

ЕФРЕМОВА
Наталья Александровна

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

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

3.2.7 – аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

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

Научные руководители:

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

доктор медицинских наук **Гафтон Георгий Иванович**

Официальные оппоненты:

Кушлинский Николай Евгеньевич – доктор медицинских наук, академик РАН, профессор, заведующий лабораторией клинической биохимии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва)

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, академик РАН, профессор, научный руководитель федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68.

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

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.1.033.01,

доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Саркомы – крайне гетерогенная группа редких, агрессивных злокачественных новообразований мезенхимального происхождения. Они составляют всего 1% от всех злокачественных опухолей человека, но характеризуются высокой смертностью, так как эффективность стандартной терапии сарком по-прежнему остается ограниченной [Grünewald T.G.P. et al., 2020]. Частота сарком в мире составляет в среднем 7,1 случая на 100 тысяч человек в год [Gage M.M. et al., 2019]. В России этот показатель (суммарно по локализациям: кости и мягкие ткани) в 2020 году составил 3,15 случая на 100 тысяч населения [Каприн А.Д. с соавт., 2021]. Хотя современные терапевтические стратегии с использованием таргетных и иммунологических препаратов значительно улучшили выживаемость пациентов с саркомами, прогноз для больных с метастатическим характером заболевания остается неблагоприятным. Понимание процессов, происходящих в опухоли при метастатическом характере заболевания, имеет особенно важное значение для этой категории пациентов и может оказать значительное влияние на исход терапии.

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

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

Степень разработанности темы исследования

Изучение эволюции метастатических опухолей у человека затруднено, поскольку, руководствуясь гуманными принципами, невозможно непрерывно получать биоптаты прогрессирующей опухоли, и необходима разработка модельных систем, в том числе из клеточных линий метастатического происхождения. Несомненно, это имеет некоторые

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

Внутриопухолевая гетерогенность приводит не только к различиям в динамике роста, экспрессии генов, фенотипических маркеров, но и устойчивости к стандартным методам лечения [Allison K.H., Sledge G.W., 2014]. Некоторые фенотипические маркеры, такие как высокоиммуногенные раково-тестикулярные антигены/гены (РТА/РТГ) в настоящее время рассматриваются как диагностические, а также в качестве терапевтических мишеней при целом ряде злокачественных новообразований, в том числе при саркомах. При этом удалось выявить корреляцию между высоким уровнем экспрессии некоторых иммуногенных РТА/РТГ и неблагоприятным прогнозом заболевания [Iura K. et al., 2015]. В то же время, вследствие значительной гетерогенности сарком и выявленного широкого спектра РТА/РТГ, на сегодняшний день существует недостаточно данных по частоте и значимости их экспрессии при этой форме злокачественного новообразования и участия в противоопухолевом иммунном ответе [Iura K. et al., 2017].

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

Универсальные маркеры стволовых клеток опухоли (СКО), такие как CD133 и ALDH1, демонстрируют повышенную активность в различных типах неоплазий и возможно связаны с их метастатическим потенциалом, лекарственной устойчивостью, а также неблагоприятным прогнозом для пациентов [Mallard B.W. et al., 2017; Demir H. et al., 2018]. При этом для сарком в

отношении этих маркеров в подобных исследованиях получены противоречивые результаты [Skubitz K.M. et al., 2019].

Традиционно, способность к ответу на иммунотерапевтическое воздействие базируется на сочетании оценки параметров лимфоидной инфильтрации опухоли и экспрессии маркеров модуляторов иммунологического синапса. Эти показатели продемонстрировали значимость при саркомах мягких тканей (СМТ) и остеогенных саркомах (ОС) в ряде исследований последних лет [Cohen J.E. et al., 2018; Alves P.M. et al., 2019; Lee A.T.J. et al., 2019]. Тем не менее оптимальный маркер эффективности иммунотерапии для сарком по-прежнему не определен, поскольку частота ответа на иммунотерапевтические композиции в исследованиях оказалась значительно ниже, чем определенная экспрессия PD1/PDL1 и уровень лимфоцитарной инфильтрации [Saerens M. et al., 2021]. Кроме того, для количественного определения этих биомаркеров требуются образцы опухоли, которые не всегда доступны. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов может выявить потенциальные биомаркеры, способствующие точному прогнозу, мониторингу ответа на терапию и усовершенствованному подходу к лечению [Hernandez C. et al., 2020]. Идентификация биомаркеров периферической крови, которые коррелируют с ответом на иммунотерапию, обеспечит простой малоинвазивный способ отбора пациентов или может использоваться для мониторинга лечения. Поэтому настоящее исследование представляет несомненный интерес как трансляционное и направленное на поиск альтернативных иммунологических маркеров для разработки эффективного противоопухолевого лечения и прогноза течения метастатических форм сарком.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна исследования

1. Впервые получены и охарактеризованы 56 клеточных линий метастатических СМТ и ОС 16 гистологических подтипов и 83 дочерних клон для клеточного моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Получено

3 патента («Клеточная линия остеогенной саркомы человека 793 OsSar RVV» – патент на изобретение № 2722867 от 04.06.2020; «Клеточная линия эмбриональной рабдомиосаркомы человека 862 RMSar KDD» – патент на изобретение № 2737248 от 26.11.2020; «Клеточная линия синовиальной саркомы человека 716 SS MNV» – патент на изобретение № 2740800 от 21.01.2021).

2. Установлена новая характеристика опухолевой клеточной линии СМТ и ОС – клоногенность, которая оказывает влияние на прогноз заболевания и эффективность иммунотерапии вакциной «CaTeVac».

3. Показана высокая частота встречаемости у больных СМТ и ОС по сравнению с популяцией высокоиммуногенного гаплотипа HLA-A*02 и A*32.

4. Обнаружена связь клоногенности культивируемых клеток СМТ и ОС с увеличением пролиферативной активности, усилением химиорезистентности, увеличением популяции ALDH1⁺клеток.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

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

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

Методология и методы исследования

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Осуществляли хранение, обработку, статистический анализ данных и визуализацию результатов с использованием Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, США), Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и R v.3.6.2. Применяли основные статистические показатели: среднее значение, медиана, минимум, максимум. В случае количественных признаков применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена, для сравнения выборок использовали U-критерий Манна–Уитни и W-критерия Уилкоксона.

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

Основные положения диссертации представлены на V Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2019» (Санкт-Петербург, 20.06–23.06.2019 г.); Втором международном форуме онкологии и радиологии (Москва, 23.09–27.09.2019 г.); V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 16.12–18.12.2019 г.); VI Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2020» (Санкт-Петербург, 25.06–28.06.2020 г.); 12-й Международной мультikonференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома/Системная биология» (Новосибирск, 06.06–10.06.2020 г.); Международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» (Сочи, 25.11–27.11.2020 г.); VII Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2021» (Санкт-Петербург, 21.06–27.06.2021 г.).

Внедрение результатов исследования

Работа проведена в соответствии с планом основных научно-исследовательских направлений отдела онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Результаты работы были внедрены в научно-практическую деятельность подразделения (акт внедрения результатов от 30.11.2021 г.).

Личный вклад автора

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

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

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

Публикации

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

Структура и объем диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Протокол исследования одобрен этическим комитетом института (протокол № 20 от 23 ноября 2017 г.), все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Образцы опухолевой ткани хранили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и использовали в соответствии с Законом о тканях человека от 2004 года. Двадцать четыре пациента (11 мужчин и 13 женщин, средний возраст 39,0 лет [95% ДИ 31,5–46,6]), после хирургического этапа лечения получали иммунотерапию аутологичными компонентами крови с иммунологическим адьювантом – аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac». Пациенты, соответствующие критериям включения в исследование, подписали информированное согласие на проведение иммунотерапии, которая была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Клинические характеристики пациентов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клинические характеристики пациентов, включенных в исследование

| Характеристика | | I этап | II этап | |
|---|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----|
| Количество пациентов, абс. | | 56 | 24 | |
| Средний возраст, лет (диапазон) | | 37,5 [95% ДИ 33,0–42,0] | 39,0 [95% ДИ 31,5–46,6] | |
| Пол | мужской/женский | 30/26 | 11/13 | |
| Стадия | I | 0 | 0 | |
| | II | 0 | 0 | |
| | III | 0 | 0 | |
| | IV | 56 | 24 | |
| Локализация первичного очага | конечность | 38 | 14 | |
| | забрюшинное пространство | 3 | 2 | |
| | туловище | 2 | 2 | |
| | средостение | 2 | 1 | |
| | матка | 4 | 1 | |
| | голова | 2 | 1 | |
| | прочие | 5 | 3 | |
| Лечение на момент забора материала | хирургическое | | 56 | 24 |
| | лучевая терапия | | 27 | 13 |
| | количество линий | 0 | 3 | 0 |
| | химиотерапии | 1 | 11 | 4 |
| | | 2 | 23 | 7 |
| | 3+ | 19 | 13 | |

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

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

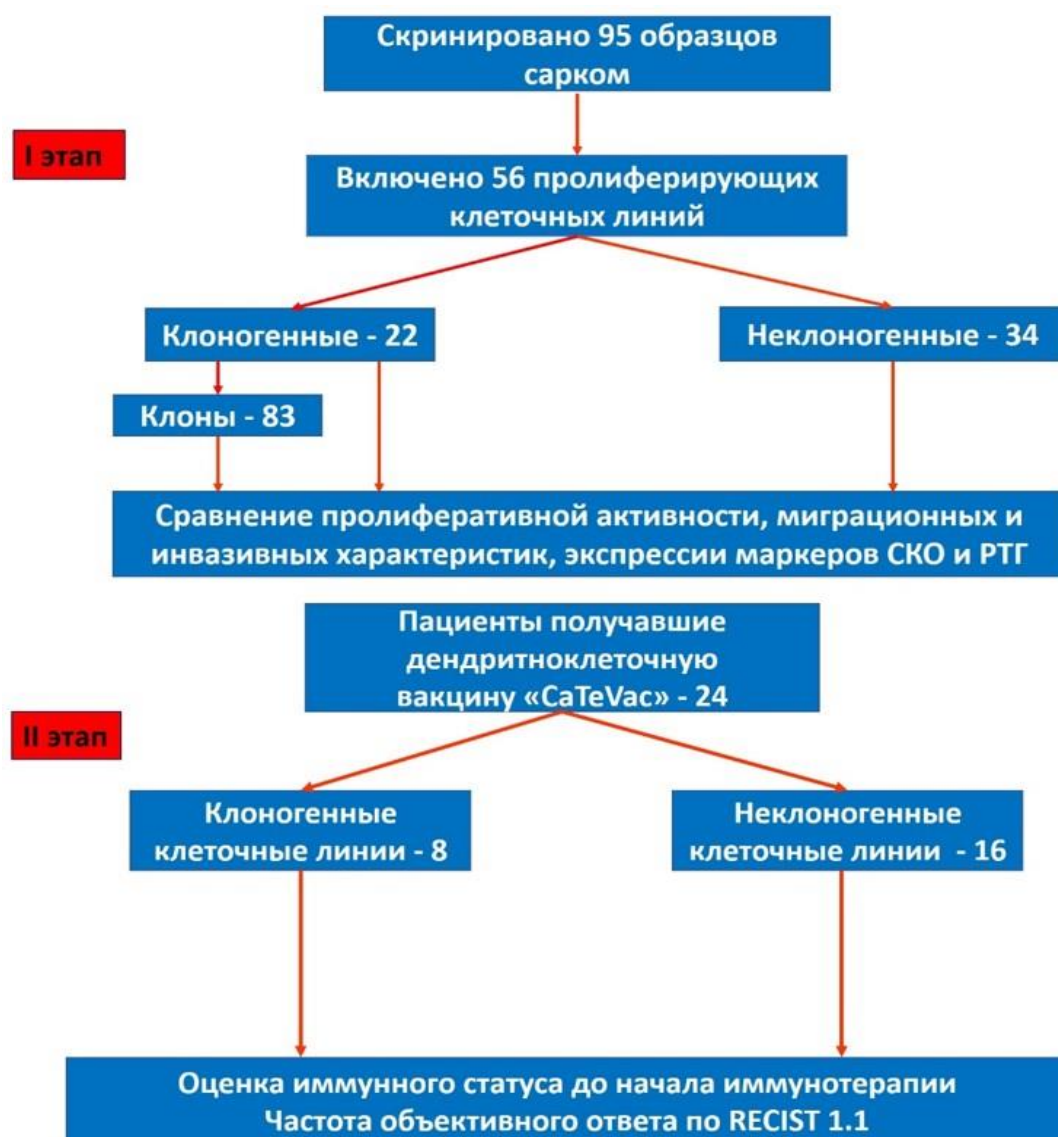


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Культивирование опухолевых клеток осуществляли по методу Freshney в собственной модификации [Данилов А.О. с соавт., 2004]. Морфологию культивируемых клеток изучали методом фазово-контрастной микроскопии в автоматическом клеточном анализаторе Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) и методом конфокальной микроскопии с использованием конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония) и флуоресцентных зондов, окрашивающих ядра (DAPI (Sigma-Aldrich, США)), митохондрии (MitoTracker (Invitrogen, США)), лизосомы (LysoTracker (Invitrogen, США)) и актиновый цитоскелет (Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, США)). HLA-типирование опухолевых культур и мононуклеаров периферической крови пациентов с определением генов HLA I класса осуществляли методом ПЦР-SSP [Nowak J. et al., 2012] с использованием наборов Протранс (Protrans medizinische diagnostische Produkte, Германия). Кинетику роста культивируемых

опухолевых клеток в трехмерных сфероидных структурах изучали методом «висячей капли» [Ryu N.-E. et al., 2019] с использованием прибора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия). Для изучения функциональных характеристик гомогенных сублиний в гетерогенных опухолевых популяциях использовали клонирование методом предельных разведений [Greenfield E.A. et al., 2019]. Пролиферацию опухолевых клеток СМТ и ОС, их инвазивные и миграционные свойства в режиме реального времени изучали с помощью автоматического клеточного анализатора xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США) по изменению импеданса на электродах, который увеличивался с ростом количества пролиферирующих клеток на поверхности специально подобранного планшета.

Для математического анализа полученных данных по автоматически построенным прибором графикам определяли угловой коэффициент линейной зависимости Slope [Chiu C.H. et al., 2017]. Идентифицировали маркеры СКО (CD133, ALDH1) на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США). Уровень экспрессии РТГ: (*GAGE1*, *HAGE*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SLLP1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*), а также референсного гена *Abl* определяли с помощью системы специфических праймеров и зондов на ПЦР-амплификаторе Light Cycler 96 (Roche, Швейцария) [Avdonkina N.A. et al., 2020].

Химиочувствительность опухолевых клеток изучали в МТТ-тесте с использованием химиотерапевтических агентов и их комбинаций, применяемых в клинике. Для СМТ изучено воздействие 2-х комбинаций химиопрепаратов: Доксорубин (Лэнс-фарм, Россия) + Ифосфамид (Холоксан, Бакстер онкология ГмбХ, Германия) и Гемцитабин (Гемцитабин-эбве, Эбве фарма, Австрия) + Доцетаксел (Доцетаксел Сандоз Эбве фарма, Австрия). Для ОС была исследована чувствительность к 4 препаратам: Цисплатин (Цисплатин-Тева, Израиль), Этопозид, (Лэнс-фарм, Россия), Доксорубин и Ифосфамид. Для расчета действующей концентрации препарата использовали информацию о пике концентрации в плазме крови согласно рекомендациям S.E. Salmon (1980). Результаты, полученные в МТТ-тесте, коррелировали с данными, полученными при использовании автоматического клеточного анализатора xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США). Изучали параметры пролиферативной активности клонов сарком в сравнении с клетками исходной опухоли под воздействием химиопрепаратов и их комбинаций.

Были изучены параметры противоопухолевого иммунного ответа у 24 пациентов, которые были включены в трансляционное клиническое исследование изучения эффективности иммунотерапии аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в качестве одного из этапов системного противоопухолевого лечения: количественная оценка в периферической крови В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), активированных ЦТЛ, Т-лимфоцитов хелперов, активированных Т-лимфоцитов хелперов, регуляторных Т-лимфоцитов, NKT- и NK-клеток на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США). Группу разделили по клоногенности опухолевых клеточных линий. Сравнивали показатели популяционного состава иммунокомпетентных клеток в образцах периферической крови пациентов по результатам иммунологического обследования, наиболее приближенного по времени к дате забора опухолевого образца.

Хранение, обработку, статистический анализ данных и визуализацию результатов осуществляли с использованием Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, США), Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и R v.3.6.2. Для сравнения независимых групп по качественным показателям анализировали данные в таблицах сопряженности, применяя статистические критерии: хи-

квадрата Пирсона и точный критерий Фишера. С помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и с использованием коэффициента корреляции Спирмена оценивали достоверность отличий, проводили корреляционный анализ полученных количественных данных в независимых парных выборках. Для проверки нескольких выборок использовали непараметрический дисперсионный анализ и ранговый критерий Краскела–Уоллиса. Для построения кривых общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования использовали метод Каплана–Мейера. Общая выживаемость (ОВ) определена как время между датой операции и датой смерти по любой причине; пациенты, которые были живы, подвергнуты цензуре в последний день наблюдения. Под временем до прогрессирования (ВДП) понимали время от даты операции до появления первых признаков прогрессирования заболевания. У пациентов, получавших иммунотерапию «CaTeVac» оценен эффект терапии по системе RECIST, ОВ и ВДП от начала иммунотерапии. Применяли иерархический кластерный анализ (метод полной связи с Евклидовой метрикой) для выделения кластеров экспрессии РТГ. Количество кластеров определяли автоматически с помощью библиотеки данных «NbClust» в R [Charrad M. et al., 2014]. Во всех случаях значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

В созданной библиотеке клеточные линии были охарактеризованы и описаны с учетом морфологии, пролиферативной активности, миграционной и инвазивной способности, экспрессии антигенов HLA I класса, транскрипционной активности РТГ, относительного содержания в популяции CD133⁺ и ALDH1⁺ стволовых опухолевых клеток, способности к спонтанной агрегации, формированию трехмерных структур и инвазивному потенциалу в 3D-клеточной системе.

Результаты HLA-типирования. В процессе прогрессирования злокачественного новообразования происходит «ускользание» отдельных опухолевых клеток или их комплексов из-под иммунологического надзора. Наиболее частая причина этого – потеря экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA молекул). Кроме того, известно, что различные гаплотипы HLA коррелируют как с риском различных заболеваний, так и с их прогнозом. Показано, что пациенты с метастатической серозной аденокарциномой яичника имеют особенно неблагоприятный прогноз, если у них выявляется генотип HLA-A*02 [Andersson E. et al., 2012]. Обнаружена связь между определенными HLA гаплотипами, в том числе I класса (HLA A/B/C) и риском развития рака шейки матки [Bahls L. et al., 2017].

В нашем исследовании анализ экспрессии HLA I класса в опухолевых культурах и образцах мононуклеаров периферической крови пациентов подтвердил их идентичность и показал высокую частоту встречаемости у пациентов с СМТ и ОС аллелей HLA-A*02 75,9%

(41/54) и A*32 18,5% (10/54), что выше, чем в популяции Северо-Западного региона Российской Федерации: 54,0% ($p=0,008$) и 6,0% ($p=0,016$) соответственно, по данным ресурса Allele Frequency Net Database (AFND) www.allelefrequencys.net. Частота остальных аллелей была сопоставима со средними показателями по региону (рис. 2).

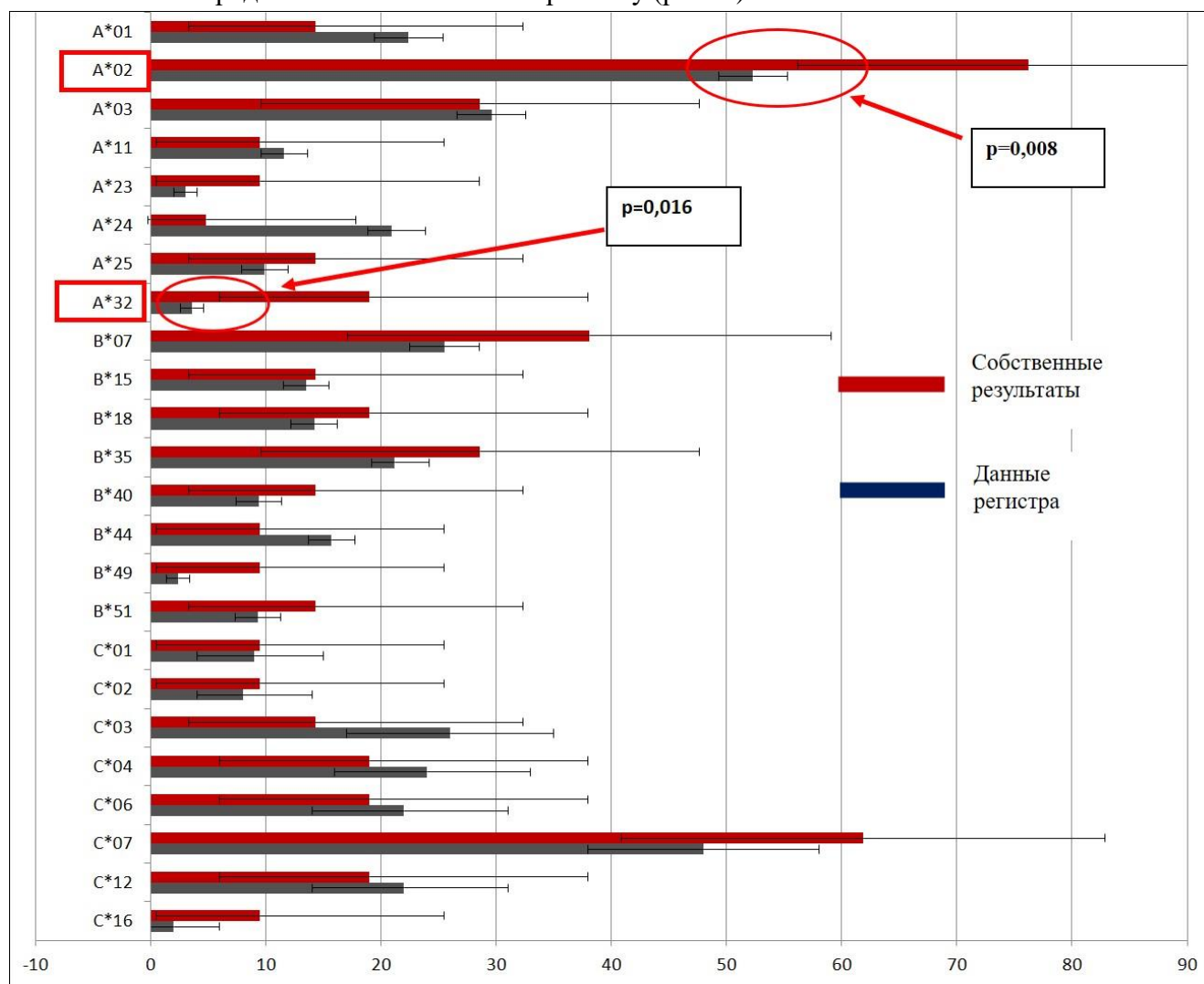


Рисунок 2 – Экспрессия антигенов HLA A/B/C в культурах клеток СМТ и ОС (собственные результаты) и в популяции Северо-Западного региона РФ (данные регистра)

Учитывая число и разнообразие аллелей HLA I класса необходимо с осторожностью относиться к полученным результатам на столь малой выборке, однако несколько исследовательских групп уже продемонстрировали прогностическое и предиктивное влияние HLA генотипа [Rosenbaum E. et al., 2020; Correale P. et al., 2020]. Разнообразие HLA, возможно, определяет различную способность иммунного распознавания, что впоследствии создает различную восприимчивость к опухолевой прогрессии.

С точки зрения иммунологии опухолей, информация об экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости на клеточных линиях злокачественных новообразований является весьма важной, так как при разработке противоопухолевой иммунотерапии часто необходимо создавать модельные системы с определенным типом HLA [Boegel S. et al., 2014].

Клонирование культивируемых клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком. Проведено клонирование всех полученных опухолевых культур, при этом только в 22 случаях

процедура была успешной. Таким образом, 56 клеточных линий по клоногенности были разделены на 2 группы: 1) клоногенные клеточные линии – 39,3% (22/56) и 2) неклоногенные клеточные линии – 60,7% (34/56). В качестве количественной характеристики клоногенности, для клонированных клеточных линий определяли Эффективность Клонирования (ЭК) – отношение числа клеток, сформировавших колонии к общему числу адгезированных одиночных клеток. Среди клоногенных культур ЭК варьировалась от 9,1% в культуре липосаркомы #702 до 93,2% в остеогенной саркоме #924, составляя в среднем 47,5%. В дальнейшем проводили сравнение между группами по различным параметрам. Например, изменения, происходящие в процессе клонирования культуры липосаркомы #702 на 5 пассаже (5p), продемонстрированы на рис. 3.

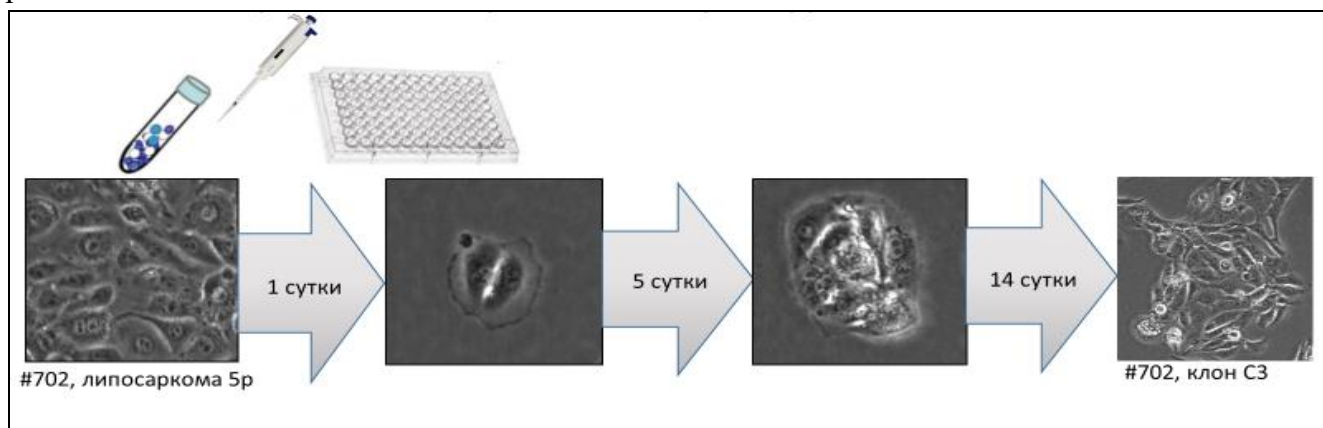


Рисунок 3 – Схема клонирования и рост клона липосаркомы #702 из одной клетки в течение 14 дней культивирования

Образцы опухолей были получены от пациентов, составляющих достаточно однородную группу по типу и характеру опухолевого процесса. Во всех случаях это были метастатические новообразования с высокой степенью злокачественности и низкой степенью дифференцировки. Тем не менее только 39,3% из них обладали способностью к формированию колоний при использовании метода предельных разведений. Способность единичных клеток давать начало опухолевому клону, по всей вероятности, определяется высокой динамической клоной гетерогенностью опухоли [Ellsworth R.E. et al., 2017].

Поликлональный характер опухолевой популяции сарком был подтвержден в ряде исследований, в частности, это показано в работе Gambera S. с соавт. (2018), которые обнаружили, что эволюционный процесс в культуре клеток, полученных из образца опухоли, может иметь нейтральный поликлональный характер с последующим клоным доминированием. В работе приведены доказательства того, что эволюция в саркомах следует нейтральной модели, в которой различные клоны сосуществуют и размножаются одновременно.

Не все клетки, активно растущие в опухолевом очаге, обладают способностью к автономному существованию, и это отражается на эффективности клонирования методом предельных разведений, как это показано в нашем исследовании. Способность образовывать колонии из одной клетки предполагает высокую метаболическую активность и возможность полностью автономной аутокринной регуляции в отличие от неклоногенных опухолей, где, по-видимому, важную роль играют межклеточные взаимодействия и паракринная регуляция. Показано, что аутокринная сигнализация PDGFR/SDF-1 играет существенную роль в эпителиально-мезенхимальном переходе (EMT), способствует пролиферации и инвазии [Bernat-Peguera A. et al., 2019].

Сравнительный анализ пролиферативной активности «родительских» культур сарком и их клонов. В период первых пассажей клеточных культур сарком с высоким или низким клоногенным потенциалом значимых различий в их пролиферации не было обнаружено. В процессе длительного непрерывного культивирования, по мере адаптации к росту на пластике, пролиферативная активность увеличивалась ($p=0,0004$) (рис. 4А). При сравнении интенсивности пролиферации опухолевых культур и их клонов отмечен рост пролиферативной активности клонов по сравнению с исходными культурами ($p=0,0003$) (рис. 4Б).

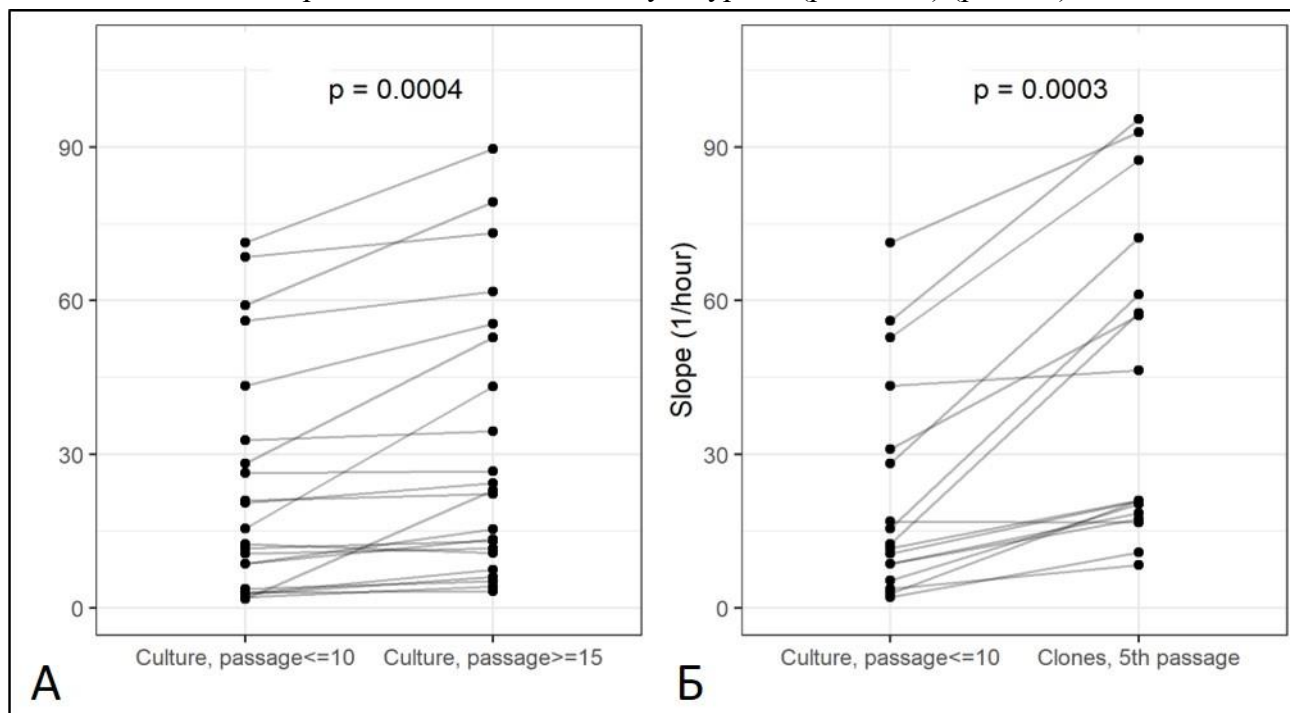


Рисунок 4 – Сравнение пролиферативной активности: А – клеточных культур сарком на разных пассажах в процессе длительного культивирования; Б – «родительских» культур и их клонов (Клеточный анализатор xCelligence, ACEA Bioscience Inc., США), 96 ч наблюдения

Медианное значение Slope для исходных опухолевых культур составило $12,5 \cdot 10^{-3}$ (min $2,1 \cdot 10^{-3}$ – max $71,3 \cdot 10^{-3}$), для клонов $31,9 \cdot 10^{-3}$ (min $6,3 \cdot 10^{-3}$ – max $184,7 \cdot 10^{-3}$), ($p=0,0003$). Выявленное увеличение пролиферативной активности опухолевых культур в процессе длительного культивирования можно объяснить, как адаптацией к росту в монослое, так и последовательными изменениями в опухолевых клетках, характерными для линейного эволюционного процесса. При этом, в отсутствии тормозящего влияния иммунной системы организма, преимущества получают клетки с максимальной скоростью роста. За время длительного культивирования (10–18 мес.) скорость пролиферации увеличивалась постепенно и не более чем на 17,0% от исходного значения.

Таким образом, полученные *in vitro* клоны СМТ и ОС в нашем исследовании показали значимые различия в пролиферативной активности, которая в ряде случаев была в 2 раза выше, чем у исходных клеточных культур. Это свидетельствует об ускорении эволюционных процессов в ходе клонирования.

Изучение миграционной и инвазивной активности клоногенных и неклоногенных опухолевых культур сарком. Миграционная активность клоногенных опухолевых культур была выше по сравнению с неклоногенными культурами [медианные значения Slope $51,35 \cdot 10^{-3}$

(min $5,48 \cdot 10^{-3}$ – max $203,6 \cdot 10^{-3}$) и $31,1 \cdot 10^{-3}$ (min $4,8 \cdot 10^{-3}$ – max $133,3 \cdot 10^{-3}$) соответственно ($p=0,04$) (рис. 5А). Инвазивная способность клеточной популяции клоногенных культур также была несколько выше [медианные значения Slope $47,5 \cdot 10^{-3}$ (min $17,6 \cdot 10^{-3}$ – max $129,4 \cdot 10^{-3}$), чем в неклоногенных культурах ($34,6 \cdot 10^{-3}$ (min $9,2 \cdot 10^{-3}$ – max $109,9 \cdot 10^{-3}$)] ($p=0,05$) (рис. 5Б).

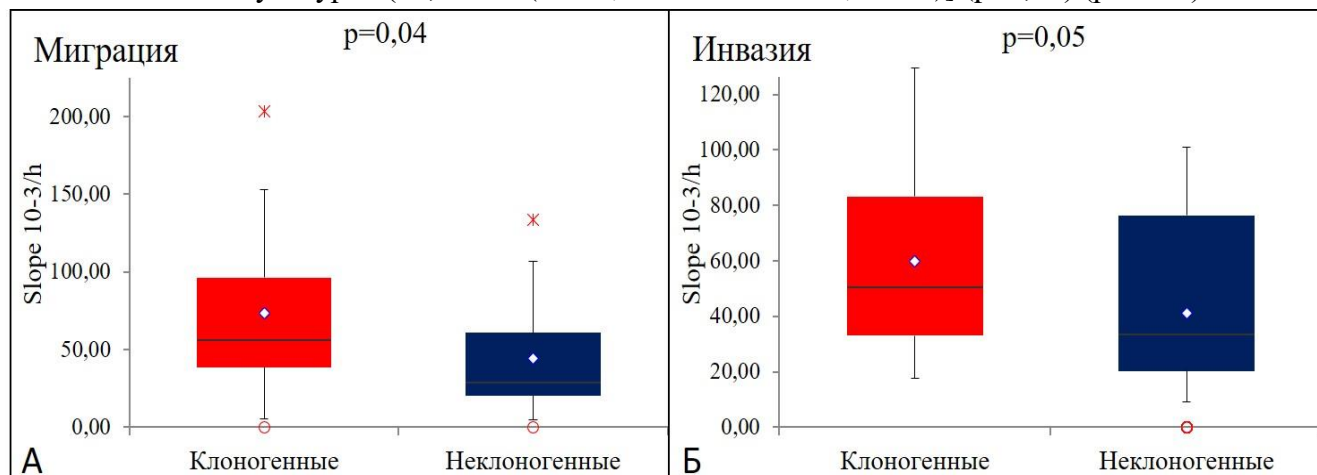


Рисунок 5 – Сравнительный анализ: А – миграционной; Б – инвазивной активности культур клоногенных и неклоногенных сарком (Клеточный анализатор xCelligence, ACEA Bioscience Inc., США), 96 ч наблюдения

Анализ маркеров стволовых клеток опухоли в культурах клоногенных и неклоногенных сарком. Активность ALDH1 в группе клоногенных сарком была выше, чем в группе неклоногенных ($p=0,02$) (рис. 6А). Медианное значение экспрессии ALDH1 в этой группе составило – 20,3% (min 1,4% – max 52,5%), в группе неклоногенных опухолей – 5,0% (min 1,1% – max 23,2%). При этом нами не было обнаружено взаимосвязи между содержанием стволовых опухолевых клеток с экспрессией CD133+ и клоногенным потенциалом опухолевых культур ($p=0,3$) (рис. 6Б).

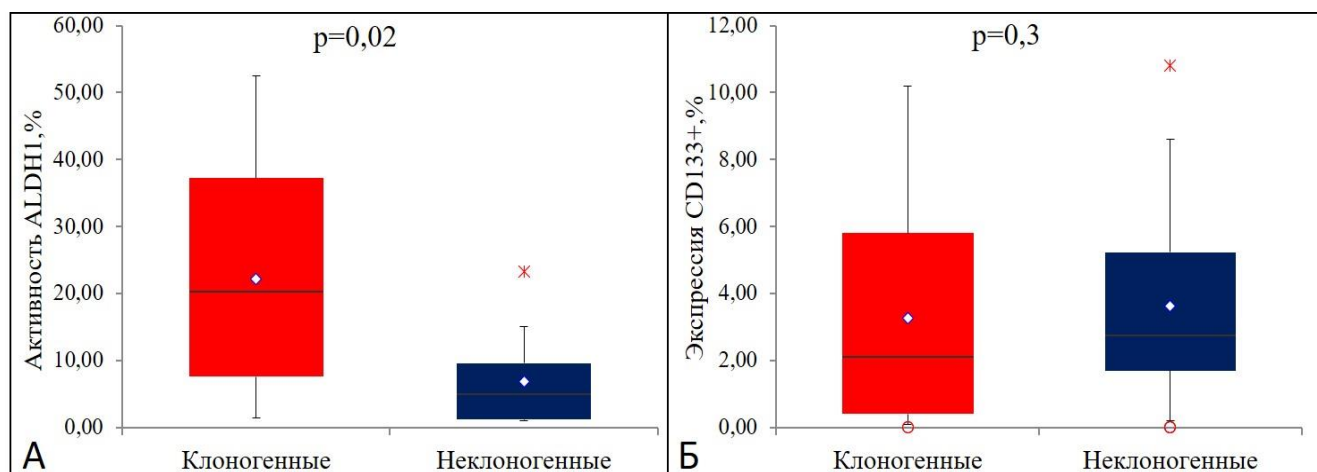


Рисунок 6 – Графическое изображение различия в экспрессии маркерных молекул стволовых опухолевых клеток: А – ALDH1; Б – CD133 в культурах клоногенных и неклоногенных сарком (Проточный цитофлюориметр BD FACS Canto™ II, BD Biosciences, США)

Выявленные закономерности позволяют предположить важность участия $ALDH1^{+}$ клеток в процессах независимого клеточного роста и активации пролиферативного потенциала. В последние десятилетия все больше исследований подтверждают роль ALDH1 в качестве

биологического маркера СКО, а также индикатора неблагоприятного клинического исхода, как в экспериментальных моделях, так и в клинике. Существуют предположения, что опухолевые клетки с подобными особенностями ответственны, по крайней мере частично, за внутриопухолевую гетерогенность на метастатическом уровне [Gresco N. et al., 2014]. В настоящее время доказана способность ALDH1 к антиоксидантной и субстрат-специфической инактивации лекарственных средств, стимуляции пролиферативной активности опухолевых клеток путем влияния на сигнальный путь рецептора ретиноевой кислоты [Kulsum S. et al., 2017]. Показана взаимосвязь между высокой активностью ALDH1 и метастатическим потенциалом для различных солидных новообразований, в том числе для остеогенной саркомы [Mu X. et al., 2015].

Белок CD133 также рассматривается в качестве универсального маркера СКО. Изучение экспрессии CD133 в нашем исследовании позволило выявить вариабельность содержания CD133⁺ клеток в пределах от 0,2% до 17,7%. При этом опухолевые культуры не демонстрировали взаимосвязь между количеством CD133⁺ клеток и клоногенностью. Не было выявлено корреляции между экспрессией CD133, общей и безрецидивной выживаемостью пациентов, включенных в исследование.

В настоящее время роль данной субпопуляции клеток в процессах метастазирования и формирования лекарственной устойчивости носит дискуссионный характер. С одной стороны, показано, что высокая экспрессия этого маркера связана с метастатическим потенциалом опухоли и устойчивостью к терапии [Batlle E. et al., 2017]. С другой стороны, есть исследования, где оспаривается клиническая полезность маркера CD133 при саркомах. Так, К.М. Skubitz с соавт. (2019) изучили маркеры СКО (ALDH1, CD44, CD133) в образцах СМТ до и после химиотерапии, не выявив существенных различий в их экспрессии. Вместе с тем авторы обнаружили высокую экспрессию маркеров СКО в инфильтрирующих опухоль макрофагах, что может снижать диагностическую и прогностическую ценность предыдущих исследований, выполненных на иммуногистохимически окрашенных срезах опухолей. Необходимо также отметить, что ЭК в нашем исследовании, которую мы определяли, как процентное отношение числа клеток, сформировавших колонии к общему числу адгезированных одиночных клеток не соответствовала уровню экспрессии маркеров СКО. Так, например, в клоногенной клеточной линии миксофибросаркомы #678 с минимальным числом ALDH-позитивных клеток (1,4%) эффективность клонирования составила 26,1%, а в клеточной линии клоногенной миксофибросаркомы #982 с экспрессией CD133 в 0,5% клеток – 41,9% обладали способностью к пролиферации при клонировании. Таким образом, можно предположить, что ценность маркеров СКО, по крайней мере для СМТ и ОС, либо несколько преувеличена, либо, что более вероятно, в настоящее время не определены релевантные маркеры СКО для этой группы опухолей.

Изучение экспрессии генов высокоиммуногенных раково-тестикулярных антигенов в клеточных линиях клоногенных и неклоногенных сарком. В культурах клеток СМТ и ОС отмечена высокая степень гетерогенности транскрипционной активности изучаемых РТГ: min 0,0001 – max 8,57. В культурах клеток сарком чаще детектировали активность генов *PRAME* и *GAGE1*. Клеточные линии СМТ экспрессировали *PRAME* в 51,4% случаев (19/37), *GAGE1* – в 45,9% (17/37). В группе ОС экспрессия *PRAME* составила 66,7% (10/15), *GAGE1* – 60,0% (9/15). Впервые в клетках сарком выявлена экспрессия генов *SLLP1* и *PASDI*. Их чаще детектировали в клетках ОС – 53,3% (8/15) и 33,3% (5/15), чем в СМТ – 27,0% (10/37) и 29,7 (11/37) соответственно. При этом экспрессия *PASDI* коррелировала как с *GAGE1* ($\rho=0,6951$;

$p=0,00001$), так и с *PRAME* ($\rho=0,5743$; $p=0,00001$). Реже отмечали транскрипционную активность *NY-ESO-1* и *MAGE A1*: 16,2% (6/37) и 18,9% (7/37) для культур СМТ, 6,7% (1/15) и 13,3% (2/15) – для культур ОС соответственно. Обнаружена коэкспрессия этих генов ($\rho=0,4027$; $p=0,00308$) в культурах сарком.

Мы исключили три РТГ (*HAGE*, *SEMG1* и *SCP1*) в связи с их низкой активностью в опухолевых клеточных линиях сарком и провели кластерный анализ клоногенных, неклоногенных клеточных линий и их клонов (рис. 7).

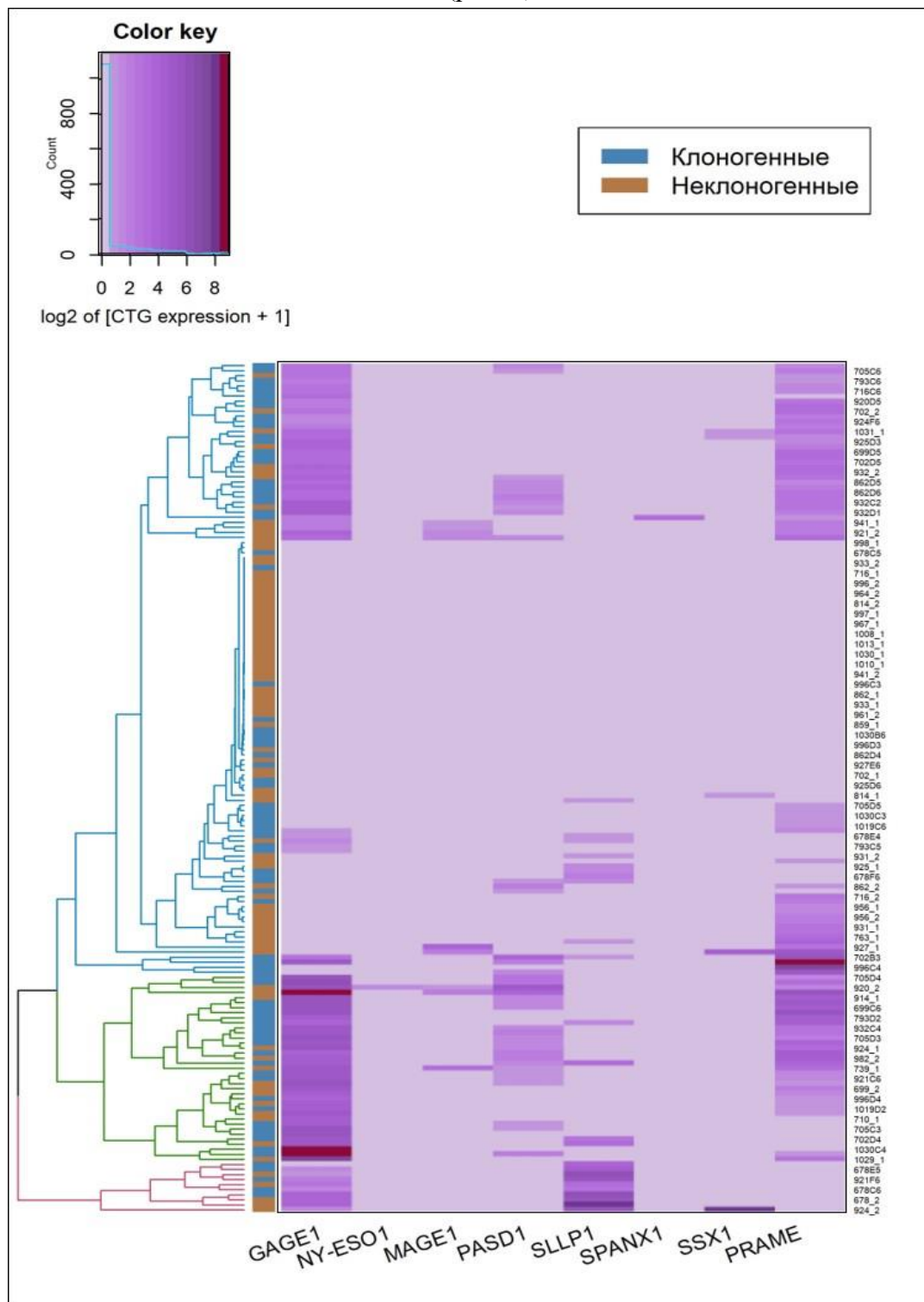


Рисунок 7 – Тепловая карта различий экспрессии РТГ в клеточных линиях СМТ и ОС и их клонах

При анализе экспрессии РТГ выявлено 3 кластера. В *первом кластере* объединены клеточные линии с низким и средним уровнем транскрипционной активности, а также с отсутствием экспрессии изучаемых генов. При этом отчетливо выделяется верхняя часть кластера, в которой представлены клоны с коэкспрессией генов *PRAME* и *GAGE1*, тогда как в нижней его части оказались в основном неклоногенные образцы. *Второй кластер* составили клеточные линии с высоким уровнем экспрессии *GAGE1* и его коэкспрессией с генами *PASD1* и *PRAME*. В этой группе оказалось максимальное количество клонов сарком. В *третьем кластере* преобладали клоногенные культуры и клоны с высоким уровнем транскрипционной активности *SLLP1* в сочетании с *GAGE1*.

Отсутствие минимальной транскрипционной активности изученных РТГ было выявлено в 26,7% (8/30) неклоногенных сарком, в 9,1% (2/22) – клоногенных сарком и в 1,2% (1/83) – клонов ($p < 0,05$). Было обнаружено, что в процессе длительного культивирования экспрессия РТГ менялась различно: в одних культурах отмечали рост показателей и увеличение репертуара экспрессируемых РТГ, в других – снижение до полного исчезновения. Клоны демонстрировали большее разнообразие уровней экспрессии РТГ по сравнению с исходными культурами. Различия выявлены по уровню экспрессии гена *GAGE1* в группах клоногенных и неклоногенных сарком ($p = 0,03$) (рис. 8А) и по экспрессии гена *SLLP1* ($p = 0,04$) (рис. 8Б).

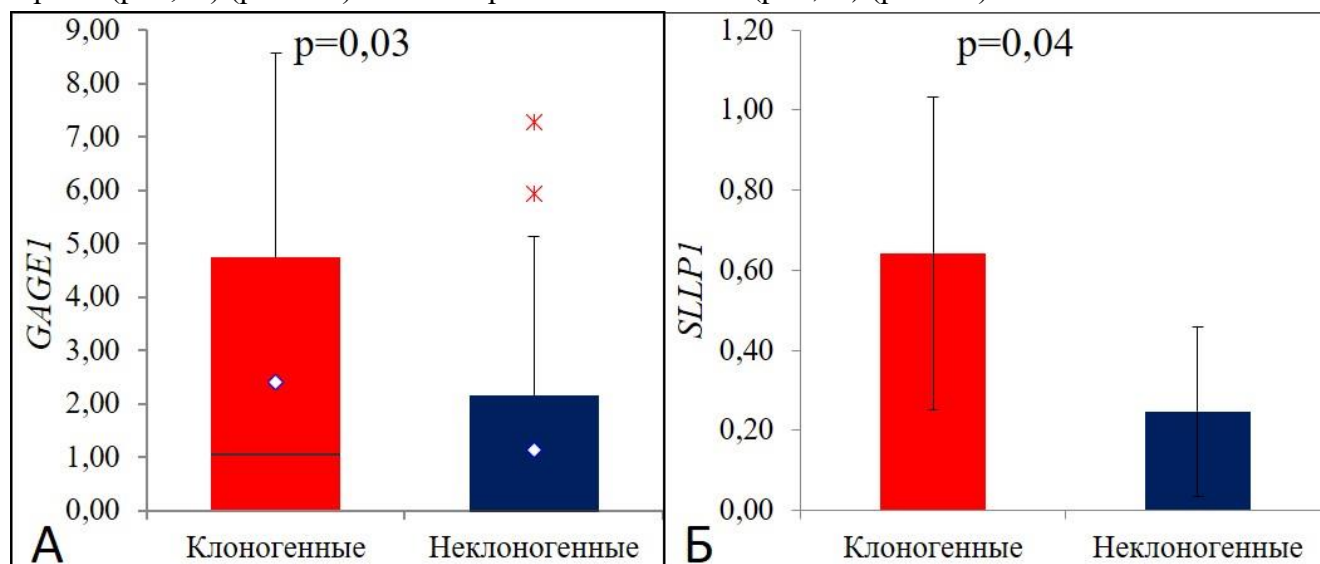


Рисунок 8 – Анализ экспрессии РТГ в клоногенных и неклоногенных культурах СМТ и ОС А – по уровню экспрессии гена *GAGE1*; Б – по уровню экспрессии гена *SLLP1*

Для других РТГ (*NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*) подобных закономерностей не установлено. Участия этих генов в эволюционных процессах сарком требует дальнейшего изучения. Рост транскрипционной активности РТГ в ходе длительного культивирования и при клонировании может быть обусловлен увеличением пролиферативного потенциала иммуногенных опухолевых клеток при отсутствии элиминирующего воздействия иммунной системы в условиях *in vitro*. Также интересной представляется регистрация экспрессии в клонах сарком новых иммуногенных РТГ, отсутствовавших в исходных клеточных линиях. Это может отражать дальнейшую эволюцию метастатических образований с усилением экспрессии эмбриональных РТГ у одного пациента с индивидуальными биологическими особенностями.

Анализ химиорезистентности клеточных линий сарком и их клонов. Клоногенные клеточные линии СМТ и ОС в нашем исследовании отличались ожидаемо высокой химиорезистентностью. При этом чувствительность клеток к режимам, рутинно используемым в клинике, оказалась различной. В терапевтическом режиме к препаратам схемы АI продемонстрировали чувствительность 27,3% клеточных линий СМТ, к препаратам схемы GemTax – 18,2%. Все культивируемые клетки ОС оказались резистентными к терапевтическим концентрациям ифосфамида, цисплатина и этопозида. Только Доксорубицин в терапевтической концентрации оказал токсическое воздействие на опухолевые клетки в 33,3% случаев. По разным данным, чувствительность МТТ-теста для оценки химиорезистентности опухолевых клеток составляет более 90,0%, при специфичности – не более 50,0% [Чернов А.Н. с соавт., 2018]. Это затрудняет подбор препаратов для терапии с использованием клеточных линий из образцов опухоли пациентов. При длительном культивировании и клонировании во всех случаях регистрировался рост химиорезистентности опухолевых клеток ($p < 0,05$), что всегда сопровождалось увеличением пролиферативной активности. Одновременно происходило изменение экспрессии РТГ. Наши наблюдения согласуются с результатами Francipane M.G. с соавт. (2019), которые показали, что клональный отбор приводит к образованию более агрессивных и химиорезистентных опухолевых клонов с иным паттерном экспрессии генов.

В ряде случаев опухолевые клетки и их клоны были резистентными к десятикратному увеличению стандартной дозы препаратов. Например, клеточная линия миксофибросаркомы #924 продемонстрировала чувствительность к стандартным дозам препаратов схемы АI и 100% гибель к высоким дозам химиопрепаратов этой схемы. Однако ее клон #924С3 оказался резистентным ко всем использованным дозам. При этом к комбинации препаратов схемы GemTax клеточная линия #924 и ее клон оказались резистентными как к стандартной, так и к десятикратно превышающей терапевтическую дозу, показывая даже ускорение пролиферативной активности по сравнению с контролем при добавлении стандартной дозировки GemTax (рис. 9).

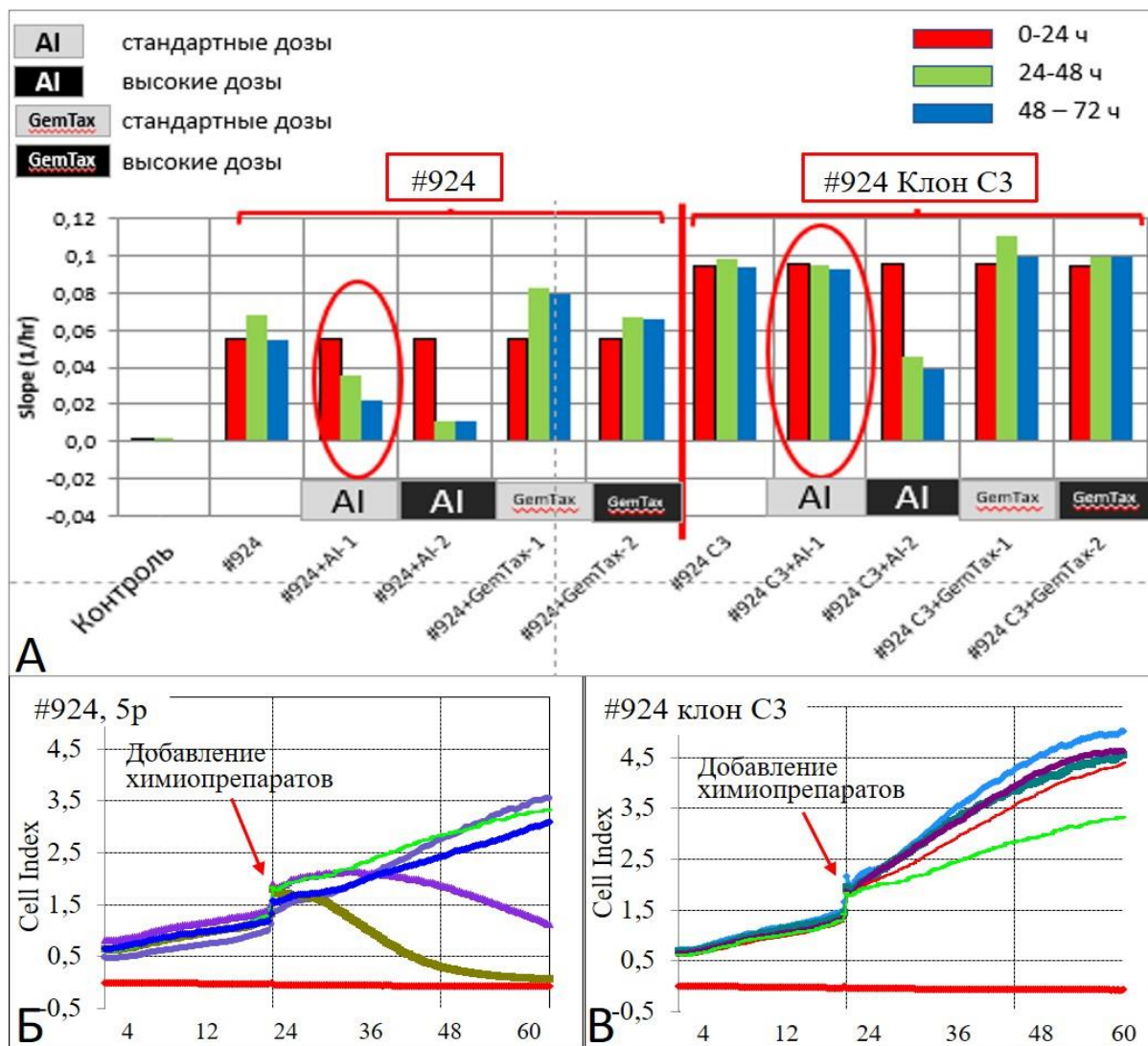


Рисунок 9 – Пролиферативная активность клеточной линии миксофибросаркомы #924 (А, Б) на 5-м пассаже и ее клона #924 С3 (А, В) в присутствии композиций AI (Доксорубицин + Ифосфамид) и GemTax (Гемцитабин + Доцетаксел). Стрелка – внесение химиотерапевтических агентов в систему; серый цвет – воздействие химиотерапевтических композиций AI и GemTax в стандартных дозах (эквивалентных терапевтическим); черный – высокие дозы химиопрепаратов AI и GemTax (10-кратно превышающие терапевтические)

Анализ взаимосвязи между клоногенностью клеточных культур и клиническими характеристиками пациентов. При анализе времени до прогрессирования у пациентов с СМТ и ОС, из образцов опухоли которых были получены клоногенные и неклоногенные клеточные линии (группа 1 и группа 2 соответственно), статистически значимые различия не обнаружены, $p=0,3$ (рис. 10А). Однако у пациентов этих групп выявлены значимые различия показателей общей выживаемости, $p=0,008$ (рис. 10Б). В группе с клонируемыми клеточными линиями медиана ОВ составила 9 мес., в группе с неклонируемыми – 27,3 мес.

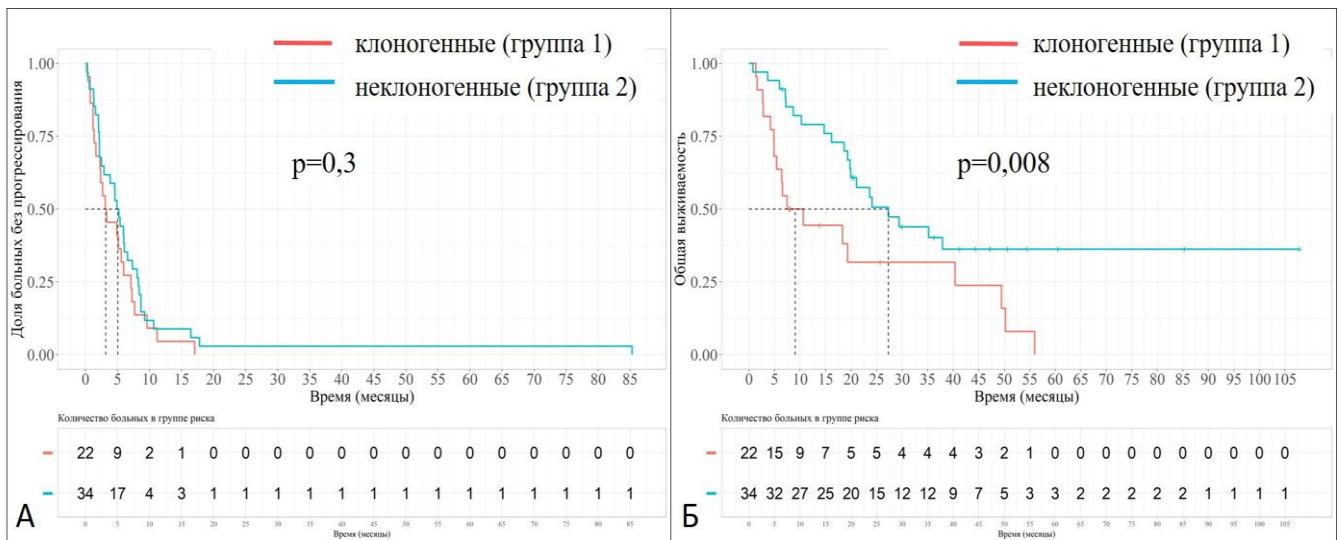


Рисунок 10 – Взаимосвязь клоногенности опухолевых клеток и клинических характеристик опухолевого процесса: А – времени до прогрессирования; Б – общей выживаемости

Оценка эффективности иммунотерапии аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» у больных с саркомами, в зависимости от клоногенных характеристик клеточных линий, полученных из опухолевого материала пациентов. Анализ исходов заболевания у пациентов с образцами опухоли клоногенного и неклоногенного характера, в соответствии с полученными клеточными линиями, выявил различия ОВ в группе пациентов, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» $n=24$ ($p=0,046$). Изменения общей выживаемости могут быть связаны с выявленной *in vitro* высокой пролиферативной активностью, миграционной способностью и химиорезистентностью клоногенных сарком. В случае иммунотерапии аутологичной вакциной «CaTeVac», обнаруженная экспрессия различных РТГ, с одной стороны, создает потенциал для ее эффективности, но, с другой стороны, гетерогенность экспрессии РТГ в опухоли приводит к быстрому истощению возможностей иммунной системы.

При оценке клинической эффективности иммунотерапии аутологичной вакциной «CaTeVac», с использованием критериев RECIST полных и частичных регрессов, зарегистрировано не было, объективный клинический эффект в виде стабилизации заболевания отмечен в 41,7% случаев (10/24). Прогрессирование наблюдалось у 58,3% больных (14/24). При сравнении клинической эффективности иммунотерапии вакциной «CaTeVac» у пациентов 2-х групп (клоногенные и неклоногенные клеточные линии) обращает внимание тот факт, что прогрессирование опухолевого процесса через 2 мес. от начала лечения зарегистрировано у 87,5% (7/8) пациентов 1-й группы и у 43,8% (7/16) пациентов 2-й группы. Отмечается статистически значимая связь между фактором риска (клоногенностью) и прогрессированием заболевания: Хи-квадрат Пирсона составил 4,2 ($p = 0,04$). Медиана времени до прогрессирования у пациентов группы 1 составила 2,5 мес., в группе 2 – 6,7 мес. ($p=0,3$) (рис. 11А). Медиана ОВ в группе с клоногенными клеточными линиями составила 6,4 мес, против 28,3 мес в группе с неклоногенными клеточными линиями ($p=0,046$) (рис. 11Б).

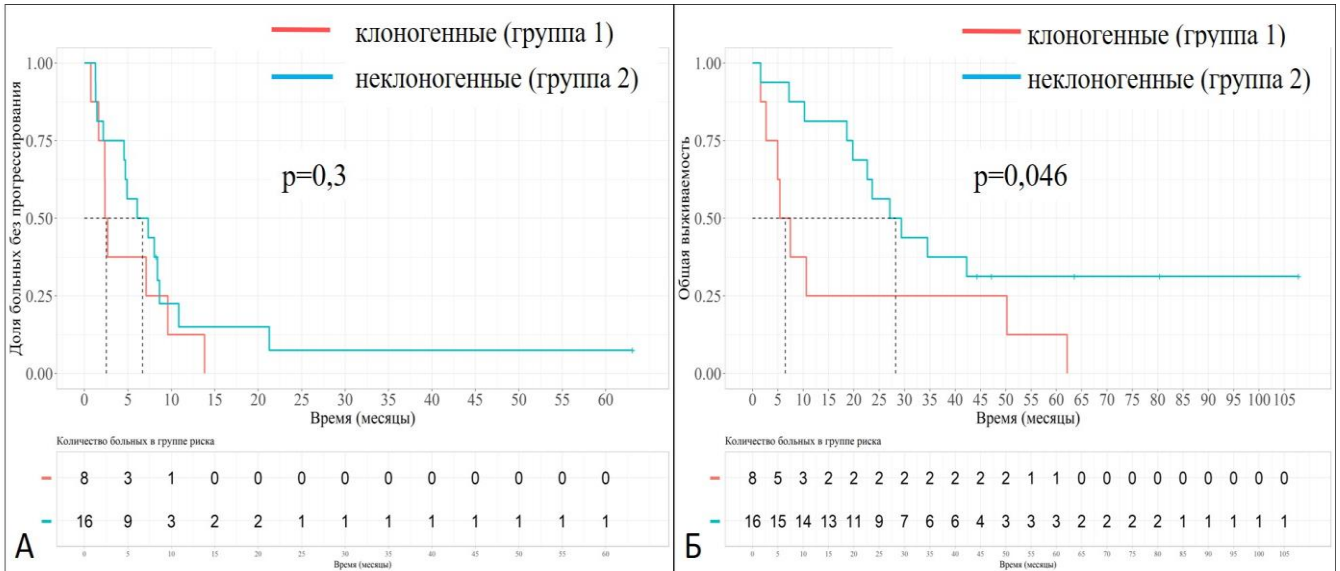


Рисунок 11 – Анализ времени до прогрессирования (А) и общей выживаемости (Б) у пациентов, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в группе 1 и группе 2 (клоногенные и неклоногенные клеточные линии)

Анализ субпопуляций иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных с саркомами, получавших иммунотерапию аутологичной дендритноклеточной вакциной «CaTeVac» в зависимости от клоногенных характеристик в группах 1 и 2. При анализе субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных, клеточные линии которых отличались клоногенностью (группа 1), было обнаружено сниженное содержание ЦТЛ, активированных ЦТЛ с фенотипом CD3+CD8+HLA-DR+, активированных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3+CD4+HLA-DR+ ($p < 0,05$) и увеличенное количество естественных киллеров (NK-клеток) ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами группы 2 (неклоногенные клеточные линии) (табл. 2). Пациенты группы 1 отличались от пациентов группы 2 сниженным содержанием ЦТЛ, активированных ЦТЛ и активированных Т-лимфоцитов хелперов, что может свидетельствовать об истощении популяции этих клеток, вызванном высокой гетерогенностью опухоли, в том числе по уровню экспрессии РТГ. Высокое содержание естественных киллеров может отражать снижение экспрессии молекул HLA I класса опухолевыми клетками, что закономерно приводит к уклонению опухоли от Т-клеточного иммунологического надзора и способствует прогрессированию заболевания [Seliger B. et al., 2016].

Таблица 2 – Показатели субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток в крови пациентов с клоногенными и неклоногенными саркомами

| Характеристика | Количественное значение медиана (min–max) | | Тест Манна–Уитни, р |
|---|---|------------------|---------------------|
| | Клоногенные | Неклоногенные | |
| В-лимфоциты CD3-CD19+, *10 ⁹ /л | 0,09 (0,004-0,3) | 0,1 (0,002-0,5) | 0,3 |
| В-лимфоциты CD3-CD19+,% | 7,5 (0,4-19,8) | 7,8 (0,5-22,5) | 0,3 |
| Т-лимфоциты CD3+CD19-, *10 ⁹ /л | 0,9 (0,3-1,4) | 1,1 (0,3-1,8) | 0,2 |
| Т-лимфоциты CD3+CD19-, % | 75,5 (54,1-83) | 76,8 (54-87) | 0,2 |
| ЦТЛ CD3+CD8+, *10 ⁹ /л | 0,3 (0,1-0,5) | 0,5 (0,1-1) | 0,03 |
| ЦТЛ CD3+CD8+,% | 23,5 (14,8-37) | 32,3 (24-46,4) | 0,003 |
| Активированные ЦТЛ CD3+CD8+HLA-DR+, *10 ⁹ /л | 0,02 (0,009-0,09) | 0,2 (0,03-0,7) | 0,001 |
| Активированные ЦТЛ CD3+CD8+HLA-DR+,% | 2,7 (0,4-7,7) | 11 (4,1-31) | 0,0002 |
| Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+, *10 ⁹ /л | 0,6 (0,1-0,8) | 0,6 (0,2-0,9) | 0,5 |
| Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+% | 44 (30,5-49) | 39,4 (29,5-48,5) | 0,1 |
| Активированные Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+HLA-DR+, *10 ⁹ /л | 0,02 (0,007-0,3) | 0,08 (0,02-0,2) | 0,01 |
| Активированные Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+HLA-DR+,% | 2,2 (0,5-16,1) | 5,4 (3,3-10,8) | 0,01 |
| Регуляторные Т-лимфоциты CD4+CD25brightCD127+, *10 ⁹ /л | 0,04 (0,02-0,07) | 0,05 (0,02-0,1) | 0,3 |
| Регуляторные Т-лимфоциты CD4+CD25brightCD127+,% | 8,2 (5,8-13) | 8,8 (5,2-14,9) | 0,3 |
| НКТ-клетки, НКТ-подобные лимфоциты CD3+CD16+CD56+, *10 ⁹ /л | 0,07 (0,01-0,1) | 0,04 (0,002-0,2) | 0,4 |
| НКТ-клетки, НКТ-подобные лимфоциты CD3+CD16+CD56+,% | 5,4 (1,1-11,6) | 5 (0,3-14,7) | 0,4 |
| Естественные киллеры НК-клетки CD3-CD16+CD56+, *10 ⁹ /л | 0,1 (0,1-0,4) | 0,1 (0,01-0,4) | 0,02 |
| Естественные киллеры НК-клетки CD3-CD16+CD56+,% | 13,5 (9,5-20) | 8,3 (2-16,6) | 0,03 |

Таким образом, представленные данные свидетельствуют об установлении клоногенности как новой характеристики опухолевых клеток СМТ и ОС, характеризующей саркомы способные к изолированному росту в системе *in vitro*, отличающиеся высокой пролиферативной и миграционной способностью, химиорезистентностью к стандартным терапевтическим композициям, повышенным содержанием ALDH1+ клеток, транскрипционной активностью генов высокоиммуногенных РТА (*GAGE1*, *SLLP1*). Пациенты, опухолевые клетки которых демонстрируют клоногенные характеристики отличаются низкой общей выживаемостью как при использовании стандартных терапевтических подходов, так и с применением иммунотерапии аутологичной вакциной «CaTeVac». Субпопуляционный состав клеток в этой группе характеризуется низким содержанием ЦТЛ, активированных ЦТЛ с фенотипом

CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺, активированных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, высоким уровнем NK-клеток CD3⁻CD16⁺CD56⁺.

ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция из 56 охарактеризованных клеточных линий метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком.

2. Выявлено 2 типа клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком: клоногенные (39,3%; 22/56) и неклоногенные (60,7%; 34/56).

3. Обнаружено, что в процессе селекции появляются значимые различия биологических свойств клеток СМТ и ОС: пролиферативной, миграционной способности, относительного содержания ALDH1⁺клеток, транскрипционной активности генов высокоиммуногенных раково-тестикулярных антигенов *GAGE1*, *SLLP1* ($p < 0,05$). Селекция клеток СМТ и ОС приводит к увеличению химиорезистентности по сравнению с исходными клеточными линиями ($p < 0,05$).

4. Установлен наиболее часто встречающийся высокоиммуногенный гаплотип HLA-A*02 (75,9%) и A*32 (18,5%) в клетках СМТ и ОС по сравнению с таковым в общей популяции ($p < 0,05$).

5. Установлены значимые различия общей выживаемости пациентов с клоногенными и неклоногенными клеточными линиями СМТ и ОС как в общей группе (медиана ОВ составила 9 и 27,3 мес., соответственно, $p = 0,008$), так и среди пациентов, получавших иммунотерапию вакциной «CaTeVac» (6,4 и 28,3 мес., соответственно, $p = 0,046$).

6. Обнаружены различия динамики иммунологических показателей периферической крови пациентов с СМТ/ОС в зависимости от клоногенности опухолевых клеток. В группе больных с клоногенными клеточными линиями отмечено низкое содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺, активированных Т-лимфоцитов хелперов CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, высокий уровень NK-клеток CD3⁻CD16⁺CD56⁺, $p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВДП – время до прогрессирования

МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

ОВ – общая выживаемость

ОС – остеогенные саркомы

ПЦР/SSP – полимеразная цепная реакция со специфичными праймерами

РТА/РТГ – раково-тестикулярные антигены/гены

СМТ – саркомы мягких тканей

СКО – стволовые клетки опухоли

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЭК – эффективность клонирования

ALDH1 – альдегиддегидрогеназа 1, маркер стволовых клеток опухоли

CD133 – проминин-1, маркер стволовых клеток опухоли

НК – естественные киллеры (natural killer cells)

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современные представления о клональной эволюции сарком / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева // Вопросы онкологии. – 2019. – Т. 6. – № 6. – С. 798–806. – doi: 10.37469/0507-3758-2019-65-6.

2. Получение и характеристика новых клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком для трансляционных исследований / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, В.А. Мисюрин, Е.А. Просекина, Н.В. Емельянова, Т.Л. Нехаева, О.В. Скачкова, А.В. Новик, Н.П. Пипиа, Г.И. Гафтон, Е.В. Левченко, А.М. Беляев, И.А. Балдуева // Гены & клетки. – 2020. – Т. 15. – № 3. – С. 92–107. – doi: 10.23868/202011014.

3. Сравнительный анализ миграционной активности и инвазивного потенциала культивируемых клеток солидных опухолей человека / А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, В.А. Мисюрин, Н.А., Авдонкина, Н.В. Емельянова, И.А. Балдуева // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т. 19. – № 3. – С. 64–77. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-64-77.

4. Иммунологические аспекты метрономных режимов химиотерапии / Н.А. Ефремова, А.В. Новик, А.Ю. Зозуля, Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, Н.В. Емельянова, Д.В. Гирдюк, Г.И. Гафтон, И.А. Балдуева // Фарматека. – 2021. – Т. 28, № 7. – С. 81–86. – doi: 10.18565/pharmateca.2021.7.81-86.

5. Biological features of tissue and bone sarcomas investigated using an in vitro model of clonal selection / N.A. Avdonkina, A.B. Danilova, V.A. Misyurin, E.A. Prosekina, D.V. Girduyuk, N.V. Emelyanova, T.L. Nekhaeva, G.I. Gafton, I.A. Baldueva // Pathology – Research and Practice. – 2020. – Т. 217. – С. 153214. – doi: 10.1016/j.prp.2020.153214.

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

7. Использование клеточных трехмерных моделей для оценки инвазивного потенциала клеток солидных опухолей / А.Б. Данилова, Е.А. Просекина, А.Р. Муслимов, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, Г.И. Гафтон, В.Ф. Семиглазов, Е.В. Левченко, И.А.

Балдуева // Материалы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии». – 2019. – С. 205.

8. Пролиферативные, миграционные и инвазивные свойства культивируемых клеток сарком мягких тканей и костей / А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, И.А. Балдуева, Н.П. Пипиа, Г.И. Гафтон // Материалы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии». – 2019. – С. 212.

9. Анализ содержания CD 133+-стволовых опухолевых клеток (СОК) в культурах сарком мягких тканей (СМТ) и остеогенных саркомах (ОС) *in vitro* / И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, Н.В. Емельянова, Д.В. Гирдюк, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, И.Г. Гафтон, Ю.В. Семилетова, Г.И. Гафтон // Материалы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии». – 2019. – С. 232.

10. Организация банка биологических образцов однотипно пролеченных онкологических больных: современный подход к проведению фундаментальных и прикладных исследований / Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, А.В. Новик, Н.П. Пипиа, Г.И. Гафтон, Ю.В. Семилетова, А.К. Носов, Н.А. Авдонкина, А.Ю. Зозуля, Н.В. Емельянова, М.Л. Блохина // Тезисы Второго международного форума онкологии и радиологии. Москва, сентябрь 2019. – М.: КВАЗАР. – 2019. – С. 204.

11. Прогностическая роль экспрессии альдегид-дегидрогеназы культивируемыми клетками сарком мягких тканей и остеогенных сарком в определении их агрессивного потенциала / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Е.А. Просекина, А.И. Кузнецова, Н.В. Емельянова, И.А. Балдуева // Успехи молекулярной онкологии. – 2019. – Т. 6. – № 4. – С. 61–62.

12. Распространенность отклонений иммунологических показателей от референсных значений у больных солидными опухолями / А.В. Новик, Н.В. Емельянова, Т.Л. Нехаева, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, Н.А. Авдонкина, А.И. Семенова, Д.Х. Латипова, Г.М. Телетаева, С.А. Проценко, И.А. Балдуева // Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии». – 2020. – С.129.

13. Прогностическая роль клоногенного потенциала *in vitro* метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком / Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.В. Емельянова, Н.П. Пипиа, А.Ю. Зозуля, Е.А. Просекина, Г.И. Гафтон, И.А. Балдуева // Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020». – СПб.: АННМО «Вопросы онкологии». – 2020. – С. 132.

14. 3D-models creation based on solid tumor cell lines for assessment of antitumor treatment / E.A. Prosekina, N.A. Avdonkina, A.B. Danilova, T.L. Nekhaeva, I.A. Baldueva // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference (06–10 July 2020, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2020. – P. 509–510. – doi:10.18699/BGRS/SB-2020-311.

15. Clinical and immunological characteristics of patients sarcomas with different clonogenic potential / E.A. Prosekina, T.L. Nekhaeva, I.A. Baldueva, A.B. Danilova, N.V. Emelyanova, N.A. Avdonkina // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference (06–10 July 2020, Novosibirsk, Russia); Abstracts /

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2020. – P. 511. – doi:10.18699/BGRS/SB-2020-242.

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

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

18. Первичная опухоль и её метастазы: взаимоотношение с иммунной системой / И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, А.Ю. Зозуля, Н.А. Ефремова, А.В. Новик, А.М. Беляев // Тезисы VII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2021». – СПб.: АНМО «Вопросы онкологии». – 2021. – С. 121.

19. Роль пространственной организации клеточных моделей в анализе секреторной активности клеток солидных опухолей / А.Б. Данилова, Н.А. Ефремова, Т.Л. Нехаева, М.Л. Блохина, Д.В. Гирдюк, И.А. Балдуева // Тезисы VII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2021». – СПб.: АНМО «Вопросы онкологии». – 2021. – С. 124.

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

1. Пат. № 2722867 С1 Рос. Фед., МПК А61К 35/12 (2015.01) / 04.06.2020. Бюл. № 16: Клеточная линия остеогенной саркомы человека 793 OsSar RVV / Балдуева И.А., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Нехаева Т.Л., Беляев А.М.

2. Пат. № 2737248 С1 Рос. Фед., МПК С12N 5/07 (2010.01) / 26.11.2020. Бюл. № 33: Клеточная линия эмбриональной рабдомиосаркомы человека 862 RMSar KDD / Балдуева И.А., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Нехаева Т.Л., Гафтон Г.И., Беляев А.М.

3. Пат. № 2740800 С1 Рос. Фед., МПК С12N 5/07 (2006.01) / 21.01.2021. Бюл. № 3: Клеточная линия синовиальной саркомы человека 716 SS MNV / Балдуева И.А., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Нехаева Т.Л., Гафтон Г.И., Беляев А.М.

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

УЧЕБНЫЕ РАБОТЫ

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