incio, J. Tam, N.N. Rahbari, P. Suboj, D.T. Mcmanus, S.M. Chin, T.D. Vardam, A. Batista, S. Babykutty, K. Jung, A. Khachatryan, T. Hato, J. Ligibel, I.E. Krop, S.B. Puchner, C.L. Schlett, U. Hoffmman, M. Ancukiewicz, M. Shibuya, P. Carmeliet, R. Soares, D.G. Duda, R.K. Jain, D. Fukumura, L.S. Laboratories, M. General, M.G. Hospital, M.G. Hospital, K.U. Leuven // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22. – № 12. – P. 2993–3004.
140. Iqbal, N. Prognostic factors affecting survival in metastatic soft tissue sarcoma: an analysis of 110 patients / N. Iqbal, N.K. Shukla, S.V.S. Deo, S. Agarwala, D.N. Sharma, M.C. Sharma, S. Bakhshi // *Clin. Transl. Oncol.* – 2016. – Vol. 18. – № 3. – P. 310–316.
141. Jinushi, M. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF / M. Jinushi, Y. Nakazaki, M. Dougan, D.R. Carrasco, M. Mihm, G. Dranoff // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – № 7. – P. 1902–1913.
142. Jo, V.Y. WHO classification of soft tissue tumours: An update based on the 2013 (4th) edition / V.Y. Jo, C.D.M. Fletcher // *Pathology.* – 2014. – Vol. 46. – № 2. – P. 95–104.
143. Joyce, J.A. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment / J.A. Joyce, D.T. Fearon // *Science.* – 2015. – Vol. 348 – № 6230 – P. 74–80.

144. Judson, I. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. / I. Judson, J. Verweij, H. Gelderblom, J.T. Hartmann, P. Schoffski, J.Y. Blay, J.M. Kerst, J. Sufliarisky, J. Whelan, P. Hohenberger, A. Krarup-Hansen, T. Alcindor, S. Marreaud, S. Litiere, C. Hermans, C. Fisher, P.C. Hogendoorn, A.P. dei Tos, W.T. van der Graaf, E.O. and T. of C.S.T. and B. Sarcoma // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15. – № 4. – P. 415–423.
145. Kadam, C.Y. Serum levels of soluble Fas ligand, granzyme B and cytochrome c during adjuvant chemotherapy of breast cancer. / C.Y. Kadam, S.A. Abhang // *Clin. Chim. Acta.* – 2015. – Vol. 438. – P. 98–102.
146. Kang, S. Post-metastasis survival in extremity soft tissue sarcoma: a recursive partitioning analysis of prognostic factors. / S. Kang, H.S. Kim, S. Kim, W. Kim, I. Han // *Eur. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 50. – № 9. – P. 1649–1656.
147. Kawaguchi, S. Phase I vaccination trial of SYT-SSX junction peptide in patients with disseminated synovial sarcoma / S. Kawaguchi, T. Wada, K. Ida, Y. Sato, S. Nagoya, T. Tsukahara, S. Kimura, H. Sahara, H. Ikeda, K. Shimozawa, H. Asanuma, T. Torigoe, H. Hiraga, T. Ishii, S. ichiro Tatezaki, N. Sato, T. Yamashita // *J. Transl. Med.* – 2005. – Vol. 3. – P. 1–9.
148. Kawai, A. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase III study of pazopanib in patients with soft tissue sarcoma: Results from the Japanese subgroup / A. Kawai, N. Araki, H. Hiraga, H. Sugiura, A. Matsumine, T. Ozaki, T. Ueda, T. Ishii, T. Esaki, M. Machida, N. Fukasawa // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 46. – № 3. – P. 248–253.
149. Kawai, A. Phase 2 study of eribulin in patients with previously treated advanced or metastatic soft tissue sarcoma. / A. Kawai, N. Araki, Y. Naito, T. Ozaki, H. Sugiura, Y. Yazawa, H. Morioka, A. Matsumine, K. Saito, S. Asami, K. Isu // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 47. – P. 137–144.
150. Kimpfler, S. Skin Melanoma Development in ret Transgenic Mice Despite the Depletion of CD25 + Foxp3 + Regulatory T Cells in Lymphoid Organs / S. Kimpfler, A. Sevko, S. Ring, W. Osen, K. Frank, M. Kato, K. Mahnke, D. Schadendorf, V. Umansky, C. Falk // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183. – № 10. – P. 6330–6337.
151. Klein, G. Demonstration of Resistance against Methylcholanthrene-induced Sarcomas in the Primary Autochthonous Host / G. Klein, H.O. Sjögren, E. Klein, K.E. Hellstrom // *Cancer Res.* – 1960. – Vol. 20. – № 11. – P. 1561–1572.
152. Kobori, T. Interleukin-18 amplifies macrophage polarization and morphological alteration, leading to excessive angiogenesis / T. Kobori, S. Hamasaki, A. Kitaura, Y. Yamazaki, T.

- Nishinaka, A. Niwa, S. Nakao, H. Wake, S. Mori, T. Yoshino, M. Nishibori, H. Takahashi // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1–20.
153. Komarov, Y. NY-ESO-1 antigen expression as a prognostic factor for soft tissue sarcomas / Y. Komarov, A. Barchuk, T. Semenova, A.I. Semiglazova, E. Imianitov, A. Iyevleva, I. Baldueva, A.V. Novik, T.L. Nehaeva, N. Pipia, H. Huhtala, A. Ivantsov, A. Artemyeva, M. Moo, S. Protsenko // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – P.11075. DOI: 10.100/JCO.2017.35.15\_suppl.11075.
154. Komarova, N.L. Spatial stochastic models of cancer: Fitness, migration, invasion / N.L. Komarova // *Math. Biosci. Eng.* – 2013. – Vol. 10. – № 3. – P. 761–775.
155. Kudo-Saito, C. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis / C. Kudo-Saito, H. Shirako, M. Ohike, N. Tsukamoto, Y. Kawakami // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2013. – Vol. 30. – № 4. – P. 393–405.
156. Kujawski, M. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice / M. Kujawski, M. Kortylewski, H. Lee, A. Herrmann, H. Kay, H. Yu // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118. – № 10. – P. 3367–3377.
157. Larsen, S.K. NK cells in the tumor microenvironment. / S.K. Larsen, Y. Gao, P.H. Basse // *Crit. Rev. Oncog.* – 2014. – Vol. 19. – № 1–2. – P. 91–105.
158. Le, D.T. Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: A current perspective / D.T. Le, E.M. Jaffee // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – № 14. – P. 3439–3444.
159. Lee, A. Immunotherapy for Soft Tissue Sarcoma: Tomorrow Is Only a Day Away / A. Lee, P. Huang, R.P. DeMatteo, S.M. Pollack // *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* – 2016. – Vol. 36. – P. 281–290.
160. Lewis, C.E. Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: Hypoxia and angiopoietin-2 / C.E. Lewis, R. Hughes // *Breast Cancer Res.* – 2007. – Vol. 9. – № 3. – P. 2–5.
161. Li, B. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy / B. Li, A.S. Lalani, T.C. Harding, B. Luan, K. Koprivnikar, H.T. Guang, R. Prell, M.J. VanRoey, A.D. Simmons, K. Jooss // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – № 22. – P. 6808–6816.
162. Lin, T.C. Leptin signaling axis specifically associates with clinical prognosis and is multifunctional in regulating cancer progression / T.C. Lin, K.-W. Huang, C.-W. Liu, Y.-C. Chang, W.-M. Lin, T.-Y. Yang, M. Hsiao // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9. – № 24. – P. 17210–17219.

163. Linch, M. Systemic treatment of soft-tissue sarcoma—gold standard and novel therapies / M. Linch, A.B. Miah, K. Thway, I.R. Judson, C. Benson // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 11. – № 4. – P. 187–202.
164. Linde, N. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages / N. Linde, W. Lederle, S. Depner, N. Van Rooijen, C.M. Gutschalk, M.M. Mueller // *J. Pathol.* – 2012. – Vol. 227. – № 1. – P. 17–28.
165. Lippitz, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review / B.E. Lippitz // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol. 14. – № 6. – P. 218–28.
166. Long, X. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review) / X. Long, Y. Ye, L. Zhang, P. Liu, W. Yu, F. Wei, X. Ren, J. Yu // *Int. J. Oncol.* – 2016. – Vol. 48. – № 1. – P. 5–12.
167. Lorigan, P. Phase III trial of two investigational schedules of ifosfamide compared with standard-dose doxorubicin in advanced or metastatic soft tissue sarcoma: A European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group study / P. Lorigan, J. Verweij, Z. Papai, S. Rodenhuis, A. Le Cesne, M.G. Leahy, J.A. Radford, M.M. Van Glabbeke, A. Kirkpatrick, P.C.W. Hogendoorn, J.Y. Blay // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – № 21. – P. 3144–3150.
168. Luo, Y. The mesenchymal tumor microenvironment A drug-resistant niche / Y. Luo, X. Wang, D. Yu, L. Kang // *Cell Adhesion & Migration.* – 2012. – Vol. 6. – № 3. – P. 285–296.
169. Mackall, C.L. A pilot study of consolidative immunotherapy in patients with high-risk pediatric sarcomas / C.L. Mackall, E.H. Rhee, E.J. Read, H.M. Khuu, S.F. Leitman, D. Bernstein, M. Tesso, L.M. Long, D. Grindler, M. Merino, W. Kopp, M. Tsokos, J.A. Berzofsky, L.J. Helman // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – № 15. – P. 4850–4858.
170. Maehana, S. Suppression of lymphangiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in a mouse lung cancer model / S. Maehana, M. Nakamura, F. Ogawa, R. Imai, R. Murakami, F. Kojima, M. Majima, H. Kitasato // *Biomed. Pharmacother.* – 2016. – Vol. 84. – P. 660–665.
171. Mahoney, K.M. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets / K.M. Mahoney, P.D. Rennert, G.J. Freeman // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2015. – Vol. 14. – № 8. – P. 561–584.
172. Maki, R.G. Soft tissue sarcoma as a model disease to examine cancer immunotherapy. / R.G. Maki // *Curr. Opin. Oncol.* – 2001. – Vol. 13. – № 4. – P. 270–274.
173. Maki, R.G. Future directions for immunotherapeutic intervention against sarcomas / R.G. Maki // *Curr. Opin. Oncol.* – 2006. – Vol. 18. – № 4. – P. 363–368.

174. Maki, R.G. A pilot study of anti-CTLA4 antibody ipilimumab in patients with synovial sarcoma / R.G. Maki, A.A. Jungbluth, S. Gnjatic, G.K. Schwartz, D.R. D'Adamo, M.L. Keohan, M.J. Wagner, K. Scheu, R. Chiu, E. Ritter, J. Kachel, I. Lowy, L.J. Old, G. Ritter // *Sarcoma*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–8. DOI: 10.1155/2013/168145.
175. Malmberg, K.J. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer / K.J. Malmberg, M. Carlsten, A. Björklund, E. Sohlberg, Y.T. Bryceson, H.G. Ljunggren // *Semin. Immunol.* – 2017. – Vol. 31. – P. 20–29.
176. Marcove, R.C. A clinical trial of autogenous vaccine in osteogenic sarcoma in patients under the age of twenty-five / R.C. Marcove, C.M. Southam, A. Levin, V. Mike, A. Huvos // *Surg. Forum.* – 1971. – Vol. 22. – P. 434–435.
177. Mehren, M. von Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines / M. von Mehren, R. Randall, R. Benjamin, S. Boles, M. Bui, K. Ganjoo, S. George, R. Gonzalez, M. Heslin, J. Kane, V. Keedy, E. Kim, H. Koon, J. Mayerson, M. McCarter, S. McGarry, C. Meyer, Z. Morris, R. O'Donnell, A. Pappo, I. Paz, I. Petersen, J. Pfeifer, R. Riedel, B. Ruo, S. Schuetze, W. Tap, J. Wayne, M. Bergman, J. Scavone // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2018. – Vol. 16. – № 5. – P. 536–563.
178. Mir, O. Safety and efficacy of regorafenib in patients with advanced soft tissue sarcoma (REGOSARC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial / O. Mir, T. Brodowicz, A. Italiano, J. Wallet, J.Y. Blay, F. Bertucci, C. Chevreau, S. Piperno-Neumann, E. Bompas, S. Salas, C. Perrin, C. Delcambre, B. Liegl-Atzwanger, M. Toulmonde, S. Dumont, I. Ray-Coquard, S. Clisant, S. Taieb, C. Guillemet, M. Rios, O. Collard, L. Bozec, D. Cupissol, E. Saada-Bouzid, C. Lemaignan, W. Eisterer, N. Isambert, L. Chaigneau, A. Le Cesne, N. Penel // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol. 17. – № 12. – P. 1732–1742.
179. Mitsiades, N. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase / N. Mitsiades, V. Poulaki, V. Kotoula, A. Leone, M. Tsokos // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 153. – № 6. – P. 1947–1956.
180. Mitsiades, N. Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells from Chemotherapeutic Drug Cytotoxicity / N. Mitsiades, W. Yu, V. Poulaki, N. Mitsiades, W. Yu, V. Poulaki, M. Tsokos, I. Stamenkovic // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 577–581.
181. Mittal, D. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape / D. Mittal, M.M. Gubin, R.D. Schreiber, M.J. Smyth // *Curr. Opin. Immunol.* – 2014. – Vol. 27. – P. 16–25.

182. Motz, G.T. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: Cancer and other tales / G.T. Motz, G. Coukos // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 11. – № 10. – P. 702–711.
183. Mu, C.-Y. Soluble CD40 in plasma and malignant pleural effusion with non-small cell lung cancer: A potential marker of prognosis / C.-Y. Mu, P.-X. Qin, Q.-X. Qu, C. Chen, J.-A. Huang // *Chronic Dis. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 1. – № 1. – P. 36–41.
184. Naing, A. *Immunotherapy* / A. Naing, J. Hajar. // Houston, TX, USA: Springer. – 2017. – 184 p. DOI: 10.1007/978-3-319-53156-4.
185. Nakamura, I. Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system / I. Nakamura, M. Shibata, K. Gonda, T. Yazawa, T. Shimura, T. Anazawa, S. Suzuki, K. Sakurai, Y. Koyama, H. Ohto, R. Tomita, M. Gotoh, S. Takenoshita // *Oncol. Lett.* – 2013. – Vol. 5. – № 5. – P. 1682–1686.
186. Nakayama, K. Uterine leiomyosarcoma producing granulocyte colony stimulating factor / K. Nakayama, N. Nakayama, M.T. Rahman, M. Rahman, H. Katagiri, A. Katagiri, M. Ishikawa, T. Ishibashi, K. Iida, Y. Harada, K. Miyazaki // *Int. J. Gynecol. Pathol.* – 2012. – Vol. 31. – № 2. – P. 180–185.
187. Nathenson, M.J. *Immunotherapy: A New (and Old) Approach to Treatment of Soft Tissue and Bone Sarcomas* / M.J. Nathenson, A.P. Conley, E. Sausville // *Oncologist.* – 2017. – Vol. 22. – P. 1–13.
188. Naylor, C. Leptin Regulation of Immune Responses / C. Naylor, W.A. Petri Jr. // *Trends. Mol. Med.* – 2016. – Vol. 22 – № 2. – P. 88–98.
189. Nenu, I. Current position of TNF- $\alpha$  in melanomagenesis / I. Nenu, D. Tudor, A.G. Filip, I. Baldea // *Tumor Biology.* – 2015. – Vol. 36 – № 9. – P. 6589–6602.
190. Nguyen, S.T. Targeting specificity of dendritic cells on breast cancer stem cells: In vitro and in vivo evaluations / S.T. Nguyen, H.L. Nguyen, V.Q. Pham, G.T. Nguyen, C. Do-Thanh Tran, N.K. Phan, P. Van Pham // *Onco Targets Ther.* – 2015. – Vol. 8. – P. 323–334.
191. Noman, M.Z. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation / M.Z. Noman, G. Desantis, B. Janji, M. Hasmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte, S. Chouaib // *J. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 211. – № 5. – P. 781–790.
192. Novick, D. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine / D. Novick, S. Kim, G. Kaplanski, C.A. Dinarello // *Semin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25. – № 6. – P. 439–448.
193. O’Connell, J. Fas counter-attack-the best form of tumor defense? / J. O’Connell, M.W. Bennett, G.C. O’Sullivan, J.K. Collins, F. Shanahan // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5. – № 3. – P. 267–268.



194. O'Sullivan, B. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomized trial / B. O'Sullivan, A.M. Davis, R. Turcotte, R. Bell, C. Catton, P. Chabot, J. Wunder, R. Kandel, K. Goddard, A. Sadura, J. Pater, B. Zee // *Lancet*. – 2002. – Vol. 359. – № 9325. – P. 2235–2241.
195. Osmak, M. Drug resistant tumor cells have increased levels of tumor markers for invasion and metastasis / M. Osmak, D. Nikšić, A. Brozović, A. Ambriović Ristov, I. Vrhovec, J. Škrk // *Anticancer Res*. – 1999. – Vol. 19 – № 4B. – P. 3193–3197.
196. Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid derived-suppressor cells: their role in cancer and obesity / S. Ostrand-Rosenberg // *Curr. Opin. Immunol*. – 2018. – Vol. 51. – P. 68–75.
197. Overacre, A. Neuropilin-1 enforces Treg stability and function in the tumor microenvironment / A. Overacre, G. Delgoffe, D. Vignali // *J. Immunol*. – 2014. – Vol. 192. – №71 – P.13. Available from: [http://www.jimmunol.org/content/192/1\\_Supplement/71.13](http://www.jimmunol.org/content/192/1_Supplement/71.13).
198. Pang, A. Contemporary therapy for advanced soft-tissue sarcomas in adults / A. Pang, M. Carhini, R.G. Maki // *JAMA Oncol*. – 2016. – Vol. 2. – № 7. – P. 941–947.
199. Papathanassoglou, E. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. / E. Papathanassoglou, K. El-Haschimi, X.C. Li, G. Matarese, T. Strom, C. Mantzoros // *J Immunol*. – 2006. – Vol. 176. – № 12. – P. 7745–7752.
200. Parham, D.M. Immunohistochemical Markers of Soft Tissue Tumors: Pathologic Diagnosis, Genetic Contributions, and Therapeutic Options / D.M. Parham // *Anal Chem. Insights*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1–10.
201. Pervaiz, N. A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma / N. Pervaiz, N. Colterjohn, F. Farrokhyar, R. Tozer, A. Figueredo, M. Ghert // *Cancer*. – 2008. – Vol. 113. – № 3. – P. 573–581.
202. Pham, P. Van A simple in vitro method for evaluating dendritic cell-based vaccinations / P. Van Pham, N.T. Nguyen, H.M. Nguyen, L.T. Khuat, P.M. Le, V.Q. Pham, S.T. Nguyen, N.K. Phan // *Onco Targets Ther*. – 2014. – Vol. 7. – P. 1455–1464.
203. Pizzurro, G.A. Dendritic cell-based vaccine efficacy: Aiming for hot spots / G.A. Pizzurro, M.M. Barrio // *Front. Immunol*. – 2015. – Vol. 6 – № 91 – P. 1–8.
204. Placencio, V.R. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing / V.R. Placencio, Y.A. DeClerck // *Cancer Res*. – 2015. – Vol. 75. – № 15. – P. 2969–2974.

205. Pollack, S.M. Immune-based therapies for sarcoma / S.M. Pollack, E.T. Loggers, E.T. Rodler, C. Yee, R.L. Jones // *Sarcoma*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 438940. DOI: 10.1155/2011/438940.
206. Procaccini, C. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system / C. Procaccini, C. La Rocca, F. Carbone, V. De Rosa, M. Galgani, G. Matarese // *Dev. Comp Immunol.* – 2017. – Vol. 66. – P. 120–129.
207. Qiao, Z. Secretomics identifies follistatin as a predictive biomarker for response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in synovial sarcoma / Z. Qiao, F. Kito, Y. Takai, R. Oyama, T. Kondo // *J. Electrophoresis*. – 2017. – Vol. 61. – № 1. – P 1–7.
208. Qu, X. Immunological approaches towards cancer and inflammation: A cross talk / X. Qu, Y. Tang, S. Hua // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – № 563. – P 1–19.
209. Que, Y. PD-L1 expression is associated with FOXP3+ regulatory T-Cell infiltration of soft tissue sarcoma and poor patient prognosis / Y. Que, W. Xiao, Y.X. Guan, Y. Liang, S.M. Yan, H.Y. Chen, Q.Q. Li, B.S. Xu, Z.W. Zhou, X. Zhang // *J. Cancer*. – 2017. – Vol. 8. – № 11. – P. 2018–2025.
210. Ratan, R. Chemotherapy for soft tissue sarcoma / R. Ratan, S.R. Patel // *Cancer*. – 2016. – Vol. 122. – № 19. – P. 2952–2960.
211. Reed, D. Metastatic soft tissue sarcoma chemotherapy: An opportunity for personalized medicine / D. Reed, S. Altiok // *Cancer Control*. – 2011. – Vol. 18. – № 3. – P. 188–195.
212. Ribatti, D. A revisited concept. Tumors: Wounds that do not heal / D. Ribatti, R. Tamma // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2018. – Vol. 128. – P. 65–69.
213. Robainas, M. Understanding the role of PD-L1/PD1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy / M. Robainas, R. Otano, S. Bueno, S. Ait-Oudhia // *OncoTargets Ther.* – 2017. – Vol. 10. – P. 1803–1807.
214. Robbins, P.F. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 / P.F. Robbins, R.A. Morgan, S.A. Feldman, J.C. Yang, R.M. Sherry, M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, A. V. Nahvi, L.J. Helman, C.L. Mackall, U.S. Kammula, M.S. Hughes, N.P. Restifo, M. Raffeld, C.C.R. Lee, C.L. Levy, Y.F. Li, M. El-Gamil, S.L. Schwarz, C. Laurencot, S.A. Rosenberg // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – № 7. – P. 917–924.
215. Roberts, S.S. Immunotherapy of Childhood Sarcomas / S.S. Roberts, A.J. Chou, N.-K. V. Cheung // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 5. – № 181. – P. 1–12.
216. Robson, N.C. Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. / N.C. Robson, D.J. Phillips, T. McAlpine, A. Shin, S. Svobodova, T. Toy, V. Pillay, N. Kirkpatrick, D. Zanker, K. Wilson,

- I. Helling, H. Wei, W. Chen, J. Cebon, E. Maraskovsky // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – № 5. – P. 2733–2743.
217. Robson, N.C. Activin-A attenuates several human natural killer cell functions / N.C. Robson, H. Wei, T. Mcalpine, N. Kirkpatrick, J. Cebon, E. Maraskovsky // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – № 14. – P. 3218–3225.
218. Rose-John, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6 / S. Rose-John // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8. – № 9. – P. 1237–1247.
219. Rosenberg, S.A. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients / S.A. Rosenberg, M.T. Lotze, J.C. Yang, P.M. Aebersold, W.M. Linehan, C.A. Seipp, D.E. White // *Ann. Surg.* – 1989. – Vol. 210. – № 4. – P. 474–485.
220. Rusakiewicz, S. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. / S. Rusakiewicz, M. Semeraro, M. Sarabi, M. Desbois, C. Locher, R. Mendez, N. Vimond, A. Concha, F. Garrido, N. Isambert, L. Chaigneau, V. Le Brun-Ly, P. Dubreuil, I. Cremer, A. Caignard, V. Poirier-Colame, K. Chaba, C. Flament, N. Halama, D. Jäger, A. Eggermont, S. Bonvalot, F. Commo, P. Terrier, P. Opolon, J.-F. Emile, J.-M. Coindre, G. Kroemer, N. Chaput, A. Le Cesne, J.-Y. Blay, L. Zitvogel // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – № 12. – P. 3499–510.
221. Sackstein, R. T-lymphocyte homing: An underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy / R. Sackstein, T. Schatton, S.R. Barthel // *Lab Invest.* – 2017. – Vol. 97. – № 6. – P. 669–697.
222. Sáenz-López, P. Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer / P. Sáenz-López, R. Carretero, J.M. Cózar, J.M. Romero, J. Canton, J.R. Vilchez, M. Tallada, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello // *BMC Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – № 382. – P. 1–8.
223. Salomon, B.L. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and regulatory T cells in oncoimmunology / B.L. Salomon, M. Leclerc, J. Tosello, E. Ronin, E. Piaggio, J.L. Cohen // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – № 444. – P. 1–12.
224. Saucillo, D.C. Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation to Link Nutrition and Immunity / D.C. Saucillo, V.A. Gerriets, J. Sheng, J.C. Rathmell, N.J. Maciver // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – № 1. – P. 136–144.
225. Schöffski, P. Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial / P. Schöffski, S. Chawla, R.G. Maki, A. Italiano, H. Gelderblom, E. Choy, G. Grignani, V. Camargo, S. Bauer, S.Y. Rha, J.Y. Blay, P. Hohenberger, D. D'Adamo, M. Guo, B.

- Chmielowski, A. Cesne, G.D. Demetri, S.R. Patel // *Lancet*. – 2016. – Vol. 387. – № 10028. – P. 1629–1637.
226. Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth // *Science*. – 2011. – Vol. 331. – № 6024. – P. 1565–1570.
227. Schupp, J. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment / J. Schupp, F.K. Krebs, N. Zimmer, E. Trzeciak, D. Schuppan, A. Tuettenberg // *Cell Immunol.* – 2017. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.10.013.
228. Seddon, B. GeDDiS: A prospective randomised controlled phase III trial of gemcitabine and docetaxel compared with doxorubicin as first-line treatment in previously untreated advanced unresectable or metastatic soft tissue sarcomas (EudraCT 2009-014907-29). / B. Seddon, J. Whelan, S. Strauss, M. Leahy, P.J. Woll, F. Cowie, C. Rothermundt, Z. Wood, S. Forsyth, I. Khan, S. Nash, P. Patterson, S. Beare // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33. – № 15. – P. 10500. DOI: 10.1200/jco.2015.33.15
229. Seidel, J.A. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations / J.A. Seidel, A. Otsuka, K. Kabashima // *Front. Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – № 86. – P. 1–14.
230. Shou, J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: A systematic review and meta-analysis / J. Shou, Z. Zhang, Y. Lai, Z. Chen, J. Huang // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – № 687. – P. 1–8.
231. Shurin, G. V. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer / G. V. Shurin, Y. Ma, M.R. Shurin // *Cancer Microenviron.* – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 159–167.
232. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2018 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68. – № 1. – P. 7–30.
233. Skubitz, K.M. Identification of heterogeneity among soft tissue sarcomas by gene expression profiles from different tumors / K.M. Skubitz, S. Pambuccian, J.C. Manivel, A.P. Skubitz // *J. Transl. Med.* – 2008. – Vol. 6. – № 23. – P. 1–13.
234. Smith, S.M. Molecular diagnostics in soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors / S.M. Smith, J. Coleman, J.A. Bridge, O.H. Iwenofu // *J. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 111. – № 5. – P. 520–531.
235. Sorbye, S.W. Prognostic impact of lymphocytes in soft tissue sarcomas / S.W. Sorbye, T. Kilvaer, A. Valkov, T. Donnem, E. Smeland, K. Al-Shibli, R.M. Bremnes, L.T. Busund // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. 1–10.
236. Stephen, B. Overview of basic immunology for clinical investigators / B. Stephen, J. Hajjar // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – Vol. 995. – P. 1–31.

237. Stiller, C.A. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: Report from the RARECARE project / C.A. Stiller, A. Trama, D. Serraino, S. Rossi, C. Navarro, M.D. Chirlaque, P.G. Casali // *Eur. J. Cancer.* – 2017. – Vol. 49. – № 3. – P. 684–695.
238. Strioga, M.M. Therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines: the state of the art / M.M. Strioga, T. Felzmann, D.J. Powell, V. Ostapenko, N.T. Dobrovolskiene, M. Matuskova, J. Michalek, V.E.J. Schijns // *Crit. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 33. – № 6. – P. 489–547.
239. Suminoe, A. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor antigens for children with refractory malignant solid tumors / A. Suminoe, A. Matsuzaki, H. Hattori, Y. Koga, T. Hara // *Pediatr. Transplant.* – 2009. – Vol. 13. – № 6. – P. 746–753.
240. Takayama, Y. Inhibition of PAI-1 limits tumor angiogenesis regardless of angiogenic stimuli in malignant pleural mesothelioma / Y. Takayama, N. Hattori, H. Hamada, T. Masuda, K. Omori, S. Akita, H. Iwamoto, K. Fujitaka, N. Kohno // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 76. – № 11. – P. 3285–3294.
241. Tamborini, E. c-KIT and c-KIT ligand (SCF) in synovial sarcoma (SS): An mRNA expression analysis in 23 cases / E. Tamborini, D. Papini, A. Mezzelani, C. Riva, A. Azzarelli, G. Sozzi, M.A. Pierotti, S. Pilotti // *Br J Cancer.* – 2001. – Vol. 85. – № 3. – P. 405–411.
242. Tang, H. Immunotherapy and tumor microenvironment / H. Tang, J. Qiao, Y.X. Fu // *Cancer Lett.* – 2016. – Vol. 370. – № 1. – P. 85–90.
243. Tap, W.D. Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial / W.D. Tap, R.L. Jones, B.A. Van Tine, B. Chmielowski, A.D. Elias, D. Adkins, M. Agulnik, M.M. Cooney, M.B. Livingston, G. Pennock, M.R. Hameed, G.D. Shah, A. Qin, A. Shahir, D.M. Cronier, R. Ilaria, I. Conti, J. Cosaert, G.K. Schwartz // *Lancet.* – 2016. – Vol. 388. – № 10043. – P. 488–497.
244. Terme, M. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer / M. Terme, S. Pernot, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, O. Dubreuil, A.F. Carpentier, E. Tartour, J. Taieb // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – № 2. – P. 539–549.
245. Toulmonde, M. Use of PD-1 targeting, macrophage infiltration, and IDO pathway activation in sarcomas a phase 2 clinical trial / M. Toulmonde, N. Penel, J. Adam, C. Chevreau, J.Y. Blay, A. Le Cesne, E. Bompas, S. Piperno-Neumann, S. Cousin, T. Grellety, T. Ryckewaert, A. Bessedé, F. Ghiringhelli, M. Pulido, A. Italiano // *JAMA Oncol.* – 2018. – Vol. 4. – № 1. – P. 93–97.

246. Tseng, W. Novel Systemic Therapies in Advanced Liposarcoma: A Review of Recent Clinical Trial Results / W. Tseng, N. Somaiah, A. Lazar, D.C. Lev, R.E. Pollock // *Cancers (Basel)*. – 2013 – Vol. 5. – № 2. – P. 529–549.
247. Tseng, W.W. Potential for immunotherapy in soft tissue sarcoma / W.W. Tseng, N. Somaiah, E.G. Engleman // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – Vol. 10. – № 11. – P. 3117–3124.
248. Turnis, M. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy / M. Turnis, L. Andrews, D. Vignali // *Eur. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 45. – № 7. – P. 1892–1905.
249. Uehara, T. Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas / T. Uehara, T. Fujiwara, K. Takeda, T. Kunisada, T. Ozaki, H. Udono // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 820813.
250. Verrax, J. Delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) by gene electrotransfer as a new antiangiogenic cancer therapy / J. Verrax, F. Defresne, F. Lair, G. Vandermeulen, G. Rath, C. Dessy, V. Pr at, O. Feron // *Mol. Pharm.* – 2011. – Vol. 8. – № 3. – P. 701–708.
251. Voron, T. Control of the Immune Response by Pro-Angiogenic Factors / T. Voron, E. Marcheteau, S. Pernot, O. Colussi, E. Tartour, J. Taieb, M. Terme // *Front Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – № 70. – P. 1–9.
252. Voron, T. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors / T. Voron, O. Colussi, E. Marcheteau, S. Pernot, M. Nizard, A.-L. Pointet, S. Latreche, S. Bergaya, N. Benhamouda, C. Tanchot, C. Stockmann, P. Combe, A. Berger, F. Zinzindohoue, H. Yagita, E. Tartour, J. Taieb, M. Terme // *J. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 212. – № 2. – P. 139–148.
253. Wang, M. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis / M. Wang, J. Zhao, L. Zhang, F. Wei, Y. Lian, Y. Wu, Z. Gong, S. Zhang, J. Zhou, K. Cao, X. Li, W. Xiong, G. Li, Z. Zeng, C. Guo // *J. Cancer.* – 2017. – Vol. 8. – № 5. – P. 761–773.
254. Ward-Hartstonge, K.A. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response / K.A. Ward-Hartstonge, R.A. Kemp // *Clin. Trans. Immunol.* – 2017. – Vol. 6. – № 9. – P. 1–5.
255. Wei, R. Hepatoma cell-derived leptin downregulates the immunosuppressive function of regulatory T-cells to enhance the anti-tumor activity of CD8 + T-cells / R. Wei, Y. Hu, F. Dong, X. Xu, A. Hu, G. Gao // *Immunol. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 94. – № 4. – P. 388–399.
256. Welte, T. Fatal attraction: TICs and MDSCs / T. Welte, J.M. Rosen, X.H.F. Zhang // *Cell Cycle.* – 2016. – Vol. 15. – № 19. – P. 2545–2546.
257. Winkelstein, A. Interleukin-2-induced lymphoproliferative responses / A. Winkelstein, L.D. Weaver, N. Salva, L.L. Machen // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1990. – Vol. 32. – № 2. – P. 110–116.

258. Wisdom, A.J. Rationale and Emerging Strategies for Immune Checkpoint Blockade in Soft Tissue Sarcoma / A.J. Wisdom, Y.M. Mowery, R.F. Riedel, D.G. Kirsch // *Cancer*. – 2018. – P. 1–11. DOI: 10.1002/cncr.31517.
259. Wong, J.L. IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8<sup>+</sup> T cells to the tumor microenvironment / J.L. Wong, E. Berk, R.P. Edwards, P. Kalinski // *Cancer Res*. – 2013. – Vol. 73. – № 15. – P. 4653–4662.
260. Xie, K. Interleukin-8 and human cancer biology / K. Xie // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2001. – Vol. 12. – № 4. – P. 375–391.
261. Xie, S. Remarkable regression of a lung recurrence from an undifferentiated embryonal sarcoma of the liver treated with a DC vaccine combined with immune cells: A case report / S. Xie, X. Wu, G. Zhang, K. Xu, X. Bian, S. Zhang, Y. Ye // *Cell. Immunol*. – 2014. – Vol. 290. – № 2. – P. 185–189.
262. Yan, W.-L. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy / W.-L. Yan, K.-Y. Shen, C.-Y. Tien, Y.-A. Chen, S.-J. Liu // *Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 9. – № 4. – P. 347–360.
263. Yang, S. Role of TNF-TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications / S. Yang, J. Wang, D.D. Brand, S.G. Zheng // *Front. Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 784. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00784.
264. Yang, J. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity / J. Yang, J. Yan, B. Liu // *Front. Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 978. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00978.
265. Yao, L. Discovery of IL-18 as a novel secreted protein contributing to doxorubicin resistance by comparative secretome analysis of MCF-7 and MCF-7/Dox / L. Yao, Y. Zhang, K. Chen, X. Hu, L.X. Xu // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 9. – P. 1–13.
266. Ye, L.-L. The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8<sup>+</sup> Regulatory T Cells and CD8<sup>+</sup> Effector T Cells / L.-L. Ye, X.-S. Wei, M. Zhang, Y.-R. Niu, Q. Zhou // *Front. Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 583. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00583.
267. Yoon, S.S. Angiogenic Profile of Soft Tissue Sarcomas Based on Analysis of Circulating Factors and Microarray Gene Expression / S.S. Yoon, N.H. Segal, P.J. Park, K.Y. Detwiller, N.T. Fernando, S.W. Ryeom, M.F. Brennan, S. Singer // *J. Surg. Res*. – 2006. – Vol. 135. – № 2. – P. 282–290.
268. Yoshida, G.J. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. / G.J. Yoshida // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. – 2015. – Vol. 34. – № 1. – P. 111. DOI: 10.1186/s13046-015-0221-y.

269. Zhang, Z.M. Antitumor effects and mechanisms of dendritic cells stimulated by sCD40L on ovarian cancer cells in vitro. / Z.M. Zhang, X.M. Yang, C. Zhang, M.J. Zhang, X. Li, F.H. Zhang, S. Kang, S.J. Wang, B.E. Shan // *OncoTargets Ther.* – 2013. – Vol. 6. – P. 503–515.
270. Zhao, J. Selective Depletion of CD4 + CD25 + Foxp3 + Regulatory T Cells by Low-Dose Cyclophosphamide Is Explained by Reduced Intracellular ATP Levels / J. Zhao, Y. Cao, Z. Lei, Z. Yang, B. Zhang, B. Huang // *Cancer Research.* – 2010. – Vol. 70. – № 20. – P. 4850–4858.
271. Zhong, H. Origin and pharmacological modulation of tumor-associated regulatory dendritic cells / H. Zhong, D. Gutkin, B. Han, Y. Ma, A. Keskinov, M. Shurin, G. Shurin // *Int. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 134. – № 11. – P. 2633–2645.
272. Zhu, C. Plasminogen Activator Inhibitor 1 Promotes Immunosuppression in Human Non-Small Cell Lung Cancers by Enhancing TGF- $\beta$ 1 Expression in Macrophage. / C. Zhu, H. Shen, L. Zhu, F. Zhao, Y. Shu // *Cell Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 44. – № 6. – P. 2201–2211.