

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

*На правах рукописи*

**ДАНИЛОВА  
АННА БОРИСОВНА**

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

Специальность: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия  
3.2.7. Иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук, доцент  
**Ирина Александровна Балдуева**

Санкт-Петербург – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА .....	17
1.1. Концепция «иммунного редактирования опухоли» .....	19
1.1.1. Элиминация .....	19
1.1.2. Равновесие .....	21
1.1.3. Уклонение .....	22
1.1.3.1. Нарушения антигенной презентации опухолевыми клетками .....	23
1.1.3.1.1. Раково-тестикулярные антигены .....	28
1.1.3.2. Повреждение молекул сигнальной трансдукции на эффекторных клетках.....	32
1.1.3.3. Создание локальных неблагоприятных условий в микроокружении для реализации функций клеток иммунной системы за счет особенностей метаболизма опухолевых клеток.....	33
1.1.3.4. Индуцированная функциональная несостоятельность антиген-презентирующих клеток .....	36
1.1.3.5. Иммуносупрессивные растворимые факторы, синтезируемые опухолевыми клетками.....	38
1.1.3.5.1. Лиганды рецептора NKG2D (NKG2DL) .....	38
1.1.3.5.2. Трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$ .....	41
1.1.3.5.3. Интерлейкин-10.....	44
1.1.3.5.4. Сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF и другие факторы ангиогенеза .....	47
1.1.3.6. Формирование «супрессивного» опухолевого микроокружения за счет привлечения клеток с иммунодепрессивными свойствами .....	52
1.2. Стратегия подходов иммунотерапии злокачественных новообразований в контексте теории иммунного редактирования опухоли.....	57
1.2.1. Технологии блокады «иммунных контрольных точек» иммуно-модулирующими антителами .....	59
1.2.2. Адоптивная клеточная терапия.....	61
1.2.3. Бивалентные антитела .....	65
1.2.4. Противоопухолевая вакциноterapia .....	66
1.2.5. Комбинированная терапия .....	68
1.2.6. Роль опухолевого микроокружения для выбора тактики иммунотерапевтического лечения.....	70
1.3. Заключение .....	73

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	74
2.1. Материалы исследования .....	74
2.1.1. Образцы опухолевой ткани .....	74
2.1.2. Супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток.....	79
2.1.3. Образцы периферической крови и клеточный материал после лейкофереза .....	79
2.1.4. Характеристика пациентов, получавших специфическую клеточную иммунотерапию ....	80
2.2. Методы исследования.....	83
2.2.1. Методы культивирования клеток и анализа их свойств.....	83
2.2.1.1. Выделение клеток из тканей опухолей .....	83
2.2.1.2. Культивирование опухолевых клеток.....	83
2.2.1.3. Выделение и культивирование фибробластов кожи человека .....	85
2.2.1.4. Анализ морфологии и пролиферативной активности культивируемых клеток солидных опухолей.....	85
2.2.1.4.1. Оценка пролиферативной активности в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ .....	86
2.2.1.4.2. Оценка пролиферативной активности в автоматическом клеточном анализаторе в режиме реального времени xCelligence.....	87
2.2.1.5. Анализ миграционных и инвазивных свойств культивируемых клеток солидных опухолей.....	88
2.2.1.6. Определение количества и жизнеспособности культивируемых клеток (клеток солидных опухолей, мононуклеаров, лимфоцитов, миелоидных предшественников и дендритных клеток) .....	90
2.2.1.7. Получение костномозговых и периферических предшественников дендритных клеток.....	91
2.2.1.8. Дифференцировка дендритных клеток из миелоидных предшественников <i>ex vivo</i> .....	92
2.2.1.9. Приготовление культуры специфически активированных цитотоксических Т-лимфоцитов.....	93
2.2.1.10. Сортировка клеток .....	94
2.2.1.11. Цитогенетический анализ клеток солидных опухолей .....	94
2.2.1.12. Приготовление вакцин на основе аутологичных генетически модифицированных опухолевых клеток.....	94
2.2.1.13. Приготовление вакцин на основе дендритных клеток, активированных лизатом опухолевых клеток.....	95
2.2.2. Методы иммуноферментного анализа .....	96
2.2.2.1. Иммуноферментный анализ в «сэндвич-варианте».....	96

2.2.2.1.1. Определение MICA .....	96
2.2.2.1.2. Определение TGF- $\beta_1$ .....	97
2.2.2.1.3. Определение интерлейкина-10 .....	97
2.2.2.1.4. Определение VEGF .....	98
2.2.2.2. Мультиплексный анализ.....	99
2.2.3. Методы иммуногисто- и цитохимии .....	100
2.2.4. Методы проточной цитофлуорометрии .....	102
2.2.4.1. Определение иммунофенотипа опухолевых клеток .....	102
2.2.4.2. Определение иммунофенотипа дендритных клеток и лимфоцитов .....	103
2.2.5. Молекулярно-генетические методы .....	105
2.2.5.1. Выделение кДНК из образцов культивируемых клеток солидных опухолей.....	105
2.2.5.2. Генотипирование по антигенам HLA I класса .....	105
2.2.5.3. Идентификация экспрессии раково-тестикулярных антигенов .....	106
2.2.6. Методы экспериментального моделирования.....	108
2.2.6.1. Экспериментальное моделирование для изучения подвижности дендритных клеток под влиянием факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, продуцируемых опухолевыми клетками .....	108
2.2.6.2. Экспериментальное моделирование для изучения эффективности иммунологических синапсов .....	108
2.2.6.3. Метод трехмерного клеточного моделирования для изучения свойств опухолевых клеток .....	110
2.2.7. Методы статистического анализа .....	112
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	113
3.1. Культивирование клеток солидных опухолей для создания клеточных моделей <i>in vitro</i> ...	113
3.2. Экспрессия опухолеассоциированных антигенов малигнизированными клетками в процессе опухолевой прогрессии .....	130
3.2.1. Экспрессия опухолеассоциированных антигенов и антигенов HLA I и II класса культивируемыми клетками меланомы кожи, выявляемая методами иммуноцит- и гистохимии .....	130
3.2.2. Экспрессия опухолеассоциированных антигенов культивируемыми клетками эпителиальных опухолей, сарком мягких тканей и остеогенных сарком, выявляемая методами иммуноцит- и гистохимии .....	169
3.2.3. Сравнительный анализ экспрессии раково-тестикулярных антигенов клетками солидных опухолей, определяемой молекулярно-генетическими методами .....	183

3.3. Продукция иммуносупрессивных факторов культивируемыми клетками солидных опухолей .....	198
3.3.1. Оценка продукции MICA культивируемыми клетками солидных опухолей .....	198
3.3.2. Оценка продукции TGF- $\beta_1$ культивируемыми клетками солидных опухолей .....	206
3.3.3. Оценка продукции IL-10 культивируемыми клетками солидных опухолей.....	214
3.3.4. Оценка продукции клетками солидных опухолей VEGF и других факторов, ассоциированных с ангиогенезом, инвазией, метастазированием и иммуносупрессией .....	220
3.3.5. Изменение секреторного профиля клеток солидных опухолей в трехмерной системе культивирования.....	246
3.4. Сравнительная характеристика пролиферативного и метастатического потенциала культивируемых клеток солидных опухолей .....	258
3.5. Экспериментальное моделирование влияния супрессивного опухолевого микроокружения на функции дендритных клеток.....	273
3.6. Экспериментальное моделирование для оценки эффективности иммунологических синапсов в условиях супрессивного опухолевого микроокружения .....	285
3.7. Исследование иммуносупрессивных факторов как биомаркеров эффективности клеточной иммунотерапии .....	302
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	314
ВЫВОДЫ .....	317
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	319
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	319
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	320
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	322

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Иммунотерапия злокачественных опухолей – одна из наиболее бурно развивающихся областей онкологии, которая базируется на открытиях последних десятилетий в биологии и иммунологии, позволивших объяснить различные механизмы клеточных и гуморальных иммунных реакций, а также выявить целый ряд клеток и биологически активных веществ, при помощи которых эти реакции осуществляются, в том числе при опухолевом росте [1–3]. Не вызывает сомнений, что именно биологические особенности опухоли определяют гетерогенность иммунологического ответа на опухолевые антигены, различную чувствительность опухолевых клеток к действию клеток-эффекторов, различия в интенсивности ингибирующего влияния опухоли на иммунокомпетентные клетки, и, как следствие, различную чувствительность к иммунотерапии, химиотерапии, лучевой терапии [4–7]. В настоящее время развивается концепция «иммунного редактирования опухоли» («cancer immunoeediting»), динамического процесса, отражающего взаимоотношения опухоли и иммунной системы, когда в результате иммунного контроля выживают лишь те опухолевые клетки, которым удастся приобрести механизмы устойчивости, позволяющие «избегать» воздействия клеток иммунной системы. Активная специфическая иммунотерапия развивается параллельно с развитием теории о механизмах иммунного контроля, толерантности опухоли к воздействиям иммунной системы как феномена «уклонения», обеспечивающего ее прогрессию [6; 8–11].

Первоначально возникающие трансформированные клетки могут быть устранены клетками-эффекторами иммунной системы, такими как НК-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). Однако процесс элиминации трансформированных клеток приводит к иммунной селекции и иммунному «редактированию», которые способствуют созданию вариантов опухолевых клеток с меньшей иммуногенностью, обладающих возможностями аутокринной регуляции их роста, приобретению подвижности и инвазивных свойств, секретирующих целый спектр молекул, способных блокировать активность иммунокомпетентных клеток. В итоге во время опухолевой прогрессии, когда опухоль достигает размеров, обнаруживаемых клиническими методами, растворимые факторы, секретируемые клетками опухоли, могут создавать в опухолевом микроокружении (TME, «tumour microenvironment») благоприятные условия для «уклонения» от воздействия иммунной системы [12–15]. В некотором смысле опухоль можно рассматривать как некую многокомпонентную «экосистему», в которой малигнизированные клетки оптимизируют ресурсы микроокружения для создания наилучших условий их пролиферации [7; 16; 17]. TME

представлено большим количеством разнообразных клеточных элементов, среди которых основными являются клетки иммунной системы, стромальные клетки и клетки, формирующие кровеносные сосуды [14]. Благодаря многочисленным экспериментальным данным уже показана важная роль нейтрофилов, лимфоцитов, НК-клеток, макрофагов, фибробластов, эндотелиоцитов и перицитов в процессах опухолевого роста [18; 19]. Накопление данных о жизнедеятельности ТМЕ формирует представление о сложных реципрокных взаимодействиях между всеми типами клеток в этом пространстве [19–21]. Более детальное понимание механизмов «уклонения» от воздействия иммунной системы, реализуемых злокачественными клетками во взаимодействии с ТМЕ, имеет большое значение для разработки критериев отбора пациентов, которым показана активная специфическая иммунотерапия, для развития методологии приготовления клеточных противоопухолевых вакцин, обладающих достаточной клинической и иммунологической эффективностью, а также для совершенствования и создания новых методов иммунотерапии злокачественных новообразований.

### **Степень разработанности темы**

Несмотря на то, что, начиная с конца XIX века, процессы туморогенеза и эволюции злокачественных новообразований находятся под пристальным вниманием ученых, закономерности функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста, биологические свойства неоплазий, позволяющих «избегать» иммунного контроля и создавать условия для дальнейшей прогрессии и диссеминации в организме человека, по-прежнему, нуждаются в дальнейшей детализации и изучении. В последние десятилетия произведены концептуальные разработки в рамках теории иммунного «редактирования» опухоли, которые продемонстрировали, что иммунная система способна оказывать ингибирующее влияние на онкологический процесс и в то же время способствовать развитию и диссеминации опухоли [22–24]. События, связанные с феноменом иммуноредактирования злокачественных новообразований, происходят во время их естественного прогрессирования, и вместе с тем исследования результатов применения различных методов противоопухолевой иммунотерапии показывают, что этот процесс частично или полностью повторяется в ответ на лечение [6; 25; 26]. На сегодняшний день успехи противоопухолевой иммунотерапии очевидны, однако первичная и приобретенная в ходе терапевтического воздействия иммунорезистентность остается серьезным препятствием [27–29].

Первичная резистентность связана с отсутствием объективного ответа на иммунотерапию и может возникать в случае системной иммуносупрессии или при наличии злокачественного новообразования, клетки которого экспрессируют мало молекул, распознаваемых иммунной системой как чужеродные (опухоли с низкой мутационной нагрузкой) [28]. В то же время иммуносупрессивные механизмы, которые делают возможным

«ускользание» опухолевых клеток от иммунного надзора, могут предотвращать активацию иммунной системы в процессе иммунотерапии, что индуцирует формирование устойчивости опухолевых клеток к последующим воздействиям [30; 31]. Для того чтобы повысить эффективность противоопухолевой иммунотерапии, расширить диапазон опухолей, которые будут чувствительны к иммунотерапии, и когорту пациентов, которым показаны эти методы лечения, необходимо полностью изучить уже в некоторой степени известные механизмы и обнаружить еще неизвестные закономерности, благодаря которым малигнизированные клетки проявляют устойчивость к иммунологическим реакциям или развивают иммунорезистентность в процессе терапии.

В 2013 г. D.S. Chen и I. Mellman предложили концепцию «противоопухолевого иммунного цикла», который они рассматривали как динамический пространственно-временной процесс, функционирование которого нарушено у больных злокачественными новообразованиями и должно быть иницировано или реиницировано с помощью противоопухолевой иммунотерапии [32].

В настоящее время изучаются внутренние причины нарушения иммунного цикла и уже накоплены данные о роли ТМЕ, сложной, постоянно меняющейся системы, состоящей из стромы, имеющей элементы собственного кровоснабжения, лимфатической системы, клеток иммунной системы и внеклеточного матрикса [33; 34]. Все эти компоненты, в том числе нормальные и злокачественные клетки, создают иммунодепрессивную среду с дефицитом питательных веществ, необходимую для роста, пролиферации, фенотипической пластичности и вариабельности опухолевых клеток [34; 35]. Взаимодействие опухолевых клеток с экстрацеллюлярным матриксом индуцирует высвобождение растворимых факторов, ответственных за «уклонение» от воздействия иммунной системы и ремоделирование внеклеточного матрикса, что способствует возникновению метастатического процесса и создает дополнительные условия для формирования иммунорезистентности [36].

В контексте существующих данных совершенствование и разработка иммунотерапевтических подходов должна базироваться на использовании в доклинических исследованиях клеточных моделей, максимально приближенных к реальной клинической ситуации [37]. Для эффективных исследований *in vitro* необходимо создание и развитие банков биологических образцов онкологических больных, в том числе коллекций культур клеток злокачественных новообразований, охарактеризованных с использованием современных методов исследований на клеточном и субклеточном уровнях. Клеточное моделирование может стать основой для выявления предиктивных и прогностических факторов, позволяющих предсказать течение болезни и выбрать персонализированную терапию, оптимальную для конкретных пациентов.



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

### **Цель**

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

### **Задачи**

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

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

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

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

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

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

### **Научная новизна исследования**

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

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

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

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

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

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

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

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

Созданная коллекция охарактеризованных клеточных культур солидных опухолей стала неотъемлемой частью Банка биологических образцов однотипно пролеченных больных

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, существование которого значительно расширяет возможности проведения доклинических исследований. Получены свидетельства интеллектуальной собственности на создание и применение клеточных линий опухолей различного гистогенеза.

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

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

Взаимосвязь экспрессии генов *PRAME*, *PASDI*, *SSX1* и продукции ИСФ, таких как интерлейкины (IL) IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta_1$ , MICA, VEGF, с инвазивным потенциалом опухолевых клеток и реализацией феномена «ускользания» от воздействия клеток-эффекторов позволяет рассматривать эти факторы как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

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

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

### **Методология и методы исследования**

Объектом исследования служили культивируемые клетки солидных опухолей, полученные из интраоперационного материала пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2001–2019 гг. Был использован биологический материал 826 больных: образцы опухолевой ткани (826), супернатанты культур

нормальных и опухолевых клеток (1912), образцы периферической крови пациентов (84), фракции клеток крови после лейкофереза (32). Аналитический этап исследования предполагал сравнительное изучение морфологии, пролиферативной активности, миграционных и инвазивных свойств клеток солидных опухолей, их антигенного фенотипа и секреторного профиля. Экспериментальное исследование включало создание трехмерных систем, кокультивирование опухолевых клеток и клеток иммунной системы. Исследование ИСФ, продуцируемых опухолевыми клетками, как биомаркеров прогноза и эффективности методов активной специфической клеточной иммунотерапии было проведено с использованием данных 88 больных диссеминированной МК и РП, получавших вакцину на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном *tag7/PGRP-S* (ГМВ), и 116 пациентов с МК, РП, СМТ/ОС, получавших вакцину на основе аутологичных активированных ДК (ДКВ).

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

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

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

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

3. В культивируемых клетках солидных опухолей наблюдается гиперэкспрессия РТГ, при этом существует сходство профилей экспрессии этих генов клетками МК, СМТ/ОС и ЭО. В клетках МК выявлена транскрипционная активность 10 РТГ, что является основанием для их

использования в качестве источника РТА в клеточной иммунотерапии на основе активированных ДК.

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

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

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

7. Инвазивные свойства культивируемых клеток МК и СМТ/ОС связаны с экспрессией РТГ *PRAME*, *PASD1*, *SSX1*, продукцией факторов HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8, которые возможно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

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

9. ЦТЛ, генерированные в присутствии ДК, активированных препаратом IRTAN-2018, проявляют цитолитическую активность по отношению к клеткам СМТ/ОС, при этом выявлена корреляция с экспрессией генов *PRAME* ( $\rho=0,676$ ,  $p=0,005$ ), *PASD1* ( $\rho=0,522$ ,  $p=0,046$ ). Присутствие в секреторном профиле малигнизированных клеток IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta_1$ , MICA, VEGF ассоциировано с индексом их жизнеспособности в экспериментальной модельной системе.

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

#### **Личный вклад автора**

Автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, проведено планирование исследования и разработан его дизайн, выполнены работы по выделению, получению и культивированию клеток солидных опухолей, их характеристике, идентификации ОАА, выявлению ИСФ. Автор также самостоятельно разработала 2D- и 3D-

клеточные модели, позволяющие изучать миграционные и инвазивные свойства опухолевых клеток, подвижность антигенпрезентирующих клеток, цитолитические свойства специфически активированных ЦТЛ. При непосредственном участии автора проводилось исследование с помощью мультиплексного анализа и проточной цитофлуорометрии, был осуществлен статистический анализ результатов исследований. Все полученные результаты были самостоятельно подготовлены для публикаций и представления на различных научно-практических мероприятиях.

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

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

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

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

conference «Cell technologies at the edge: from research to practice “Translational research in cell therapy”», Moscow, 2018; V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 2019; на Конференции Ассоциации специалистов по проблемам меланомы «Меланома и опухоли кожи», Санкт-Петербург, 2021.

### **Связь с планом научных работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России**

Работа выполнена по основному плану научно-исследовательских работ института. Научные исследования были проведены в рамках следующих программ:

1. Федеральная целевая программа: «Создание банка аллогенных клеточных линий для производства генно-клеточной противоопухолевой вакцины» в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» по лоту шифр «2008-2-2.2-05-01-008» по теме: «Разработка технологий генодиагностики и генотерапии рака, и выпуск опытных образцов тест-наборов и генно-клеточных противоопухолевых вакцин».

2. Государственный контракт: «Клинические исследования противоопухолевых вакцин» на основании Научно-технической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2010–2012 гг.

3. Государственное задание Минздрава России 2012–2014 гг. по теме: «Изучение роли иммунобиологического и метаболического гомеостаза у больных злокачественными опухолями в контексте создания противоопухолевых вакцин».

4. Государственное задание Минздрава России 2015–2017 гг. по теме: «Разработка новых подходов в диагностике и лечении больных злокачественными опухолями в контексте изучения иммунологического гомеостаза».

5. Грант РФФИ 18-29-09014 «Создание персонализированных клеточных систем на основе тумороидов для оптимизации лекарственного лечения агрессивных форм солидных опухолей» 2019–2021 гг.

6. Государственное задание Минздрава России 2021–2023 гг. по теме: «Изучение иммуногенетического профиля пациентов с агрессивным течением злокачественного опухолевого процесса, устойчивого к стандартным методам лечения: трансляционное исследование».

### **Реализация и внедрение работы**

Проведенные исследования позволили получить результаты, которые могут быть рекомендованы для применения в медицинских учреждениях с лабораториями, оснащенными соответствующим оборудованием, с целью мониторинга состояния иммунной системы больных

злокачественными новообразованиями. Полученные теоретические данные могут быть использованы в составлении обучающих программ студентов и аспирантов медицинских и биологических вузов.

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

### **Соответствие диссертации паспортам научных специальностей**

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

### **Публикации**

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

### **Структура и объем диссертации**

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



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Еще в 1909 году П. Эрлих пришел к выводу, что в организме человека непрерывно образуются трансформированные клетки, которые в норме должны распознаваться и элиминироваться иммунной системой. Так родилась гипотеза иммунного надзора, которая в дальнейшем нашла свое подтверждение благодаря исследованиям в области иммунологии и изучению роли иммунной системы в патогенезе онкологических заболеваний [38]. Однако существование клинически обнаруживаемых опухолей свидетельствует о том, что процессы взаимоотношения злокачественных клеток и иммунной системы гораздо сложнее и многообразнее, чем это предполагалось. Реализация иммунного контроля приводит к своеобразному отбору менее иммуногенных опухолевых клеток с более агрессивным фенотипом, формирующими разнообразные механизмы устойчивости по отношению к клеткам иммунной системы [6; 14; 22; 39]. Примером могут служить исследования, проведенные на модели RAG2-дефицитных мышей, которые характеризуются отсутствием популяций Т-, В- и НКТ-клеток: опухоли, полученные у этих животных, были гораздо более иммуногенны, чем аналогичные новообразования, возникшие у иммунокомпетентных особей [40].

Накопление знаний о роли иммунных клеток-эффекторов, таких как В- и Т- лимфоциты, натуральные киллеры (НК) и НКТ-клетки, о свойствах интерферонов I и II типа, перфорина, способствовало дальнейшему развитию взглядов на функционирование иммунной системы в условиях опухолевого роста [41; 42]. На данный момент существует концепция «иммунного редактирования опухоли» («cancer immunoediting»), динамического процесса, отражающего взаимоотношения опухоли и иммунной системы, когда в результате иммунного контроля выживают лишь те опухолевые клетки, которым удастся приобрести механизмы устойчивости, позволяющие «избегать» воздействия иммунных клеток-эффекторов. Благодаря экспериментальным исследованиям уже накоплено множество данных, доказывающих существование этого феномена. В этом отношении интересно исследование, выполненное DuPage M. и соавт. (2012), где была использована модель метилхолантрен (MCA)-индуцированной саркомы на иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышцах с активированными генами Kras и p53 [43]. Трансдукция *in vivo* генов, кодирующих эпитопы молекул МНС I класса (SIINFEKL и SIYRYYGL), привела к повышенной экспрессии этих эпитопов на клетках саркомы в иммунодефицитных мышцах. В то же время параллельная манипуляция с иммунокомпетентными мышцами дала несколько иной результат: саркома с хорошо выраженной экспрессией антигенов МНС I класса не развивалась, а возникшие опухоли

обладали сниженной экспрессией искомым антигенов. Таким образом, «редактирование» экспрессии клетками саркомы антигенов с эпитопами SIINFELK и SIYRYYGL было следствием взаимодействия с Т-лимфоцитами, которое привело к отбору опухолевых клеток с «молчащими» экзогенными генетическими конструкциями. Прогрессирование множественной миеломы также можно рассматривать как результат «иммунного редактирования опухоли»: начальная стадия в виде моноклональной гаммапатии неопределенного генеза, когда появляется ограниченное количество клональных плазматических клеток, секретирующих моноклональный иммуноглобулин, сменяется асимптоматической миеломой, а затем развивается симптоматическая или множественная миелома, при этом считается, что стадия множественной миеломы соответствует стадии, когда опухоль «ускользает» от воздействия клеток иммунной системы [44]. Эта фаза характеризуется селекцией вариантов злокачественных клеток с низкоуровневой регуляцией или исчезновением экспрессии опухолевых антигенов, увеличением активности генов, ассоциированных с клеточной пролиферацией и в конечном итоге с развитием иммуносупрессивного опухолевого микроокружения [11]. Кроме того, формирование центральной и периферической иммунной толерантности с вовлечением активированных регуляторных Т-лимфоцитов является очень важным для создания условий реализации всех механизмов «ускользания» [11; 44].

В концепцию «иммунного редактирования опухоли» укладываются представления о клональной модели развития злокачественных новообразований, которая была впервые сформулирована Р. Nowell в 1976 году [45]. Согласно этой модели, опухолевый рост рассматривается как динамический эволюционный процесс на клеточном уровне, сложность которого должна учитываться при определении стратегий противоопухолевого лечения, так как опухоль представляет собой совокупность индивидуальных клеточных клонов, отличающихся друг от друга рядом генетических мутаций, способствующих их выживанию. Недавнее исследование на более чем 7000 образцов опухолей выявило около 5 млн мутаций, в среднем около 700 мутаций на образец опухолевой ткани [46]. Можно предполагать, что многие из этих мутаций не оказывают никакого эффекта на клеточные функции или могут быть неблагоприятными для функций клеток, например, активировать механизмы клеточной смерти, в то время как другие мутации будут способствовать их выживанию. В частности, подобные мутации связаны с регуляцией пролиферативной активности и процессов апоптоза, а также с метаболизмом и энергетическими процессами. Идентификация этих генетических изменений в опухолевых клетках важна для определения целевой стратегии лечения и разработки лекарственных средств [47]. Геномная нестабильность обеспечивает резистентность опухоли к различным терапевтическим воздействиям, и здесь на первый план выходят механизмы, связанные с эпигенетической регуляцией генов, такие как метилирование цитозина

и ферментативные модификации гистоновых белков [48]. Было обнаружено, что aberrantные уровни метилирования ДНК связаны с увеличением экспрессии белков, вовлеченных в метастатический процесс, или реактивацию генов-супрессоров [49]. Данные по применению современных иммунотерапевтических стратегий, таких как CAR-T-клеточная терапия, свидетельствуют о проявлении феномена «immune escape», выражающегося в появлении опухолевых клеток с низкой экспрессией или потерей экспрессии целевого антигена [50].

Таким образом, в настоящее время не представляет сомнений, что процесс развития опухоли в организме сопряжен с множественными изменениями, отражающими эволюционные модификации злокачественных клеток и опухолевого микроокружения, способствующие наилучшей их адаптации для реализации пролиферативного потенциала.

### **1.1. Концепция «иммунного редактирования опухоли»**

Выделяют три основные фазы «иммунного редактирования» опухоли, которые можно обозначить как: 1) элиминация, 2) равновесие, 3) уклонение («escape») [6; 11; 48].

#### **1.1.1. Элиминация**

Первоначально возникающие трансформированные клетки могут быть устранены иммунными клетками-эффекторами, такими как NK-клетки. Но процесс уничтожения трансформированных клеток приводит к иммунной селекции и иммунному «редактированию», которые способствуют созданию вариантов опухолевых клеток с меньшей иммуногенностью, устойчивых к воздействию иммунных клеток в фазе равновесия. В конечном счете во время опухолевой прогрессии, когда опухоль достигает размеров, обнаруживаемых клинически, растворимые факторы, синтезированные клетками опухоли, могут создавать в опухолевом микроокружении благоприятные условия для «уклонения» от воздействия иммунной системы [22; 23; 35]. Лучшее понимание механизмов этого процесса при прогрессировании опухоли может обеспечить новые возможности для совершенствования уже имеющих место методов иммунотерапии рака и создания новых.

Согласно мнению большинства исследователей, стадию элиминации можно условно разделить на 4 этапа [11; 41; 51]:

На первом этапе трансформированные клетки могут распознаваться инфильтрирующими лимфоцитами, такими как NK, NKT, и  $\gamma\delta$ T-лимфоциты, которые продуцируют интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [52; 53]. При этом, как правило, распознавание иммуногенных опухолевых клеток клетками иммунной системы приводит к их ограниченному уничтожению: когда солидная опухоль достигает размеров больше чем 2–3 мм, она требует кровоснабжения и создания стромального окружения, которое формируется в процессе дальнейшего прогрессирования

опухолевого процесса, что, в свою очередь, приводит к индукции провоспалительных сигналов, приводящих к пополнению числа иммунных клеток, таких как НК, НКТ,  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, макрофаги, ДК в месте локализации опухоли [54; 55].

Вторая стадия включает созревание и миграцию дендритных клеток и «cross-priming» для Т-лимфоцитов: IFN- $\gamma$  создает ограниченную цитотоксичность через антипролиферативные и антиангиогенные эффекты и вызывает апоптоз опухолевых клеток [56]. Кроме того, возможна индукция некротической гибели опухолевых клеток в результате выделения некоторых хемокинов, которые блокируют формирование новых кровеносных сосудов в ткани опухоли [24]. Апоптотические и некротические опухолевые клетки элиминируются незрелыми дендритными клетками, способствуя их созреванию и миграции в ближайшие лимфатические узлы.

На третьей стадии происходит генерация антиген-специфических Т-лимфоцитов: с одной стороны, рекрутированные опухоль-инфильтрирующие НК-клетки и макрофаги продуцируют IL-12 и IFN- $\gamma$ , которые вызывают уничтожение опухолевых клеток через активацию цитотоксических механизмов, таких как перфорин, родственник TNF-лиганд, индуцирующий апоптоз (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) и реактивный кислород [57]. С другой стороны, мигрировавшие в лимфатические узлы дендритные клетки презентуют опухолевые антигены наивным CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитам, которые дифференцируются в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты, при участии которых формируются антиген-специфические CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты, участвующие в клональной экспансии.

Финальный этап элиминации включает в себя возвращение антиген-специфических Т-лимфоцитов к месту локализации опухоли и устранение опухолевых клеток [58]. Антиген-специфичные CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты мигрируют к первичному очагу опухоли, где они уничтожают остающиеся опухолевые клетки, экспрессирующие специфические опухолевые антигены; однако этот процесс также приводит к отбору опухолевых клеток со сниженной иммуногенностью. Стадия элиминации может захватывать длительный период, в течение которого иммунная система непрерывно взаимодействует с опухолью, создавая динамическое состояние равновесия, которое удерживает опухолевые клетки в состоянии покоя и рассматривается как вторая фаза «cancer immunoediting».

Тем не менее остается много спорных вопросов относительно распознавания опухолевых клеток, в частности, каким образом клетки иммунной системы могут быть активированы в развивающейся опухоли, даже при том, что специфические антигены опухоли экспрессируются на поверхности опухолевых клеток. Согласно гипотезе сигналов опасности, предполагается, что клеточное преобразование не обеспечивает сигналы, достаточные для активации иммунной системы в ответ на развивающуюся опухоль. В отсутствии таких сигналов

часто иммунные реакции отсутствуют, и может развиться толерантность [11]. Однако проведенные исследования указывают, что сигналы опасности, такие как мочевая кислота [59], потенциальные «toll-like» лиганды, такие как белки теплового шока [60], а также производные экстрацеллюлярного матрикса [61], могут вызвать провоспалительные реакции, которые активируют врожденные иммунные реакции к чужеродным патогенам [59–61].

Сигналы опасности, как думают, действуют, стимулируя созревание дендритных клеток так, чтобы они могли представить чужеродные антигены и стимулировать Т-лимфоциты. Было также обнаружено, что погибающие опухолевые клетки высвобождали сигналы опасности неизвестной идентичности. Отмечают, что, хотя местнораспространенное воспаление может привести к индукции иммунных реакций, чрезмерная активация воспалительного процесса может вызвать прогрессию опухоли в стационарных условиях [62]. Это может происходить частично из-за АПК, которые высвобождают противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 и TGF- $\beta$ , ингибирующие активность эффекторных клеток [63; 64].

### 1.1.2. Равновесие

Фазу равновесия рассматривают как следующий этап при «иммунном редактировании», при котором непрерывный процесс размножения опухолевых клеток, в результате которого могут возникать разнообразные генетические мутации, приводит к появлению клеток, устойчивых к воздействию иммунных клеток-эффекторов [65]. Этот процесс приводит к селекции опухолевых клеток со сниженной иммуногенностью и формированию опухолевых клонов с неиммуногенным фенотипом. Эти клетки более способны к выживанию, что объясняет очевидный парадокс формирования опухоли у иммунологически интактных индивидуумов. Несколько экспериментальных исследований с использованием рас мышей с разнообразными дефицитами эффекторных молекул указали различную степень влияния иммунной селекции. Лимфомы, которые сформировались у перфорин-дефицитных мышей, были более иммуногенны, чем таковые у мышей, дефицитных по IFN- $\gamma$ , что дает возможность предполагать, что перфорин может быть более активно вовлечен в процесс иммунной селекции клеток лимфомы, чем IFN- $\gamma$  [66].

Напротив, МСА-индуцированные саркомы у мышей, дефицитных по рецептору IFN- $\gamma$ , были очень иммуногенны [67]. Кроме того, химически индуцированные саркомы у «голых» мышей и у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) были более иммуногенны, чем подобные опухоли в иммунокомпетентных мышцах [68; 69]. Результаты этих исследований показывают, что клетки опухолей, индуцированных в организме интактных животных и прошедшие «отбор» в результате Т-клеточноопосредованного процесса селекции, могли существовать и пролиферировать в присутствии функционирующей системы Т-

лимфоцитов, которая элиминировала иммуногенные опухолевые клетки. Однако при этом не наблюдали никакой связи между потерей специфических опухолевых антигенов и потерей экспрессии антигенов МНС I класса. Кроме того, эти исследования позволили сделать несколько достаточно важных выводов. Во-первых, перфорин-опосредованная цитотоксичность Т-лимфоцитов способствует более активному уничтожению клеток лимфомы, чем эпителиальных опухолевых клеток, тогда как цитотоксичность, вызванная присутствием IFN- $\gamma$ , направлена больше на элиминацию мезенхимальных опухолевых клеток, таких как саркомы. Во-вторых, более высокая иммуногенность опухолей, полученных у иммунодефицитных мышей, по сравнению с иммунокомпетентными мышами, указывает более низкую активность иммунной системы в направлении иммунной селекции опухолевых клеток. Таким образом, Т-клеточно-опосредованная цитотоксичность направлена на устранение самых иммуногенных опухолевых клеток в спонтанных и химически индуцированных животных моделях.

Предполагается, что фаза равновесия, когда идет непрерывное устранение иммуногенных опухолевых клеток и сохранение устойчивых вариантов опухоли под давлением иммунного отбора, является самой продолжительной из трех стадий процесса «иммунного редактирования» и может протекать в течение многих лет [14]. Если предполагать, что состояние этого динамического равновесия сохраняется в течение долгого времени, то можно таким образом объяснить механизм возникновения опухоли в трансплантируемом органе. В публикации MacKie R.M. и соавт. (2003) описано появление метастатической меланомы после трансплантации почек от одного донора двум пациентам. Шестнадцать лет назад у донора была выявлена меланома кожи, он получал соответствующее лечение, и на момент трансплантации предполагалось, что эффект лечения достигнут [70]. Подобные наблюдения были сделаны другими исследователями, когда после аллогенных трансплантаций от здоровых, как предполагалось, доноров у больных развились опухоли [71; 72]. Эти наблюдения косвенно подтверждают существование фазы равновесия, которое было, возможно, нарушено в результате назначения больным, подвергшимся трансплантации органов, медикаментов, обладающих иммуносупрессирующими свойствами. Таким образом, накопленные данные в ходе экспериментальных и клинических исследований позволили сделать вывод, что присутствие, локализация, количество Т-лимфоцитов в тканях опухолей и спектр экспрессируемых ими цитокинов является важным критерием и ассоциирован с благоприятным прогнозом развития заболевания, так как наличие активированных опухолеассоциированных клеток иммунной системы позволяет удерживать опухолевый рост в состоянии равновесия [73].

### 1.1.3. Уклонение

Третья фаза процесса иммунного редактирования – это, собственно, «уклонение» («escape»), то есть формирование опухоли, устойчивой к воздействию иммунной системы за

счет реализации механизмов «уклонения» опухолевых клеток от контроля со стороны иммунных клеток-эффекторов. Опухолевые клетки способны использовать различные механизмы выживания, связанные с созданием условий системной или локальной иммуносупрессии. Среди них можно выделить следующие:

- нарушения антигенной презентации опухолевыми клетками;
- повреждение молекул сигнальной трансдукции на эффекторных клетках;
- создание локальных неблагоприятных условий в микроокружении для реализации функций клеток иммунной системы;
- индуцированная функциональная несостоятельность антиген-презентирующих клеток;
- иммуносупрессирующие растворимые факторы, синтезируемые опухолевыми клетками;
- формирование «супрессивного» опухолевого микроокружения за счет привлечения клеток с иммунодепрессивными свойствами.

#### **1.1.3.1. Нарушения антигенной презентации опухолевыми клетками**

Распознавание малигнизированных клеток клетками иммунной системы может быть заблокировано вследствие уменьшения, потери или модификации экспрессии антигенов, которое реализуется, как минимум, тремя способами:

- 1) посредством появления опухолевых клеток с обедненным антигенным профилем;
- 2) при уменьшении или исчезновении экспрессии антигенов МНС I класса;
- 3) при потере способности опухолевых клеток к антигенному процессингу, который необходим для соединения антигенных эпитопов с соответствующими участками молекул МНС I класса.

Хорошо известно, что опухолевые клетки отличаются от нормальных по своему антигенному составу, и распознавание клеток опухолей иммунной системой отличается от такового для клеток нормальных тканей и существенно зависит от распознавания Т-лимфоцитами опухолеспецифических или опухолеассоциированных антигенов. Многочисленные исследования последних десятилетий убедительно показали, что опухолевые клетки экспрессируют антигенные детерминанты (эпитопы), которые могут распознаваться аутологичными ЦТЛ. Эти эпитопы, являющиеся мишенями для клеток иммунной системы, представляют собой результат эпигенетических, транскрипционных, трансляционных и пост-трансляционных модификаций опухолевых клеток [48; 74; 75].

Согласно гипотезе E.R. Fearon и B. Vogelstein, выдвинутой в 1990 году, генетическая нестабильность является молекулярным признаком канцерогенеза [76]. К тому же сформировалось представление, что в результате канцерогенеза появляется антигенная

гетерогенность, которая представляет собой следствие удаления и/или мутационной дезактивации «стражей генома», таких как транскрипционный фактор p53 [77; 78]. Модификации антигенов постоянно возникают в процессе прогрессии опухоли, что не происходит в нормальных тканях, имеющих стабильный, постоянный антигенный профиль. Таким образом, экспрессия антигенов опухолевыми клетками в большинстве случаев носит гетерогенный характер, даже на уровне опухоли одного гистологического типа. В одной популяции злокачественных клеток возможно выделить формы различных комбинаций генетических и эпигенетических изменений, можно сказать, антигенные профили клеток с различным «грузом мутаций», в частности, как это показано для рака молочной железы [79], прямой и ободочной кишки [2].

Первым механизмом «уклонения» опухолевых клеток от воздействия иммунной системы, который был обнаружен и изучен, является уменьшение презентации опухолевых антигенов и модификации или исчезновение презентации антигенов МНС I класса [80]. На ранних стадиях развития опухоли злокачественные клетки сохраняют презентацию антигенов МНС I, однако затем, в процессе опухолевой прогрессии, появляются опухолевые клоны, теряющие экспрессию этих антигенов, и в дальнейшем опухоль становится негативной по экспрессии антигенов МНС I [81]. Потеря МНС-презентации может быть связана с появлением мутаций в генах, кодирующих тяжелые цепи молекул МНС I класса, локализованных в 6 хромосоме, и/или бета-2-микроглобулина ( $m2\beta$ ), локализованного в хромосоме 15. Злокачественные клетки, лишенные молекул МНС I класса, не выявляются ЦТЛ, что дает им возможность к росту и метастазированию. Этот феномен был обнаружен для 90% злокачественных новообразований, в том числе: потерю антигенов HLA I класса наблюдали в 90% случаев рака шейки матки, в 88,5% – при раке молочной железы, в 77% – при раке мочевого пузыря и раке гортани, в 74% – при раке ободочной и прямой кишки, в 63% случаев меланомы [81; 82]. При этом молекулярные модификации данных антигенов могут иметь вид обратимых и необратимых структурных дефектов, что описано для первичных солидных опухолей, метастатических поражений и линий малигнизированных клеток.

В последние годы частота встречаемости и особенности молекулярной реорганизации антигенов МНС I были достаточно подробно изучены, однако до сих пор остается неясным, как возникают эти молекулярные варианты и как их появление коррелирует с формированием первичного опухолевого очага и метастатическими процессами. Отсутствие клинических ответов на иммунотерапию может быть связано с иммунной селекцией типов опухолевых клеток, несущих антигены HLA с необратимыми структурными дефектами.

В частности, был описан случай больного меланомой кожи, который продемонстрировал смешанный ответ на вакцинотерапию аутологичными опухолевыми клетками с адьювантом



вакцины против туберкулеза BCG. При этом было обнаружено раннее уменьшение экспрессии антигенов МНС I класса малигнизированными клетками, потеря гетерозиготности (LOH) в локусе m2 $\beta$  хромосомы 15 в прогрессирующих метастатических очагах, в то время как в деградирующих участках опухоли выявили более высокую экспрессию этих антигенов [83]. Другим примером может служить выявление многочисленных структурных повреждений молекул МНС I класса в первичной опухоли мочевого пузыря, рецидивировавшей после иммунотерапии BCG [84]. При NY-ESO-1-специфической Т-клеточной терапии миеломы отсутствие клинического ответа коррелировало с появлением LOH на аллели МНС, кодирующей HLA-A\*02:01 [85]. Domingo-Domenech J. и соавт. (2012) продемонстрировали на модели *in vitro* рака простаты человека, что злокачественные клетки с пониженной экспрессией антигенов МНС I, полученные из первичной опухоли, формировали устойчивость к терапии доцетакселом. Кроме того, количество этих клеток в опухоли коррелировало с ее агрессивным потенциалом и плохим прогнозом [86]. Недавнее исследование, проведенное Grasso C.S. и соавт. (2020), показало, что индукция механизма презентации антигенов МНС I класса в биоптатах меланомы во время терапии предсказывала клинический ответ на блокаду иммунных контрольных точек [87].

Аналогичные результаты были получены в других работах, которые продемонстрировали, что отсутствие экспрессии МНС I класса коррелирует с худшим прогнозом при терапии ингибиторами иммунных контрольных точек [88]. Сопоставляя все данные вместе, можно прийти к заключению, что в первичной опухоли клетки с уменьшенной экспрессией антигенов МНС I имеют более высокий злокачественный потенциал, и, следовательно, контроль экспрессии этих антигенов может иметь предиктивное значение в прогнозе эффективности лечения, учитывая их роль в распознавании Т- и НК-клетками и влияние на онкогенные свойства опухолевых клеток [23; 35].

Уменьшение или исчезновение экспрессии опухолевых антигенов также является важным моментом в реализации механизмов «ускользания» опухоли от воздействия клеток иммунной системы и часто коррелирует с прогрессированием заболевания. Было обнаружено, что в некоторых опухолях, таких как колоректальный рак, гепатокарцинома, астроцитомы за счет гиперметилирования ДНК происходило уменьшение экспрессии *MAGE-A3*, *NY-ESO-1* и *SSX-2* [89; 90]. Эксперименты *in vitro* с использованием ингибиторов метилирования гистонов продемонстрировали увеличение экспрессии антигенов семейства MAGE клетками линий рака предстательной железы и рака легкого, что привело к появлению эффективного взаимодействия с антиген-специфическими ЦТЛ [48]. Результаты экспериментальных исследований послужили основанием для разработки новых подходов в терапии множественной миеломной болезни, позволивших использовать комбинированную терапию ингибитором метилирования гистонов

AZA и леналидомидом. В образцах костного мозга пациентов после применения данной комбинации препаратов обнаружили увеличенную экспрессию антигенов MAGE по сравнению с образцами до лечения. Кроме того, зарегистрировали антиген-специфическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови больных [91].

Исследование von Boehmer L. и соавт. (2013) продемонстрировало, что в результате иммунотерапии с использованием рекомбинантной пептидной вакцины к антигену NY-ESO-1 для лечения больного меланомой кожи, позитивной по антигенам NY-ESO-1, MAGE-C1 и Melan A, новые метастатические образования были лишены экспрессии NY-ESO-1, но оставались позитивными по экспрессии MAGE-C1 и Melan A, что доказывает существование феномена «иммунного редактирования» опухоли [92], а также необходимость воздействовать одновременно на широкий спектр опухолеассоциированных антигенов, чтобы предотвратить образование вариантов злокачественных клеток, негативных по экспрессии отдельных ОАА.

В ряде работ при изучении образцов первичных и метастатических опухолей с целью проследить возможные пути эволюции экспрессии и презентации ОАА было показано, что далеко не все ОАА исчезают в процессе метастазирования, а экспрессия ряда раково-тестикулярных антигенов увеличивается со временем [93; 94]. Кроме того, при аналогичных исследованиях подтипов рака молочной железы выявили, что в процессе опухолевой прогрессии увеличивается экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией и подвижностью клеток [94]. Riaz N. и соавт. (2017) исследовали изменения генома опухолей 68 больных диссеминированной меланомой кожи в процессе иммунотерапии с использованием препаратов ипилимумаб и ниволумаб. Было обнаружено, что у пациентов, не ответивших на терапию, уменьшался уровень мутационной и неоантигенной нагрузки, и анализ внутриопухолевой гетерогенности в процессе терапии демонстрировал дифференциальную клональную эволюцию и селекцию неоантигенов [95].

Известно, что злокачественные новообразования, даже одного гистологического типа, обладают широким варибельным мутационным спектром («mutanome»), который может быть быстро и точно выявлен с помощью современных молекулярно-генетических методов [96]. Данные исследования показали, что обычно солидные опухоли имеют от 50 до 1000 мутаций, большинство из которых являются уникальными для каждого пациента. В контексте изучения ОАА удалось установить, что возникающие эндогенные видоизмененные белки могут быть представлены на поверхности опухолевых клеток в виде отдельных пептидов, стимулирующих иммунный ответ как «не свой», «чужой». Эти уникальные опухолевые неоантигены являются продуктом соматических мутаций нормальных генов, которые сопровождают онкогенный процесс, что открывает возможность реального создания персонализированной иммунотерапии онкологических больных [97; 98]. Геномные мутации, приводящие к появлению неоантигенов,

затрагивают белковые последовательности, в том числе несинонимичные мутации, посттрансляционные модификации, меняющие аминокислоты, слияние генов, варианты, связанные со сдвигом рамки считывания [99; 100].

T-клетки, реактивные по отношению к неоантигенам, были обнаружены у больных меланомой, раком яичников, лейкозами, холангиокарциномой, и их присутствие было связано с благоприятным прогнозом [98; 101; 102]. Интересно, что у больных меланомой и немелкоклеточным раком легкого «мутационный груз» коррелировал с клиническим ответом на анти-CTLA-4- и анти-PD-1-иммунотерапию, соответственно, и количество T-лимфоцитов, специфичных к нео-антигенам, возрастало у пациентов, ответивших на лечение [103; 104].

Опухолевые клетки способны также вырабатывать резистентность к воздействию иммунных клеток-эффекторов путем усиления экспрессии анти-апоптотических молекул, таких как FLIP и Bcl-XL [105], или за счет постоянной активации про-онкогенных транскрипционных факторов, подобных сигнальному белку и активатору транскрипции из семейства белков STAT (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) [40]. Обнаружен еще один альтернативный механизм, позволяющий злокачественным клеткам избежать иммуноопосредованного киллинга, посредством экспрессии мутированных неактивных «рецепторов смерти» [105]. Становится понятно, что прогрессия любого злокачественного новообразования определяется балансом между защитными силами организма, реализуемыми иммунной системой, и ингибирующими факторами, позволяющими избежать опухолевым клеткам этого воздействия.

Кроме уникальных антигенов, опухолевые клетки имеют широкий спектр молекул, которые экспрессированы многими гистологическими типами злокачественных новообразований, а также могут встречаться в клетках нормальных тканей. На сегодняшний день количество известных антигенных эпитопов, распознаваемых T-лимфоцитами, насчитывается несколько сотен. В процессе эволюции знаний о системе антигенов малигнизированных клеток были предложены различные классификации ОАА, несколько лет назад была создана классификация, которая представляется наиболее аргументированной [106; 107].

Согласно этой классификации рассматривают следующие группы антигенов:

1) антигены, специфические для конкретного индивидуума, возникшие в результате соматических мутаций нормальных генных продуктов, как, например, циклин D-зависимая киназа CDK4 [108];

2) опухолеспецифические антигены, общие для всех злокачественных новообразований, такие как k-Ras [109], B-Raf [110];

3) опухолевые антигены, которые соответствуют нормальным тканеспецифическим генным продуктам так называемым «дифференцировочным антигенам», как MART-1 [111];

4) антигены, представляющие собой нормальные белки, продукты генов, которые не экспрессируются в нормальных тканях взрослого индивидуума, за исключением тканей яичка, но преимущественно экспрессированы в опухолях так называемые раково-тестикулярные антигены, например, MAGE [112];

5) гиперэкспрессированные антигены или aberrантно экспрессированные клеточные белки, такие как HER2/neu, hTERT и survivin [113].

#### 1.1.3.1.1. Раково-тестикулярные антигены

Раково-тестикулярные антигены представляют собой кластер опухоли-ассоциированных белков, которые не экспрессируются в нормальных соматических клетках, за исключением клеток семенников и плаценты, но широко представлены в разнообразных злокачественных новообразованиях [114]. К настоящему времени известно 283 РТА, объединяемых в семейства по ряду родственных признаков, которые классифицируют обычно в две основные группы: антигены СТ-Х, локализующиеся на Х-хромосоме, и составляющие 52% (120), и остальные так называемые «non-Х СТ», закодированные в аутосомах и в Y-хромосоме [115–117]. Необходимо отметить, что до сих пор функциональная роль большинства РТА в процессах опухолевого роста неизвестна, и среди семейств РТА только восемь являются наиболее изученными (MAGE-A, MAGE, MAGE-B, GAGE, SSX, LAGE1a, LAGE, MAGE-C) [115]. В то же время, благодаря интенсивным исследованиям функций РТА, уже стало известно, что активность этих генов ассоциирована со многими клеточными процессами, такими как сигнальная трансдукция, транскрипционная регуляция, активация протоонкогенов, пролиферация [118; 119]. Также РТА принимают участие в формировании неопластического фенотипа клеток, а именно способствуя иммортализации и биологической агрессивности, связанной с появлением способности к инвазии и метастазированию [112; 120].

Изучение экспрессии целого спектра генов в процессе метастазирования меланомы кожи дало возможность сделать вывод о том, что при опухолевой прогрессии увеличение уровня экспрессии раково-тестикулярных генов (РТГ) определяет, возможно, ее метастатический потенциал [121]. Уже получены данные, доказывающие участие РТА в миграции, инвазии и метастазировании малигнизированных клеток, и обнаружено, что РТА принимают участие в поддержании недифференцированного состояния стволовых клеток [122].

Некоторые РТГ способны экспрессироваться не только в репродуктивных тканях, но эта экспрессия крайне слабо выражена. В частности, есть данные, что *NY-ESO*, *N-RAGE*, *SSX* и *MAGE* слабо экспрессированы в стволовых мезенхимальных клетках костного мозга плода

и взрослого человека [123]. Обнаружение экспрессии этих генов в репродуктивных тканях и стволовых клетках указывает на их фундаментальную роль в эмбриональном развитии. Современные методы детекции экспрессии РТГ позволили ее выявить в тканях щитовидной железы (*SSX*), матки (*LAGE-1* и *NY-ESO-1*), а также в печени, селезенке, поджелудочной железе, однако уровень экспрессии РТА в нормальных тканях составил менее 1% от экспрессии в тканях яичка [124; 125]. Hofmann O. и соавт. (2008) классифицировали РТГ, активность которых была обнаружена в нормальных тканях, на три категории:

1) гены, экспрессия которых обнаруживается исключительно в тканях яичка, например *MAGE-A1* и *MAGE-A2*;

2) гены, экспрессия которых детектируется как минимум в тканях двух различных типов, в частности, *BAGE* и *NY-ESO-1*;

3) гены, экспрессия которых ограничена тканями яичка и центральной нервной системы – *MAGE-A9* [126].

Затем, когда было детектировано все возрастающее число РТГ, которые присутствуют только в зародышевых клетках, трофобласте и в опухолях, возникла и окрепла концепция, что абберантная экспрессия этих генов в злокачественных новообразованиях отражает реактивацию «молчащей» гаметогенетической программы в соматических клетках, и этот феномен является одной из движущих сил туморогенеза [127]. Кроме того, если предполагать, что генетические модификации в опухолевых клетках являются результатом реактивации обычно «молчащих» генетических программ, то они служат основой для проявления существенных характеристик злокачественных новообразований и, таким образом, представляют серьезный интерес как мишени для противоопухолевой иммунотерапии [112; 128].

В современной научной литературе накоплено большое количество данных по встречаемости РТА в различных опухолях. Было замечено, что часто диссеминация онкологического процесса связана с усилением экспрессии РТГ, и в этом контексте данный параметр может иметь прогностическое значение для прогнозирования исхода заболевания. В частности, усиление экспрессии РТГ сопровождается бластным криз при хроническом миелоидном лейкозе [129].

При раке мочевого пузыря обнаружено, что уровень экспрессии *MAGE* и *NY-ESO-1* ассоциирован со стадией заболевания [130]. Было показано, что только в 16% первичных меланом обнаружена экспрессия *MAGE-A1*, в то время как почти 50% метастатических форм меланомы кожи экспрессирует этот антиген [131]. Однако правило «чем выше уровень экспрессии, тем более диссеминированная форма злокачественной опухоли» справедливо далеко не для всех РТА. Например, в отличие от *MAGE-A1*, уровень экспрессии *NY-ESO-1* в первичных и метастатических образцах меланомы кожи оставался практически неизменным

в исследовании, проведенном Barrow С. и соавт (2006) [93]. Jo U. и соавт. (2022) исследовали экспрессию *NY-ESO-1* в различных саркомах мягких тканей и оценивали ее диагностическую ценность: оказалось, что 64 из 434 образцов сарком (14,75%) были иммунореактивными по отношению к *NY-ESO-1*, и наиболее частым типом опухоли в *NY-ESO-1*-положительной группе была миксоидная липосаркома (70,3%, 45/64), за которой следовала синовиальная саркома (17,2%, 11/64) [132].

При изучении функционирования протеина *SSX* оказалось, что его присутствие ассоциировано с виментином и матричной металлопротеиназой 2 (*MMP2*), и снижение экспрессии гена *SSX* ведет к уменьшению скорости клеточной миграции и сокращению продукции *MMP2*. Также экспрессия *SSX* связана с эпителиально-мезенхимальным переходом, снижение его экспрессии ведет к эпителизации и наоборот. Эти данные получены сначала при изучении мезенхимальных стволовых клеток [133], а затем при исследовании клеток рака предстательной железы [134]. Исследования Yang P. и соавт. (2015) также показали, что *MAGE-D4B*, *Piwil2*, *SSX*, *CAGE* и *CT45A1* принимают участие в регуляции функционирования генов, определяющих инициацию опухоли, эпителиально-мезенхимальный переход, распространение опухоли в организме [135]. Также было установлено, что ряд раково-тестикулярных генов – *MAGE-A*, *DNAJB8*, *CT45A1*, *Piwil2*, *SPANX* и *GAGE* – экспрессированы в стволовых опухолевых клетках (cancer stem-like cells), клеточной популяции, являющейся основой, как предполагается, процессов туморогенеза и источником опухолевой диссеминации [136].

Zhu H. и соавт. (2018) изучали функциональную роль экспрессии гена *PRAME* при гепатоцеллюлярной карциноме и обнаружили, что в клетках гепатокарциномы, нокаутных по этому гену, происходила активация процессов апоптоза, которая коррелировала с числом клеток на стадии клеточного цикла  $G_0/G_1$ , активацией гена *p53*, усилением экспрессии циклина *p21*, и ингибирование пролиферативной активности [137]. Российскими учеными было также показано, что блокирование белка *PRAME* на поверхности клеток различных опухолевых клеточных линий с помощью моноклональных антител приводит к подавлению роста и их гибели [138].

Недавно обнаруженный РТА *VAP31* связан с прогрессией и метастазированием рака шейки матки [139]. Была продемонстрирована высокая экспрессия гена *VAP31* при I, II, III стадии заболевания, которая коррелировала с неблагоприятным клиническим течением опухолевого процесса. Кроме того, *VAP31* связан с регуляцией пролиферации клеток рака шейки матки, и деплеция *VAP31* ингибирует гиперпролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток через механизм модуляции экспрессии ряда белков, ответственных за полимеризацию актина, фосфорилирование миозина, стабилизацию микротрубочек, то есть принимающих участие в реорганизации цитоскелета клетки. E.A. Maine и соавт. (2018)

показали, что такие РТГ, как *SPANX-A/C/D* и *CTAG2*, экспрессируются в клетках рака молочной железы и определяют особенности их инвазивного потенциала [140]. Интересно, что экспрессия *SPANX-A/C/D* была необходима для спонтанного метастазирования РМЖ в легкое, что еще раз подтвердило идею о том, что реактивация РТА играет существенную роль в формировании инвазивного фенотипа злокачественных клеток. В исследовании S. Jin и соавт. (2018) рака легкого удалось обнаружить статистически значимое усиление экспрессии *MAGE-A1*, *MAGEA-10*, *MAGE-B2* и *KK-LC-1* в метастатических опухолевых тканях, а экспрессия *CTAG1B* являлась независимым негативным прогностическим фактором при этом онкологическом заболевании [141].

Иммуногенность РТА предопределяет их использование в качестве мишеней при разработке приемов клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований. Иммуногенные свойства РТА связаны с их преимущественным присутствием в тканях яичка, являющегося иммунологически привилегированным органом за счет существования гематотестикулярного барьера, в реализации которого принимают в основном участие клетки Сертоли, оказывающие иммуносупрессирующее воздействие на клетки иммунной системы путем продукции активина А, гранзима В, TGF- $\beta$ , Fas-лиганда (FasL) [142]. Еще одной степенью защиты является отсутствие антигенов МНС I класса, что исключает распознавание формирующихся сперматоцитов, несущих на своей поверхности РТА, инфильтрирующими Т-лимфоцитами [143]. Таким образом, тканеспецифические антигены яичка, так же как глаза и нервной системы, биологически не являются частью репертура распознавания цитотоксическими Т-лимфоцитами [144], что дает потенциальную возможность использовать РТА для создания эффективных противоопухолевых вакцин.

На сегодняшний день, согласно результатам многих исследований, NY-ESO-1 считается одним из самых иммуногенных РТА, который способен вызывать выраженный спонтанный и индуцированный гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ [115]. Антитела против NY-ESO-1 были обнаружены в сыворотке крови 36% пациентов с раком щитовидной железы, 4–12,5% с раком легкого, 7–13% с раком яичников, 8–16% с раком молочной железы, 10% с меланомой кожи, 12,5% с раком мочевого пузыря [145; 146]. В то же время гуморальный иммунный ответ был обнаружен и на другие РТА. Например, были обнаружены антитела против SCP-1 – при раке поджелудочной железы [147]; антитела против SCP-1 и SSX-2 – при раке молочной железы [148]; при опухолях предстательной железы – против CTSP-1 [149]; против TSGA10 – при меланоме и гепатоцеллюлярной карциноме и, наконец, антитела против MAGEA3, SSX2 и NY-ESO-1 были идентифицированы в крови больных множественной миеломой [150]. Наряду с гуморальным иммунным ответом в ряде работ описаны эффекты, связанные с появлением субпопуляций CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, специфичных к РТА. В частности,

в исследовании Connerotte T. и соавт. (2008) продемонстрировано наличие корреляции между присутствием MAGE-A3-специфичных CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и регрессом опухоли у больных меланомой кожи [151]. Goodyear O. и соавт. (2010) обнаружили активацию MAGE-специфичных цитотоксических T-лимфоцитов у пациентов с острым миелоидным лейкозом [152]. Еще в одном исследовании NY-ESO-1 и MAGE-A3 были экспрессированы в 61,4% и 31,6% опухолевых клеток при T-клеточной лимфоме, соответственно [153]. При этом в крови 11,6% больных были обнаружены NY-ESO-1-специфические антитела и субпопуляцию NY-ESO-1-специфических ЦТЛ зарегистрировали у 55,6% пациентов. В этой связи очень интересными являются результаты, полученные Naik A. и соавт. (2021) в отношении антигена PRAME [154]. Оказалось, что клетки линии рака молочной железы MDA-MB-468, характеризующиеся сверхэкспрессией гена *PRAME*, ингибируют активацию ЦТЛ и их цитолитический потенциал, который может быть частично восстановлен путем подавления экспрессии *PRAME*.

Комплексный анализ растворимых медиаторов воспаления и экспрессии генов, ответственных за реализацию функций клеток иммунной системы, показал, что белок PRAME может подавлять экспрессию и секрецию множества провоспалительных цитокинов и медиаторов активации, дифференцировки и цитолиза ЦТЛ. Таким образом, с одной стороны, РТА опухолевых клеток являются многообещающими потенциальными мишенями для разработки иммунотерапевтических стратегий в лечении злокачественных новообразований, но, с другой стороны, нуждаются в дальнейшем изучении как возможные модуляторы противоопухолевого иммунного ответа.

### **1.1.3.2. Повреждение молекул сигнальной трансдукции на эффекторных клетках**

Распознавание опухолевых антигенов важно для активации иммунной системы. Нарушения молекулярных комплексов, которые ответственны за этот процесс (например, потеря сигнальной трансдукционной CD3- $\zeta$  цепи лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль) в сочетании с продукцией иммуносупрессивных цитокинов, присутствующих в опухолевом микроокружении, рассматривают как один из механизмов «уклонения» опухолевых клеток от воздействия иммунной системы [155; 156]. При этом потеря CD3- $\zeta$  коррелирует с увеличением количества IL-10 и TGF- $\beta$ , и пониженной регуляцией IFN- $\gamma$ .

Цепь CD3- $\zeta$  расположена в виде большого интрацитоплазматического гомодимера в T-клеточном рецепторе (TCR), который формирует часть комплекса TCR-CD3, функционирующего как единственный передатчик после связывания антигена. Так как трансдукция сигнала TCR через формирование CD3 комплекса – один из трех важных сигналов



для инициации успешной иммунной реакции, так же как экспрессия антигенов опухоли и поляризация Т-хелперов 1 типа, любые повреждения цепочки CD3- $\zeta$ , которые связаны с отсутствием p56lck тирозинкиназы, но не CD3- $\epsilon$ , вызывают изменения в сигнальном пути для Т-лимфоцитарной активации. Повреждения TCR- $\zeta$  найдены в нескольких типах опухолей, таких как рак поджелудочной железы [157], меланома глаза [158], рак почки [159], рак яичников [160] и рак слизистой ротовой полости [161]. При этом было обнаружено, что данные нарушения эффекторных молекул коррелируют с плохим прогнозом заболевания.

Также было выявлено, что лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, демонстрировали спонтанный апоптоз *in vitro*, который был связан с низкой экспрессией антиапоптотических белков Bcl-XL и Bcl-2 [162]. Было установлено, что, поскольку TCR- $\zeta$  является субстратом ключевого фермента апоптоза каспазы 3 [163], опухолевые клетки могут вызвать каспаза-зависимые апоптотические каскады в Т-лимфоцитах, которые не защищены эффективно Bcl-2 [164]. При изучении плоскоклеточного рака ротовой полости обнаружено, что высокая пропорция в опухоли апоптотических Т-лимфоцитов коррелирует с экспрессией FasL на опухолевых клетках. FasL-положительные микровезикулы вызвали каспаза-3-зависимое дробление, высвобождение цитохрома с, потерю потенциала митохондриальной мембраны и уменьшение экспрессии цепи TCR- $\zeta$  в лимфоцитах-мишенях [165]. Так как большинство опухолевых антигенов, на которые традиционно нацелены противоопухолевые вакцины, являются немутантными сверхэкспрессируемыми аутоантигенами, индуцирующими в основном Т-клетки с низкоаффинными TCR, неспособными опосредовать эффективный противоопухолевый ответ, разработка иммунотерапевтических стратегий сосредоточена последнее время на применении модифицированных пептидов, улучшающих связывание с молекулами MHC I класса и TCR [166]. Кроме того, разработанные CAR-T-технологии позволяют создавать генетические модификации рецепторов Т-лимфоцитов, в результате чего CAR-T-клетки способны распознавать антигены независимо от MHC-презентации, благодаря уникальной структуре CAR, содержащей трансмембранную область с антигенсвязывающим доменом и внутриклеточными сигнальными и ко-сигнальными доменами, что позволяет MHC-независимым CAR-T-клеткам связываться со своей мишенью [167]. Таким образом, терапия CAR-T-клетками может преодолеть опосредованную опухолью иммунную толерантность.

### **1.1.3.3. Создание локальных неблагоприятных условий в микроокружении для реализации функций клеток иммунной системы за счет особенностей метаболизма опухолевых клеток**

В результате реализации «эффекта Варбурга» в опухоли, когда малигнизированные клетки производят энергию преимущественно с помощью очень активного гликолиза с

последующим образованием молочной кислоты, даже в условиях избытка кислорода, в результате чего имеет место высокое потребление ими глюкозы, наблюдается низкая концентрация глюкозы в микроокружении опухоли. В условиях недостатка глюкозы опухолевые инфильтрирующие Т-лимфоциты демонстрируют уменьшение аэробного гликолиза и генерацию фосфоэнолпирувата, метаболита, вовлеченного в TCR-зависимую активацию  $Ca^{2+}$  и NFAT-сигнального пути, что ведет к потере их противоопухолевых эффекторных функций [168]. Как было показано, закисление среды в опухолевой ткани сопровождается угнетением пролиферации ЦТЛ и продукции ими цитокинов, что в конечном итоге приводит к угнетению их цитотоксической активности, ингибирует дифференцировку и активацию ДК, но не затрагивает функции Т-регуляторных лимфоцитов [169; 170].

В процессе опухолевой прогрессии также играет роль нарушение метаболизма аминокислот, в частности, L-аргинина и триптофана [171]. Как было показано для КРР, РЯ, рака легкого, РПЖ и меланомы, опухолевые клетки способны синтезировать индуцибельные изоформы синтазы оксида азота, одного из ферментов, регулирующих метаболизм L-аргинина. Подобная закономерность была обнаружена также в отношении аргиназы. Активация этих энзимов способствовала образованию высокого уровня оксида азота NO, который, реагируя с молекулами кислорода в опухолевом очаге, образует реактивные молекулы, такие как пероксинитрит (RNS), обладающий токсичностью для многих клеток, в том числе и для Т-лимфоцитов, индуцируя их апоптоз [172]. RNS способен модулировать фосфорилирование тирозина в некоторых белках, таких как CD3 $\zeta$ -цепь или TCR-комплекс, и высвобождать ионы кальция из внутриклеточных компартментов, вызывая таким образом ослабление экспрессии мембранных рецепторов CD4, CD8 и хемокиновых рецепторов на Т-клетках [173]. Нитрование и нитрозилирование хемокиновых рецепторов, происходящее в опухолевом микроокружении, играет важную роль в реакциях противоопухолевого иммунитета, и RNS-индуцированные модификации, например, CCL2, удерживают Т-лимфоциты в строме на границе опухолевого очага, препятствуя их проникновению в неопластическую ткань [169; 174]. Обнаружено также, что локальное обеднение микроокружения триптофаном приводит к изменению активности Т-лимфоцитов, индуцируя их анаргию и апоптоз [175]. Исчезновение триптофана в опухолевом микроокружении – это результат ускоренного катаболизма аминокислоты ферментом индолеомин 2,3-диоксигеназой (IDO), который преобразовывает триптофан в куренин и производит NAD.

Weinlich G. и соавт. (2006) продемонстрировали, что у больных меланомой кожи наблюдается избыточная активация IDO, которая ассоциирована со стадией заболевания [176]. Затем подобный феномен был обнаружен в опухолях человека различной нозологии, таких как лейкозы, рак толстой кишки и рак яичников, где IDO экспрессировалась злокачественными

клетками, эндотелиоцитами и опухолеассоциированными клетками иммунной системы, главным образом антиген-презентирующими клетками: ДК и макрофагами, способствующими иммунной супрессии [177]. На мышинной модели было показано, что антиген-специфические цитотоксические Т-лимфоциты не накапливаются в опухолевой ткани в присутствии IDO, экспрессированной малигнизированными клетками, однако введение конкурентоспособного ингибитора IDO 1MT, который является аналогом триптофана, позволяло преодолеть этот толерогенный процесс [178]. Аналогичный эффект оказывала молекула INCB024360, ингибирующая активность IDO в аденокарциноме поджелудочной железы мыши, что приводило к торможению опухолевого роста за счет восстановления функций опухолеассоциированных ЦТЛ [179].

Гипоксия, которая характерна для большинства опухолевых тканей, влияет на функции клеток иммунной системы. В частности, было показано, что гипоксия серьезно затрагивает субпопуляции натуральных киллерных клеток, воздействуя на их иммунорегуляторные функции и меняя хемотаксис [180]. Инкубация NK-клеток периферической крови в условиях гипоксии в течение 16 и 96 часов приводила к значительному изменению экспрессии 729 и 1100 генов, соответственно, что указывает на влияние дефицита кислорода на транскриптом этих клеток, причем функции генов, чувствительных к гипоксии, были ассоциированы с такими биологическими процессами, как метаболизм клеточного цикла, дифференциация клеток, апоптоз, клеточный стресс и организация цитоскелета. Подобные условия вызвали иммунофенотипические и функциональные изменения NK-клеток: снижалась продукция IFN- $\gamma$ , фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), GM-CSF, хемокинов CCL3, CCL5 и экспрессия хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR4.

Аналогичные исследования были проведены в отношении функций ДК, когда удалось установить, что в смоделированных условиях хронической гипоксии (1% O<sub>2</sub> в течение 96 ч) происходит репрограммирование профиля экспрессии цитокинов и хемокинов зрелыми ДК, полученными из моноцитов периферической крови [181]. Под влиянием низкой концентрации кислорода ДК начинали продуцировать провоспалительные цитокины и хемокины, привлекающие преимущественно нейтрофилы – CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 и CXCL8, а также CCL20, CCL3 и CCL5, формирующие положительный хемотаксис для активированных Т-лимфоцитов, Т-клеток памяти, моноцитов, незрелых ДК. Кроме того, под влиянием гипоксии активировались другие гены, связанные с процессами воспаления и ангиогенеза, такие как гены, кодирующие остеопонтин, VEGF, IL-1 $\beta$ .

Вместе с тем в условиях низкого содержания кислорода все клетки будут производить АТФ за счет более высокой скорости анаэробного гликолиза, что приведет к повышению уровня активных форм кислорода (АФК) как в опухолевых, так и в иммунных клетках [182].

Недостаток энергии может подавлять развитие ДК, а высокий уровень АФК может препятствовать их созреванию через пути p38-МАРК и ERK1/2 и влиять на презентацию антигена. Кроме того, гипоксия активирует в ДК фактор, индуцируемый гипоксией (HIF), который, в свою очередь, повышает экспрессию проапоптотического белка BAX, индуцирует активность гена *BNIP3* и способствует гибели клеток. Есть данные, которые демонстрируют, что HIF ингибирует процессы на презентации антигена и миграционную способность ДК посредством метаболического перепрограммирования в сторону гликолиза, предотвращения активации рецептора CCR7 и через сигнальный путь HIF/VEGF [183].

#### **1.1.3.4. Индуцированная функциональная несостоятельность антиген-презентирующих клеток**

Среди АПК дендритные клетки играют ведущую роль, так как они способны захватывать, обрабатывать и представлять наивным Т-лимфоцитам самый разнообразный спектр антигенов, включая ОАА [184; 185]. ДК также играют важную роль в поддержании врожденных и приобретенных иммунных реакций путем взаимодействия со множеством лимфоидных и миелоидных клеток в нормальных и различных патофизиологических условиях. ДК дифференцируются из костно-мозговых гематопоэтических клеток-предшественников, при определенных условиях их возможно получить также из моноцитов периферической крови. Обычно незрелые формы ДК можно обнаружить в различных нелимфоидных тканях и органах, но после активации ДК мигрируют к лимфоидным тканям, чтобы взаимодействовать с Т-лимфоцитами и вызвать иммунные реакции [185]. Незрелые ДК экспрессируют малое количество антигенов МНС и костимулирующих молекул и неспособны эффективно активировать Т-лимфоциты, несмотря на то, что их эндоцитозный потенциал достаточно высок [186]. Активация ДК под влиянием различных стимулов созревания связана с развитием увеличения экспрессии различных внутриклеточных и поверхностных молекул, необходимых для перемещения к вторичным лимфоидным тканям и обеспечения определенных сигналов Т-лимфоцитам. Однако активация и созревание ДК зависят от микроокружения и могут быть заблокированы или поляризованы специфическими факторами или их комбинациями, приводящими к формированию субпопуляций ДК с толерогенными и иммунодепрессивными свойствами [187].

До недавнего времени считалось, что функциональная активность ДК ассоциирована с их созреванием. Однако накапливается все больше данных, указывающих, что эти клетки способны существовать во множестве промежуточных функциональных состояний от абсолютно незрелых до полностью функционально зрелых ДК. Эти состояния определяются условиями микроокружения, совокупность стимулов которого может создавать условия для

иммунной толерантности и иммунной супрессии [188; 189]. На данный момент сформировалось представление, что ДК – это группа высокопрофессиональных АПК, обладающих высокой функциональной пластичностью, и способных демонстрировать как иммуностимулирующий, так и иммунодепрессивный потенциал в зависимости от комбинаций стимулов микроокружения, которые воздействуют на все аспекты биологии ДК и контролируют функциональность и жизнеспособность всех субпопуляций ДК [190].

Ускользание опухоли от иммунного надзора сопряжено с использованием множественных механизмов, позволяющих малигнизированным клеткам избежать иммунного распознавания и устранения, что способствует выживанию таких опухолевых клеток и опухолевой прогрессии. Эти процессы связаны с реализацией прямого или опосредованного взаимодействия злокачественных клеток с компонентами иммунной системы, возникающего в опухолевом микроокружении или на системном уровне, где первостепенное значение имеют растворимые медиаторы, продуцируемые опухолевыми клетками и клетками стромы.

Zong J. и соавт. (2016) предложили классификацию факторов, известных на сегодняшний день, которые могут вырабатываться опухолевыми клетками и воздействовать на субпопуляции ДК [191]:

1) цитокины, хемокины и ростовые факторы, индуцирующие блокаду дифференцировки дендритных клеток и их апоптоз, ингибирующие созревание и миграцию: VEGF, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, колониестимулирующий фактор CSF-1, макрофагальный колониестимулирующий фактор M-CSF, лиганд ядерного фактора  $\kappa$ -B RANKL, хемокины CCL2, CXCL12;

2) некоторые опухолевые антигены, такие как простат-специфический антиген (PSA), муцин, ассоциированный с поверхностью клетки (MUC1), хорионический гонадотропин; обнаружено, что эти молекулы индуцируют блокаду созревания, ингибируют миграцию ДК, способствуют формированию толерогенного иммунофенотипа;

3) другие молекулы, продуцируемые опухолью, такие как ганглиозиды, простаноиды, например простагландин PGE<sub>2</sub>, полиамины, продукт гликолиза молочная кислота, аденозин, накапливающийся в опухолевой ткани в результате гипоксии, липиды, такие как триглицериды, нейропептиды;

4) микровезикулы (экзосомы) опухолевых клеток, представляющие собой разнородную группу мембранных частиц, оторвавшихся с поверхности опухолевых клеток и находящихся во внеклеточной среде.

Экзосомы могут нести в себе широкий репертуар различных веществ: белки, липиды, гликопротеиды, гликолипиды, пептиды, РНК, микроРНК и ДНК, которые могут участвовать в формировании микроокружения, благоприятствующего развитию злокачественного

новообразования [192]. Уже накоплены данные, свидетельствующие, что экзосомы опухолевых клеток воздействуют на функции миелоидных клеток в опухолевом микроокружении и нарушают дифференцировку моноцитов в активированные ДК путем формирования их иммуносупрессивного фенотипа [193]. В частности, экзосомы, выделенные из ткани рака легкого, содержащие рецептор эпидермального фактора роста EGFR, вызывали формирование субпопуляции толерогенных ДК, которые стимулировали появление опухолеспецифических регуляторных Т-лимфоцитов [194].

#### **1.1.3.5. Иммуносупрессивные растворимые факторы, синтезируемые опухолевыми клетками**

Активное изучение опухолевого микроокружения привело к пониманию, что малигнизированные клетки в результате естественной селекции, возникающей в процессе иммунного редактирования, реализуют механизмы, которые создают условия для дальнейшей злокачественной прогрессии. Множество растворимых факторов, продуцируемых опухолевыми клетками, способствуют появлению сложных местных и региональных иммуносупрессивных сетей, которые благоприятствуют росту опухоли, инвазии и метастазированию путем ингибирования активности клеток иммунной системы, непосредственно принимающих участие в распознавании и элиминации злокачественных клеток, а именно Т-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток, перепрограммирования клеток миелоидного происхождения, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги, формирующих благоприятную и защитную нишу для метастазирующей опухоли [105; 195; 196]. Опухолевые клетки экспрессируют и секретируют в окружающую среду компоненты экстрацеллюлярного матрикса, факторы роста, цитокины, хемокины, протеазы, другие ферменты и метаболиты, среди которых можно отметить VEGF [197], IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , фактор роста и дифференциации GDF-15, M-CSF, простагландины E2, фосфотидилсерин, Fas и FasL, MICA/B, молочная кислота и другие [195; 197; 198].

##### **1.1.3.5.1. Лиганды рецептора NKG2D (NKG2DL)**

Известно, что активность NK-клеток регулируется ингибиторными рецепторами, которые связаны с молекулами MHC I класса, и активационными рецепторами, которые взаимодействуют с лигандами на опухолях и/или зараженных вирусом клетках. Ингибирующие рецепторы человека включают рецептор killer Ig-like receptor 2DL, killer Ig-like receptor 3DL1 и CD94/NKG2A, тогда как к активационным рецепторам можно отнести рецепторы естественной цитотоксичности NKp30, NKp44, NKp46 и lectin-подобную молекулу NKG2D, которая экспрессирована на всех NK-клетках, большей части NKT-клеток,  $\gamma\delta$ T-, CD8 $^+$  $\alpha\beta$ T-клеток, в меньшей степени на CD4 $^+$  $\alpha\beta$ T-клетках с регуляторной активностью [198; 199]. Таким образом,

НК-клетки и ЦТЛ объединяет система рецептора/лиганда, вовлеченных в инициирование и регулирование клеточного иммунитета.

Экспрессия лигандов NKG2D регулируется на транскрипционном, трансляционном и пост-трансляционном уровнях, ее активация ассоциирована с феноменом теплового шока, функционированием семейств транскрипционных факторов NF-κB и Sp, ответом на повреждения ДНК, связанные с активацией ATM/ATR киназ, вирусных и клеточных онкогенов, с провоспалительными сигналами, следующими за активацией Toll-подобных рецепторов и цитокинов, особенно интерферонов I и II типа [200]. Таким образом, неповрежденные, неактивированные и нетрансформированные клетки не экспрессируют лиганды рецептора NKG2D, что гарантирует эффективность системы NKG2D/NKG2DL при реализации контроля со стороны иммунной системы [201]. После активации и созревания моноциты и ДК начинают экспрессировать NKG2DL, которые способствуют костимуляции Т-лимфоцитов зрелыми ДК [202]. Кроме того, низкий уровень экспрессии NKG2DL был также обнаружен в антиген-активированных Т-лимфоцитах человека, что позволило предполагать существование механизма устранения этих клеток путем взаимодействия с НК-клетками для регуляции иммунных реакций, осуществляемых Т-лимфоцитами [203].

NKG2DL включают два семейства молекул, локализующихся на клеточной поверхности [199; 204]. Первое семейство включает трансмембранные белки MICA и MICB (MHC class I related-chain genes A and B), характеризующиеся широким полиморфизмом, по крайней мере на сегодняшний день известно более чем 80 и 30 вариантов MICA и MICB последовательностей, соответственно [205; 206]. Гиперэкспрессия MICA/B, обнаруженная в клетках опухолей, говорит о том, что этот феномен может играть важную роль в регуляции процессов развития и роста злокачественных новообразований [207]. Действительно, в экспериментах на мышах было показано, что опухолевые клетки, экспрессирующие Rae1 или H60 (аналоги человеческих MICA/B), *in vitro* при кокультивировании с лимфоцитами подвергались лизису и, подсаженные сингенным мышам, были полностью элиминированы [208].

Второе семейство лигандов NKG2D представлено белками ULBP1-6 (UL16-binding proteins), которые являются или трансмембранными, или glycosylphosphatidylinositol (GPI) – связанными молекулами [200]. Не совсем понятно, почему существует такое множество лигандов всего для одного поверхностного клеточного рецептора, но существует предположение, что различные лиганды дифференцированы в зависимости от типа стрессорного воздействия на клетку, что позволяет ей лучше приспособиться к различным условиям окружающей среды.

Практически все опухоли экспрессируют NKG2DL, и наиболее выражена их экспрессия в малигнизированных клетках эпителиального происхождения и при лейкозах и лимфомах.

MICA и/или MICB экспрессируются в таких эпителиальных опухолях, как РМЖ, рак легкого, толстой кишки, РП, РПЖ, РЯ, а также в саркомах, глиомах и меланомах [209–212]. Хотя обычно наблюдается коэкспрессия MICA и MICB, некоторые опухолевые клеточные линии несут поверхностные молекулы только одного типа [213]. Кроме того, эпителиальные опухоли способны также экспрессировать один или несколько лигандов семейства ULBP1-6, в основном ULBP2, ULBP3 или ULBP5 [213; 214]. Интересно, что у человека присутствие MICA в злокачественных новообразованиях эпителиального происхождения коррелирует с увеличением количества  $V\delta 1\gamma\delta$  Т-клеток, инфильтрирующих опухоль. Вместе с тем, несмотря на наличие этих лигандов на поверхности опухолевых клеток, эти новообразования часто проявляют биологически агрессивные свойства, что, в свою очередь, наводит на мысль о функциональном нарушении передачи сигналов MIC/NKG2D [215]. Выяснилось, что на последнем этапе взаимодействия связывание с MIC вызывает эндоцитоз и деградацию NKG2D. У онкологических больных экспрессия этого рецептора заметно уменьшена на большинстве Т-клеток, инфильтрирующих опухоль и присутствующих в периферической крови. Этот системный дефицит связан с циркулирующими молекулами MICA, которые в результате протеолиза слущиваются с поверхности опухолевых клеток и являются причиной низкой плотности NKG2D, что приводит в свою очередь к уменьшению ответа антиген-специфических эффекторных клеток [216]. Кроме того, показано, что опухолевые клетки способны секретировать NKG2DL посредством экзосом [217]. В экспериментах на клеточных линиях остеосарком Sun D. и соавт. (2011) продемонстрировали участие металлопротеиназ в процессах протеолитического расщепления, ведущих к потере NKG2DL с клеточной поверхности [218].

Существует представление, что семейство белковых пептидаз так называемые ADAM-протеазы («A Disintegrin And Metalloproteinase») или шеддазы, способные к отщеплению внеклеточных фрагментов мембранных белков, играют определяющую роль в протеолитическом слущивании лигандов с поверхности опухолевых клеток [199].

Chitadze G. и соавт. (2013) классифицируют пути секреции свободных NKG2DL в опухолевое микроокружение, выделяя три группы:

- 1) слущивание лигандов с клеточной поверхности с помощью механизма, опосредованного ADAM-протеазами;
- 2) секреция мембраносвязанных лигандов, заключенных в экзосомы;
- 3) высвобождение из клеточной мембраны GPI-связанных ULBP1-6 за счет системы PI-PLC (фосфоинозитид фосфолипазы C) [199].

Можно рассматривать шеддинг NKG2DL как механизм, обеспечивающий блокаду функций NK- и Т-клеток, который является разновидностью «уклонения» опухоли от иммунных реакций. В литературе неоднократно описано увеличенное содержание растворимых



NKG2DL в сыворотке крови онкологических больных, а также корреляцию между уровнем лигандов и стадией опухолевого процесса или прогрессированием заболевания [216; 219].

Очевидно, что для пациента с высоким содержанием подобных молекул на системном уровне иммунотерапия, направленная на активацию специфических иммунных реакций ЦТЛ, может быть неэффективна.

#### **1.1.3.5.2. Трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$**

Трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$  – это мультифункциональный цитокин, который играет важную роль в эмбриональном развитии и в поддержании гомеостаза тканей взрослого организма, участвуя в регуляции процессов клеточной пролиферации, дифференциации, апоптоза и миграции [220].

TGF- $\beta$  существует у млекопитающих в виде трех изоформ: TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , и TGF- $\beta_3$ , при этом TGF- $\beta_1$  – наиболее распространенная и универсально экспрессируемая изоформа, большинство исследований посвящено именно экзогенному TGF- $\beta_1$  [221; 222].

В норме TGF- $\beta_1$  может синтезироваться многими типами клеток, в том числе активированными Т-лимфоцитами, макрофагами, и ингибирует продукцию IL-2, IL-4, IL-7, в результате чего происходит блокада IL-2-зависимой пролиферации ЦТЛ. TGF- $\beta_1$  также ингибирует дифференцировку Т-клеток и предохраняет наивные Т-клетки от приобретения эффекторных (цитотоксических или хелперных) функций [222]. В естественных условиях TGF- $\beta_1$ -дефицитные мыши не имеют клеток Лангерганса в эпидермисе, хотя предшественники этих клеток у мышей имеются, что говорит о необходимости присутствия TGF- $\beta_1$  для нормального развития клеток Лангерганса и/или их миграции в эпидермис [223]. Макрофаги секретируют TGF- $\beta_1$ , который регулирует их функции в тканях [224].

При опухолевом росте TGF- $\beta$  является ключевым компонентом и модулятором в опухолевом микроокружении, который ингибирует активность клеток-эффекторов и способствует привлечению клеток иммунной системы с супрессивными свойствами [225; 226]. В опухолевом микроокружении TGF- $\beta$  может синтезироваться злокачественными клетками, подобными стволовым (СКО), самими малигнизированными клетками, клетками стромы, такими как опухолеассоциированные фибробласты (CAF), клетками иммунной системы, а именно регуляторными Т-лимфоцитами, регуляторными В-клетками, макрофагами M2, супрессорными клетками миелоидного происхождения (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) [227]. Необходимо отметить, что фибробласты опухолевой стромы представляют собой наиболее многочисленную популяцию клеток микроокружения опухоли, находящейся в реципрокном взаимодействии практически со всеми остальными компонентами микроокружения, и таким образом принимающую непосредственное участие в реализации

феномена «иммунной инвазии». TGF- $\beta$  является основным медиатором, опосредующим трансформацию фибробластов, приобретающих фенотип CAF и способствующим направленной миграции CAF в опухолевые очаги [228]. Интересно, что под влиянием TGF- $\beta$ , продуцируемого опухолевыми клетками, CAF регулируют процесс накопления гликогена в злокачественных клетках независимо от MAPK-сигнального пути (Mitogen-activated protein kinase), что приводит к активации их пролиферации, инвазии и метастазирования [229].

TGF- $\beta$  является регулятором состояния межклеточного матрикса, увеличивая его жесткость за счет активации экспрессии гена коллагена I типа [230]. Недавние исследования, посвященные математическому моделированию движения опухолевых клеток в экстрацеллюлярном матриксе, продемонстрировали важность жесткости его структур для эффективного движения малигнизированных клеток, что может иметь значение для понимания закономерностей процессов инвазии и метастазирования [231]. Кроме того, TGF- $\beta$  индуцирует высвобождение тромбоспондина-4 из экстрацеллюлярного матрикса в опухолевом микроокружении и его аккумуляцию в эндотелиальных клетках, что, в свою очередь, приводит к индукции ангиогенеза [232]. Ряд исследователей полагают, что индукция неоангиогенеза является предпосылкой к формированию отдаленных метастазов [233].

Достижения в исследовании СКО позволили установить важную роль TGF- $\beta$  в их биологии, было показано, что этот фактор способствует поддержанию популяции СКО, в частности, под его влиянием увеличивается экспрессия маркера СКО CD133 в культивируемых клетках рака печени и туморогенность данных клеточных линий при изучении опухолевого роста на мышах [234]. Кроме того, опухолеассоциированные макрофаги инициируют свойства СКО через эпителиально-мезенхимальный переход, индуцированный посредством TGF- $\beta$  в гепатоцеллюлярной карциноме [235]. Существуют различия в эпигенетической регуляции активности генов, связанных TGF- $\beta$ -сигнальными путями, в стволовых и дифференцированных опухолевых клетках. Так, сообщалось, что уровень метилирования генов, экспрессирующих белки, участвующих в TGF- $\beta$ -сигналинге, ассоциирован с процессами дифференцировки СКО при раке молочной железы [236]. Данные свидетельствуют, что некоторые участники TGF- $\beta$ -сигнальных путей являются мишенью для длинных некодирующих последовательностей РНК (lncRNA), ключевых эпигенетических медиаторов, что может частично объяснить связь между функциями СКО и активностью TGF- $\beta$  [237]. Подобные результаты могут лечь в основу разработки новых агентов специфического контроля функционирования СКО и тем самым обеспечить развитие новых подходов к лечению и профилактике злокачественных новообразований.

TGF- $\beta$  регулирует активность популяции натуральных киллерных клеток, оказывая на них двойственное антагонистическое воздействие [222]. Показано, что клетки меланомы, нейробластомы, разнообразных карцином, лейкозов могут синтезировать TGF- $\beta_1$ , который способствует стимуляции роста опухоли путем угнетения функций цитотоксичности и продукции цитокинов киллерных клеток, стимулированных IL-2 или IL-12 в модельных системах *in vitro* [220]. Через сигнальный путь, реализующий Smad3, TGF- $\beta$  ингибирует IFN- $\gamma$ -зависимую генерацию NK-клеток [226]. Кроме того, Gao Y. и соавт. (2017) на модели метилхолантрен-индуцированной фибросаркомы мыши продемонстрировали, что TGF- $\beta$  опосредует конверсию NK-клеток в лимфоидные клетки первого типа (ILC1), которые фенотипически очень близки натуральным киллерным клеткам, но отличаются от них функционально, накапливаются в опухолевом микроокружении и посредством продукции TNF способствуют опухолевому росту и появлению метастазов [215]. Так, экспериментальные исследования позволили установить еще один, ранее неизвестный, механизм «ускользания» опухоли от контроля врожденной иммунной системы. С другой стороны, Smad4 обеспечивает механизм, обладающий противоположным эффектом, увеличивающим созревание функционально полноценных NK-клеток, способных супрессировать опухолевый рост [238]. Интересно, что эти процессы ассоциированы с типом опухоли и стадией заболевания. На ранних стадиях опухолевого процесса активность Smad4 преобладает в NK-клетках, на поздних этапах развития злокачественного новообразования, за счет большой концентрации TGF- $\beta$  в опухолевом микроокружении, происходит блокада этого сигнального пути и «переключение» функциональной программы [226]. Эти наблюдения позволяют заключить, что стадия опухолевого процесса и концентрация TGF- $\beta$  являются взаимосвязанными явлениями, определяющими дальнейшую прогрессию опухоли.

Как было обнаружено в экспериментах на мышах, иммуносупрессивные воздействия на T-лимфоциты могут быть реализованы через CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-регуляторные T-клетки, которые экспрессируют TGF- $\beta_1$ , связанный с клеточной поверхностью, и секретируют TGF- $\beta_1$  в окружающую среду. TGF- $\beta_1$ -дефицитные мыши развивают серьезный аутоиммунный фенотип, ведущий к смерти через 3 недели из-за присутствия в организме животных сверхактивных T-клеток в результате блокады сигнального пути TGF- $\beta_1$ , приводящей к спонтанной активации T-лимфоцитов и развитию аутоиммунной болезни в легких и кишечнике [239; 240]. Таким образом, выключение гена *TGF- $\beta_1$*  приводит к развитию фатально генерализованной воспалительной патологии, в основе которой лежит аутоиммунный процесс. Он является элементом обратной регуляции иммунного ответа и, прежде всего, воспалительной реакции. Как правило, у больных раком легкого и колоректальным раком концентрация TGF- $\beta_1$

в плазме крови повышена и коррелирует со степенью прогрессии опухоли [241; 242]. У пациентов с диссеминированными формами заболевания наблюдали блокаду функционирования NK-клеток, и предполагается, что TGF- $\beta_1$ , синтезируемый у онкологических больных, может влиять на синтез и функцию NK-рецепторов, вовлеченных в лизис клеток опухоли. При этом иммуносупрессирующее действие TGF- $\beta_1$ , присутствующего в плазме больных, модулирует ответы NK-клеток снижением экспрессии NKG2D [243].

Таким образом, TGF- $\beta$  является фактором, играющим одну из ключевых ролей в инициации опухолевой прогрессии путем реализации трех механизмов: облегчения мезенхимально-эпителиального перехода, стимуляции неоангиогенеза и индукции иммуносупрессии.

### **1.1.3.5.3. Интерлейкин-10**

Еще один фактор, который могут синтезировать опухолевые клетки, IL-10 оказывает сложное антагонистическое воздействие на рост и развитие опухоли. С одной стороны, на многих экспериментальных системах была продемонстрирована его противоопухолевая активность, с другой стороны – проонкогенное воздействие [63].

Согласно мнению ряда исследователей, основные биологические функции IL-10 в контексте воздействия на эволюцию злокачественных новообразований можно рассматривать следующим образом:

- стимулирование пролиферации и активация цитолитической функции ЦТЛ;
- ингибирование презентации антигена и продукции провоспалительных цитокинов, особенно IL-12 и IL-23, АПК;
- стимуляция роста опухолей через поддержание хронического воспаления [244].

Повышенное количество IL-10 в кровотоке больных зарегистрировано при меланоме кожи, раке ободочной кишки, яичников, легкого, В-клеточной лимфоме, неходжкинской лимфоме, при этом одним из возможных источников этого системного увеличения содержания IL-10 в крови онкологических больных называют непосредственно сами опухолевые клетки [244]. Молекулярно-генетический скрининг позволил идентифицировать значительные количества IL-10 в тканях опухолей, в том числе при раке яичников, молочной железы, почки, легкого, меланоме, плоскоклеточной и базальноклеточной карциномах кожи [245]. Был обнаружен высокий уровень продукции IL-10 в метастазах меланомы и в культивируемых клетках меланомы, выделенных из метастатических образований [246], что дало возможность предположить в дальнейшем участие этого интерлейкина в патогенезе процессов «ускользания» клеток меланомы от контроля иммунной системы, так как IL-10 способен ингибировать экспрессию антигенов HLA I и II класса, так же как межклеточную адгезию, опосредованную

адгезионными молекулами ICAM1, локализованными на поверхности малигнизированных меланоцитов [247]. Было описано повышенное содержание IL-10 в тканевых гомогенатах немелкоклеточного рака легкого, по сравнению с образцами нормальной легочной ткани, при этом иммуноцитохимически была подтверждена локализация IL-10 в опухолевых клетках [248].

Кроме собственно клеток опухоли, клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения секретируют IL-10 в ответ на различные стимулы [249]. К ним относятся макрофаги, моноциты, ДК, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, NK-клетки, а также регуляторные Т-лимфоциты, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т- и В-лимфоциты. Совсем недавно группа клеток, продуцирующих IL-10, пополнилась в результате исследований резидентных макрофагов, таких как микроглия [250], и кардиальных макрофагов [251]. В опухолевом микроокружении опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) способны продуцировать IL-10, посредством которого они способствуют экспансии регуляторных Т-лимфоцитов, ингибируют функции ЦТЛ, натуральных киллеров и дендритных клеток [252]. Высокая концентрация IL-10 способствует поляризации иммунного ответа ко второму типу, что выражается, в частности, в формировании субпопуляции Т-хелперов второго типа (CD4 Th2), что, в свою очередь, влияет на уменьшение субпопуляции активированных ЦТЛ [253]. IL-10 и IL-6 индуцируют экспрессию коингибиторных молекул на поверхности ОАМ. Установлено, что у больных раком яичников ОАМ имеют поверхностные молекулы B7-H4, после взаимодействия с которыми Т-лимфоциты не способны пролиферировать и продуцировать цитокины, ответственные за клеточный киллинг [254]. Под воздействием IL-10 ОАМ экспрессируют также молекулы B7-H1 или PD-L1 (Programmed cell death ligand-1), которые индуцируют апоптоз активированных Т-лимфоцитов после связывания с их рецептором PD-1 [255]. Аналогичные данные были получены при изучении ОАМ в материале биопсий пациентов с плоскоклеточной карциномой ротовой полости. Кокультивирование CD163<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>ОАМ, выделенных из ткани опухоли, с Т-лимфоцитами приводило к значительному снижению активированных CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток [256]. Макрофаги, выделенные из перитонеальной полости больных раком желудка с перитонеальной диссеминацией, имели иммунофенотип ОАМ M2 (CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> или CD68<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) и характеризовались высокой экспрессией IL-10 [257].

Моделирование опухолевого процесса с использованием бестимусных мышей BALB/c nu/nu продемонстрировало, что в присутствии ОАМ M2 происходило усиление пролиферативной активности опухолевых клеток и активация опухолевого роста. При использовании перевивной модели мышинной меланомы B16, трансфицированной геном *IL-10*, было показано, что происходит ингибирование функций «нормальных» макрофагов, стимуляция ангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток [258]. IL-10 способен оказывать прямое влияние на опухолевые клетки, стимулируя их пролиферацию через активацию STAT3,

что приводит к усилению экспрессии таких антиапоптотических генов, как Bcl-2 или Bcl-XL [259]. На культивируемой клеточной линии немелкоклеточного рака легкого присутствие рецепторов к IL-10 коррелировало со скоростью пролиферации, что выражалось в быстром увеличении количества клеток в обедненной питательной среде (0,4% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, СЭКРС) с добавлением IL-10, так как эти условия индуцировали усиление экспрессии рецепторов к IL-10 [260]. При этом наблюдали активацию процессов фосфорилирования STAT3, увеличение его активности и исчезновение маркера апоптоза Annexin V.

Обнаружено, что значительное количество IL-10 в кровотоке коррелирует с плохим прогнозом у больных В-клеточной лимфомой [261]. Изучение концентрации IL-10 в сыворотке крови больных колоректальным раком показало, что существует положительная корреляция между уровнем IL-10 и уровнем раково-эмбрионального антигена (СЕА), биомаркера, который косвенно отражает распространенность данного заболевания [262]. Пациенты с плохим прогнозом заболевания (имеющие более четырех пораженных лимфатических узлов, инвазивный тип роста опухоли (Т3/Т4), низкодифференцированный гистологический тип злокачественного новообразования и уровень СЕА >5 пг/мл) имели значительно более высокие уровни IL-10 в сравнении с группой больных с благоприятным прогнозом (1,2755 против 0,4277 нг/мл;  $p=0,008$ ). Пятилетняя выживаемость при раке шейки матки была выше у пациентов с низким содержанием IL-10 в периферической крови (64,2% против 42,8%,  $p=0,012$ ) [263]. Недавно Zhang L. и соавт. (2019) также подтвердили прогностическую значимость концентрации IL-10 в сыворотке крови при раке яичников, показав, что этот параметр отражает биологическое поведение опухоли [264].

Совершенно очевидно, что IL-10, продуцируемый многими типами клеток в опухолевом микроокружении, является в высокой степени плеотропным цитокином, роль которого в процессах опухолевого роста до конца еще не изучена. Показано, что IL-10 играет двойственную роль в туморогенезе и дальнейшем развитии опухоли. На первых этапах формирования злокачественного новообразования данный цитокин способствует активации НК-клеток и ЦТЛ, однако, если опухолевым клеткам удастся избежать воздействия иммунной системы, в процессе опухолевой прогрессии IL-10 начинает оказывать противоположное действие и выступать как мощный промотер опухолевого процесса. Это, вероятно, связано с различной архитектурой межклеточного матрикса и тканевого микроокружения. В частности, экспериментальные исследования *in vitro* продемонстрировали, что в сочетании с такими интерлейкинами, как IL-4 и/или IL-2, IL-10 стимулирует пролиферацию, накопление внутриклеточного перфорина и цитолитическую активность ЦТЛ [265]. Интересно, что в отсутствие этих цитокинов IL-10 способен индуцировать состояние антиген-специфической

анергии CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, которая ассоциирована с уменьшением экспрессии молекул МНС II класса на антиген-презентирующих клетках и развивается вследствие блокады CD28 костимуляторного пути в Т-клетках [63; 266]. Дальнейшие исследования будут способствовать пониманию особенностей взаимодействия компонентов опухолевого микроокружения, индуцирующих условия, в которых IL-10 поддерживает опухолевый рост.

#### **1.1.3.5.4. Сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF и другие факторы ангиогенеза**

Ангиогенез, формирование сети новых кровеносных сосудов, играет важную роль в процессе эмбрионального развития, поддержания гомеостатического равновесия при функционировании органов и их систем. Хорошо известно, что опухолевый ангиогенез имеет определяющее значение в процессах прогрессирования и метастазирования опухоли [267]. Среди множества ангиогенных факторов сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF и его рецепторы являются одними из главных индукторов опухолевого ангиогенеза [268], вследствие чего эта система стала мишенью для разработки целого ряда терапевтических агентов, таких как bevacizumab (блокирующие антитела) и ингибиторы рецепторов VEGFR-2: pazopanib, sorafenib и sunitinib [269]. Тем не менее подобная терапия не всегда демонстрирует высокую эффективность, что обусловлено существованием альтернативных механизмов опухолевого ангиогенеза, реализуемых вне этой системы, связанной с активностью VEGF и его рецепторов. Другими, не менее важными регуляторами процессов пролиферации эндотелиальных клеток и развития капиллярной сети, являются фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), плацентарный фактор роста (PLGF), трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), эндоглин, ангиопоэтин (ANG) -1, -2, система активации плазминогена uPA/PAI-1, IL-8 и др. [269].

Семейство VEGF включает несколько белков: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F и PLGF, представляющих собой антипараллельные гомодимерные полипептиды, хотя гетеродимеры VEGF-A и PLGF были также описаны [270]. Недавно к этой группе был добавлен сосудистый эндотелиальный фактор роста эндокринных желез EG-VEGF [271]. VEGF-A является наиболее изученным из членов этого семейства. У человека ген *VEGF-A* состоит из восьми экзонов, отделенных семью интронами. Было установлено, что существует девять изоформ этого белка (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 и VEGF206). Изоформа VEGF165 является преобладающей и известна, собственно, как VEGF-A. Однако необходимо отметить, что изоформы VEGF отличаются по своим ангиогенным свойствам и имеют различия в связывании гепарансульфата экстрацеллюлярного матрикса и нейропилинов на поверхности клеток [272].

Как ключевой регулятор ангиогенеза VEGF-A представляет собой мощный специфический митоген эндотелиальных клеток артерий, вен и лимфатических сосудов [273]. Как было показано, VEGF-A индуцирует экспрессию активатора плазминогена (PA) и ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1), а также интерстициальной коллагеназы в эндотелии [274]. PA и коллагеназа способствуют формированию микроокружения, которое позволяет клеткам эндотелия мигрировать и проникать в экстрацеллюлярный матрикс. Регуляция протеолиза осуществляется присутствием PAI-1. Давно установлено, что нормальный морфогенез сосудов, включающий перемещение эндотелиальных клеток и формирование просвета капилляров, находится в зависимости от строго контролируемого баланса между протеазами и их ингибиторами [275]. Важное свойство VEGF-A – его способность увеличивать проницаемость капилляров, что является необходимым условием успешного ангиогенеза при таких патологических состояниях, как рост опухоли или заживление раны [276].

VEGF продуцируется многими типами клеток, такими как макрофаги, эндотелиальные клетки, опухолевые клетки и клеточные компоненты опухолевой стромы. Регуляция продукции и высвобождения VEGF осуществляется посредством стимулов, генерированных различными состояниями, включающими гипоксию, присутствие онкобелков, например, EGF и K-ras [277]. В частности, при гипоксии транскрипционный фактор HIF-1 играет ключевую роль в индукции экспрессии VEGF, при этом HIF-1 $\alpha$  активируется в анаэробных условиях, поэтому, когда объем опухоли достигает критического размера в несколько кубических миллиметров, создавая условия гипоксии, HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  формируют комплекс, индуцируя транскрипцию нескольких генов, в том числе *VEGF* [278].

Биологические функции VEGF опосредованы высокоаффинными тирозинкиназными рецепторами трех типов, расположенных на клеточной поверхности, а именно: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk1/KDR, VEGFR-3 [279]. Изоформа VEGF<sub>165</sub> связывается также с нейропилином-1 (Npr-1), который действует как специфический корецептор для VEGFR-1- и EGFR-2-сигнальной трансдукции. Рецептор VEGFR-1 связывается с VEGF-A, VEGF-B и PLGF и экспрессируется эндотелиальными клетками, макрофагами, моноцитами и гематopoэтическими стволовыми клетками, именно с наличием этого рецептора связывают патологический ангиогенез взрослого человека [280]. Рецептор VEGFR-2 связывается с VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D и VEGF-E и экспрессируется преимущественно эндотелиальными клетками лимфатических и кровеносных сосудов, а также другими типами клеток, такими как мегакарициты и гематopoэтические стволовые клетки. VEGFR-2 также является ключевым рецептором в процессах физиологического и патологического ангиогенеза, особенно опухолевого неоангиогенеза. VEGFR-3 – рецептор, обеспечивающий взаимодействие с VEGF-C



и VEGF-D, играющий ведущую роль в лимфоангиогенезе [281]. Кроме того, есть данные, что взаимодействие с этим рецептором определяет регуляцию процесса рекрутирования антиген-презентирующих клеток [280].

Обнаружено, что клетки многих опухолей, таких как меланома, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы и эндометрия, мезотелиома, разные варианты лейкозов способны синтезировать VEGF и несут на своей поверхности его рецепторы, то есть наблюдается вариант аутокринной регуляции роста опухоли [282]. Установлено, что усиление васкуляризации опухоли и экспрессии опухолевыми клетками проангиогенных факторов ассоциировано с диссеминированной стадией опухолевого процесса и плохим прогнозом. При этом, в случае повышенного уровня VEGF в сыворотке крови онкологических больных, имели значение не только его ангиогенные свойства, но также его способность ингибировать функции иммунной системы, приводящие к прогрессии опухоли [283]. VEGF влияет на процесс пополнения популяции незрелых миелоидных клеток, которые мигрируют из костного мозга, что в свою очередь способствует увеличению в микроокружении количества опухоль-инфильтрирующих незрелых ДК и макрофагов [284]. Давно установлено на моделях животных, что длительная инфузия VEGF-A значительно сокращает число зрелых ДК в селезенке, лимфатических узлах и периферической крови [285]. Появление большого количества таких незрелых ДК может блокировать активность мигрирующих ДК и Т-лимфоцитов через активацию индоламин-2,3-диоксигеназы и аргиназы I [286]. VEGF предотвращает дифференцировку и созревание ДК через супрессию ядерного фактора-кВ в гематопоэтических стволовых клетках [182]. Блокирование активации ядерного фактора-кВ в гемопоэтических клетках за счет взаимодействия с молекулами, которые синтезируются опухолевыми клетками, как полагают, является механизмом, которым опухолевые клетки могут непосредственно осуществить низкоуровневую регуляцию способностей иммунной системы к генерации антиопухолевого ответа. Кроме того, было обнаружено, что активация VEGF зависит от сигнального активатора транскрипции STAT3, активность которого уменьшается в процессе дифференциации ДК. Доказательством являлся тот факт, что специфические нейтрализующие антитела к VEGF или к доминантно-негативному STAT3 и его ингибиторам предотвращали активацию STAT3 и промотировали дифференцировку и нормальное функционирование ДК [287]. У больных с опухолями высокий уровень VEGF-A в плазме крови коррелирует с уменьшением количества зрелых ДК и увеличением пропорции незрелых ДК в периферической крови [288]. Помимо влияния на ДК, VEGF способствует накоплению MDSC в опухоли. Установлено, что высокий уровень VEGF в крови онкологических больных ассоциирован с повышением содержания MDSC [289]. VEGF воздействует также на макрофаги, стимулируя их направленную миграцию в опухоль, однако одного влияния этого фактора

недостаточно, чтобы изменить поляризацию опухолеассоциированных макрофагов [290]. VEGF, синтезируемый малигнизированными клетками, контролирует субпопуляцию регуляторных Т-лимфоцитов, которые несут на своей поверхности рецепторы VEGFR-2 и нейропептин-1 (Npr-1: у больных колоректальным раком и меланомой кожи IV стадии процентное содержание Treg коррелировало с количественным содержанием VEGF-A в периферической крови [291].

Первоначально было установлено, что введение VEGF сокращает число Т-лимфоцитов и соотношение Т- и В-лимфоцитов в лимфатических узлах и селезенке здоровых мышей, блокируя их функции [285]. Ohm J.E. и соавт. (2003) продемонстрировали, что VEGF-A ингибирует генерацию Т-лимфоцитов, модулируя их созревание в тимусе [292]. На модели КРР мыши СТ26, экспрессирующего большое количество VEGF-A, было продемонстрировано, что этот фактор стимулирует экспрессию ингибиторных мембранных белков PD-1, Tim-3, CTLA-4 и в меньшей степени Lag-3 на Т-лимфоцитах через сигнальный путь VEGFR-2-PLC $\gamma$ -calcineurin-NFAT, что приводит к блокаде их активности [293].

VEGF влияет на процесс метастазирования путем стимуляции опухолевого ангиогенеза, который сопровождается образованием негерметичных и дезорганизованных примитивных сосудов в ткани опухоли [294]. Факторы этого семейства способствуют взаимодействию между злокачественными и эндотелиальными клетками путем ремоделирования опухолевых сосудов, изменению опухолевого микроокружения для метастатического распространения, касающегося индукции воспаления, создания условий гипоксии, и поддержке роста отдаленных метастазов.

По сравнению с VEGF, роль PLGF в образовании новых сосудов менее понятна. Обнаружено, что в ряде опухолей (рак почки, легкого, толстой кишки, молочной железы) PLGF синтезируется не только злокачественными клетками, но также клетками эндотелия гладкой мускулатуры, перидитами, фибробластами стромы опухоли, опухолеассоциированными лимфоцитами и макрофагами [295]. PLGF вызывает различные биологические эффекты, затрагивая широкий диапазон различных типов клеток. В частности, PLGF способен вызывать рост и созревание сосудов путем непосредственного воздействия на жизнеспособность, рост, миграцию эндотелиоцитов, пролиферацию фибробластов и гладкомышечных клеток [296]. Кроме того, PLGF привлекает и активирует макрофаги, которые секретируют ангио- и лимфогенные вещества, и ингибирует дифференцировку ДК. PLGF, синтезируемый опухолевыми клетками, рекрутирует Flt1-позитивные гематопозитические предшественники и макрофаги в локусах роста опухоли и таким образом обеспечивает неоваскуляризацию и лимфангиогенез.

Исследования ANG с помощью экспериментальных моделей опухолей человека, привитых мышам, таких как рак толстой кишки Colo205 и плоскоклеточная карцинома кожи

A431, показали, что применение антител, блокирующих ANG-2, приводит к регрессу опухолей путем индукции апоптоза эндотелиальных клеток в опухолевой ткани, и в то же время сверхэкспрессия этой молекулы вызывает угнетение продукции VEGF, элиминацию перицитов в опухолевой ткани, блокаду пролиферации эндотелиальных клеток и в конечном итоге деградацию сосудистой сети опухоли и уменьшение опухолевой массы. Таким образом установлено, что ANG и VEGF находятся в сложном антагонистическом взаимодействии [297].

Имеются данные о прогностической роли экспрессии системы урокиназного активатора плазминогена и его ингибитора PAI-1/uPA при опухолях молочной железы. Увеличение количества uPA и/или PAI-1 в тканях опухоли больных раком молочной железы коррелировало с характером течения заболевания и риском развития рецидива [298]. Völker H.U. и соавт. (2018) продемонстрировали, что показатели уровня системы uPA/PAI-1 в сочетании с определением маркера пролиферации опухолевых клеток Ki-67 могут рассматриваться как предикторные факторы, указывающие на вероятность рецидива заболевания [299].

Большое содержание uPA в периферической крови пациентов было отмечено не только при раке молочной железы, но и при раке предстательной железы, прямой и ободочной кишки, меланоме кожи, опухолях головы и шеи [300]. Основная роль uPA заключается в ремоделировании окружающих тканей с целью облегчения процессов клеточной миграции, активации протуморогенных факторов, таких как TGF- $\beta$  и матриксные металлопротеиназы, и привлечении MDSC в опухолевое микроокружение [301].

Последнее время внимание исследователей привлекла роль эндоглина, являющегося частью протеинового комплекса рецептора TGF- $\beta$ , который активно экспрессируется пролиферирующими эндотелиальными клетками и также может рассматриваться как маркер опухолевой васкуляризации [302]. Обнаружено, что в опухолях неоангиогенный эндотелий активно экспрессирует эндоглин, в частности, это было установлено для гепатоцеллюлярной карциномы [303]. Оценка его экспрессии в опухолевых и неопухолевых тканях, а также сывороточных концентраций этого гликопротеина в крови больных раком печени подтверждает его роль в качестве важного биомаркера для постановки диагноза и прогнозирования течения заболевания. Тем не менее точные молекулярные механизмы функционирования эндоглина при опухолевом росте все еще недостаточно изучены.

Таким образом, в процессе развития опухоли среди многообразных механизмов, позволяющих опухолевым клеткам успешно реализовать свой злокачественный потенциал, формирование иммуносупрессивной «сети» в опухолевом микроокружении путем продукции молекул, обладающих иммуносупрессивными свойствами, является важным этапом туморогенеза, создающим благоприятные условия для опухолевой диссеминации [22; 304]. Изучение этих механизмов поможет в дальнейшем преодолеть непредсказуемость

клинического эффекта при иммунотерапевтических воздействиях и совершенствовать режимы активной специфической иммунотерапии, в том числе противоопухолевой вакцинотерапии.

### **1.1.3.6. Формирование «супрессивного» опухолевого микроокружения за счет привлечения клеток с иммунодепрессивными свойствами**

Противоопухолевый иммунный ответ, в том числе возникающий в результате противоопухолевой вакцинации, зависит от баланса функциональной активности субпопуляций клеток иммунной системы с эффекторными и супрессорными свойствами. В то время как существование супрессорных клеток представляет собой очень важный механизм регуляции любого специфического иммунного ответа, экспансия этих клеток при опухолевой прогрессии нарушает все противоопухолевые иммунные реакции, в том числе ответ на терапию. При диссеминированном процессе возрастает активность иммуносупрессивных сетей, что приводит к ингибированию иммунной активности в элиминации опухолевых клеток.

В качестве супрессивных компонентов иммунной системы рассматривают несколько достаточно гетерогенных по своим свойствам клеточных субпопуляций: регуляторные Т-лимфоциты (Treg), супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), альтернативно активированные (M2) или регуляторные субпопуляции ОАМ, протуморогенные нейтрофилы (N2), толерогенные или регуляторные опухолеассоциированные ДК (regDC), регуляторные В-клетки, НКТ-клетки [305]. Факт присутствия субпопуляций Treg в опухолевом микроокружении подтвержден для подавляющего большинства злокачественных новообразований. Низкие показатели соотношения Treg/эффекторы при исследовании опухолевого микроокружения при меланоме кожи являются важным идентификатором эффективного противоопухолевого иммунитета [306]. Относительно недавно раскрыты молекулярные механизмы, регулирующие процесс привлечения и миграции этих клеток иммунной системы в опухолевую ткань, где они реализуют свой супрессивный потенциал, ингибируя противоопухолевые иммунные реакции [307]. Опухолевые клетки продуцируют VEGF, который связывается с рецепторами VEGFR-2 и Nrp-1, находящимися на поверхностной мембране Treg, что индуцирует направленную миграцию Treg в опухоль. Градиенты хемокинов, такие как CCR4-CCL17/22, CCR5-CCL5, CCR8-CCL1, CCR10-CCL28, могут участвовать в рекрутировании Treg в опухолевое микроокружение. Одновременно опухолеассоциированные НК-клетки способны продуцировать хемокин CCL22, также участвуя в привлечении Treg. Эти процессы были изучены первоначально на экспериментальных животных, затем нашли подтверждение в клинических исследованиях. В частности, на модели мышины меланомы B-16 удалось продемонстрировать ключевую роль VEGF в инициации опухолевой инфильтрации Foxp3<sup>+</sup>Treg: использование ингибирования VEGF за счет связывания

с растворимой формой его рецептора, введенного в систему с помощью аденовирусной трансдукции, значительно редуцировало пропорцию Treg в опухоли [308]. Аналогичные исследования, проведенные на модели рака толстой кишки CT26, с использованием антител против VEGF и сунитиниба, являющегося ингибитором тирозинкиназных рецепторов, в том числе VEGFR, также выявили уменьшение субпопуляций Treg в опухолевой ткани [309]. При использовании модели спонтанной высокометастатической меланомы мышей *MT/ret* удалось показать важность экспрессии Nrp-1 регуляторными T-лимфоцитами в процессе их направленной миграции в опухоль [310]. В этой работе селективная элиминация рецепторов Nrp-1 на поверхности Treg позволила продемонстрировать прямое влияние VEGF на накопление этих клеток в опухолевой ткани, но не на их дифференцировку или функциональную активность. Однако в то же время опубликованы данные, согласно которым VEGF способен индуцировать пролиферацию Treg, а Nrp-1 участвует в взаимодействии Treg и ДК [311]. Таким образом, сложные множественные функциональные взаимодействия стимулируют неоангиогенез и обеспечивают различные аспекты Treg-опосредованной иммуносупрессии. Клинические исследования, учитывающие воздействие тирозинкиназных ингибиторов, таких как сунитиниб, бевацизумаб, пазопаниб, сорафениб, акситиниб, на функции клеток иммунной системы, подтверждают роль VEGF в процессах регуляции функционирования Treg [312]. В частности, при применении сунитиниба в лечении пациентов со светлоклеточным почечноклеточным раком после второго цикла терапии отмечали уменьшение субпопуляций Treg, которое коррелировало с увеличением количества CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, продуцирующих INF- $\gamma$  [313]. Сейчас рассматривают плеоморфный эффект тирозинкиназных ингибиторов, так как, помимо антиангиогенного действия, они оказывают ингибирующее влияние на продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, а также IL-17. Кроме того, эта группа препаратов имеет модулирующее воздействие не только на численность субпопуляций Treg, но и на популяции В-лимфоцитов и НК-клеток [314].

Как известно, хемокины являются ключевыми регуляторами миграции клеток иммунной системы, обеспечивая, например, перемещение лейкоцитов к месту воспаления, так же как и во вторичные лимфоидные органы [315]. К тому же они обеспечивают процессы злокачественной трансформации и опухолевой прогрессии [316]. Выявление высокой внутриопухолевой экспрессии хемокинов расценивается как плохой прогноз развития онкологического заболевания [317]. В настоящее время показана роль ряда хемокинов в миграции регуляторных T-лимфоцитов в ткани злокачественного новообразования. Исследования гистологических образцов рака яичников показали, что опухолевые клетки и ОАМ продуцируют хемокин CCL22, в то время как Foxp3<sup>+</sup> Treg экспрессируют рецепторы CCR4. Эксперименты *in vitro* и *in*

*vivo* с использованием человеческих ксенографтов рака яичников на иммунодефицитных мышях продемонстрировали, что данное взаимодействие приводит к активации направленной миграции регуляторных Т-лимфоцитов [318]. Этот механизм привлечения Treg в опухоль был также доказан на модели мышинной карциномы Льюиса, но в этом случае основными продуцентами CCL22 являлись опухолеассоциированные НК-клетки [319]. Использование мышинной модели MT/*ret* продемонстрировало высокую продукцию опухолевыми клетками CCL2 и наличие CCR4-позитивных регуляторных Т-лимфоцитов в опухоли [320]. Исследования модели рака яичников ID8 позволили обнаружить роль хемокина CCL28, продуцируемого опухолевыми клетками в условиях гипоксии, в привлечении Treg, экспрессирующих рецепторы CCR10, которые, находясь в составе опухолевого микроокружения, в свою очередь синтезировали VEGF-A [321]. Таким образом, процесс рекрутизации Treg может являться самоподдерживающимся феноменом, который, одновременно, способствует неоангиогенезу и тем самым ухудшает прогноз заболевания. Недавние исследования, проведенные с использованием модели колоректального рака мыши CT26, выявили еще один механизм привлечения Treg: продукция опухолевыми клетками CCL18 коррелировала с накоплением Treg в ткани опухоли, причем нокаут по CCL18 значительно редуцировал присутствие этих клеток, а также процессы неоангиогенеза [322]. Анализ образцов колоректального рака больных после лапаротомии дал аналогичные результаты.

Опухолевый процесс часто связан с глубокими изменениями нормального миелопоэза, что приводит к прогрессивному накоплению гетерогенной популяции клеточных элементов миеломоноцитарного происхождения в ткани злокачественного новообразования, в крови, в первичных и вторичных лимфатических органах [323; 324]. MDSC оказывают значимое влияние на Т-клеточно-опосредованный иммунный ответ: они способны ингибировать функции Т-лимфоцитов антиген-независимым способом и путем презентации антигенов Т-клеткам, индуцируя Т-клеточную толерантность. При этом предполагается, что MDSC играют ключевую роль в индуцированной опухолью иммуносупрессивной сети, включающей вышеописанные клеточные компоненты. Факторы, синтезируемые опухолевыми клетками, промотируют не только миграцию и накопление MDSC в опухолевом микроокружении, но и формирование их иммуносупрессивного фенотипа [325]. Малигнизированные клетки способны напрямую секретировать эти факторы в растворимой форме в микроокружение и продуцировать их в виде содержимого экзосом [326]. Среди этих факторов выявлены цитокины и хемокины, такие как колониестимулирующий фактор CSF-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, VEGF, ганулоцитарно-макрофагальный фактор GM-CSF, INF- $\gamma$ , простагландины. Индукция иммуносупрессии посредством экстрацеллюлярных везикул опухолевых клеток представляется важным механизмом генерации MDSC, так как было продемонстрировано на мышях, что

предварительное введение в организм животных опухолевых экзосом приводило к ускорению формирования легочных метастазов после инъекции клеток как меланомы, так и рака молочной железы [327]. В то же время экзосомы, продуцируемые MDSC, участвуют в формировании иммуносупрессии, способствуя ангиогенезу в опухоли, метастазированию малигнизированных клеток, проявлению лекарственной устойчивости злокачественных опухолей [328].

Присутствие MDSC в тканях опухолей было подтверждено многочисленными исследованиями с использованием моделей опухолевого процесса на животных [329]. Исследования опухолей человека позволили также выявить присутствие MDSC при глиобластоме, раке мочевого пузыря, поджелудочной и молочной железы [325]. Было продемонстрировано, что опухолеассоциированные MDSC играют важную роль в прогрессировании злокачественных новообразований [330]. Процесс миграции MDSC в опухоль опосредован воздействием целого спектра хемокинов, продуцируемых опухолевыми клетками, среди которых наиболее изученными являются CCL2 и CCL5 [329; 331]. Клинические исследования больных колоректальным раком продемонстрировали связь между гиперэкспрессией CCL2 клетками опухоли и прогрессией заболевания, а редукция CCL2 в модели спонтанного колоректального рака у мышей приводила к количественному уменьшению субпопуляции опухолеассоциированных MDSC и их иммуносупрессивных свойств [332]. Также было обнаружено, что хемокины подсемейства CXC в равной степени необходимы для направленной миграции MDSC в опухоль, например, CXCL8 и CXCL12 [333].

В исследовании Li В. и соавт. (2019) модели мышинной ортотопической гепатоцеллюлярной карциномы H22 было обнаружено, что при опухолевом процессе происходило накопление MDSC в селезенке под влиянием хемокина CCL9, синтезируемого макрофагами, локализованными в этом органе, при этом MDSC имели рецепторный аппарат, определяющий их чувствительность к данному хемокину [334]. Рост опухоли был ассоциирован с увеличением количества MDSC в селезенке мышей. Можно предполагать, что данный феномен связан с первичным распределением клеток иммунной системы с супрессивными свойствами при опухолевом процессе, когда они накапливаются в селезенке и периферической крови и затем мигрируют в опухолевые очаги [335].

Помимо активной направленной миграции, MDSC могут появляться в опухоли за счет преобразования других клеток под влиянием различных стимулов: на мышинной модели было показано, что в присутствии GM-CSF естественные киллерные клетки приобретали иммунофенотип CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>MDSC, экспрессирующих аргиназу-1 и продуцирующих реактивные кислородные радикалы, посредством которых они проявляли иммуносупрессорную активность [336]. Недавние исследования продемонстрировали, что при особых условиях нейтрофилы также способны промотировать опухолевый рост и формирование метастазов

через индукцию ангиогенеза и создание иммуносупрессивной среды [337]. В связи с полученными новыми данными о пластичности клеток иммунной системы, возникла дискуссия о взаимоотношении некоторых типов клеток, в частности, насколько различаются между собой нейтрофилы, населяющие опухоль, и полиморфноядерные PMN-MDSC, которые морфологически и фенотипически подобны нейтрофилам [331]. Одни исследователи полагают, что PMN-MDSC – это вариант патологически активированных N2 нейтрофилов, которые реализуют механизмы, способствующие опухолевой прогрессии и метастазированию, в частности, путем экспрессии аргиназы-1 и стимуляции ангиогенеза, в отличие от нейтрофилов типа N1, которые проявляют «классические» свойства, присущие этим клеткам: фагоцитоз, антителозависимую цитотоксичность и привлечение лейкоцитов [338]. Другая гипотеза выдвигает представление, что нейтрофилы периферической крови под воздействием факторов, продуцируемых опухолевыми клетками и опухолеассоциированными PMN-MDSC, такими как TGF- $\beta$ , приобретают фенотип N2 [339].

В целом хемоаттрактанты, опосредующие процесс миграции нейтрофилов в опухоль, можно сгруппировать в четыре семейства: 1) хемокины (прежде всего, лиганды рецепторов CXCR-1/2); 2) липиды, такие как leukotriene B4 (LTB4) или фактор активации тромбоцитов (PAF); 3) лиганды рецепторов комплемента (C5a, C3a); 4) N-формилпептиды (FPR-1, FPR-2) [18]. Сильным хемоаттрактантом, активирующим миграцию нейтрофилов в опухоль, является интерлейкин-8 (IL-8/CXCL8), который воздействует на нейтрофилы через рецепторы CXCR1 и CXCR2, причем есть данные, что сами опухолевые клетки содействуют привлечению нейтрофилов в локусы формирования опухоли, секретировав этот хемокин [340]. Через те же самые рецепторы нейтрофилы могут ответить на другие хемокины, такие как GRO $\alpha/\beta/\gamma$  (CXCL-1/2/3), ENA-78 (CXCL-5), GCP-2 (CXCL-6) и NAP-2 (CXCL-7).

Взаимоотношения малигнизированных клеток и макрофагов в процессе опухолевого роста очень сложны и не изучены должным образом, но тем не менее уже известно, что опухолевые клетки экскретируют ряд метаболитов, которые способствуют направленной миграции макрофагов в ткань и опухоли и меняют направленность их поляризации, приводя к формированию иммунофенотипа M2, например, такие факторы, как ингибитор дифференциации ID4 и молочная кислота [341]. Опухолевые клетки реализуют механизмы воздействия на макрофаги, сходные с таковыми при взаимодействии с другими клетками иммунной системы: в частности, обнаружено, что клетки рака яичников продуцируют экзосомы, несущие микроРНК, малые некодирующие фрагменты РНК, индуцирующие поляризацию макрофагов в M2 фенотип, которые, в свою очередь, способствуют пролиферации и миграции злокачественных клеток [342]. Кроме того, при изучении клеток рака молочной железы показано, что взаимодействие опухолевых клеток и макрофагов может происходить



посредством прямого контакта за счет формирования мембранных нанотрубочек, что может быть важно для организации связи между клетками и их координации в опухолевом микроокружении [343]. Изучение спектра хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 и CX3CL1, присутствующих в опухолевых тканях больных колоректальным раком, позволило установить наличие положительной корреляции между количественными показателями содержания CCL4 и присутствием маркера опухолеассоциированных макрофагов M2 CD163, что позволило сделать вывод о несомненной роли хемокинов, продуцируемых опухолевыми клетками, в активации инфильтрации злокачественного новообразования макрофагами с проопухолевым потенциалом [344].

## 1.2. Стратегия подходов иммунотерапии злокачественных новообразований в контексте теории иммунного редактирования опухоли

Противоопухолевый иммунный ответ может рассматриваться как динамический пространственно-временной процесс, который D.S. Chen и I. Mellman (2013) определяли как «противоопухолевый иммунный цикл» («cancer-immunity cycle»), состоящий из семи последовательных событий: 1) экспрессия опухолевых антигенов; 2) презентация опухолевых антигенов; 3) примирование и активация; 4) перемещение Т-лимфоцитов в опухоль; 5) инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами; 6) распознавание злокачественных клеток Т-клетками; 7) киллинг опухолевых клеток [32] (рис. 1).

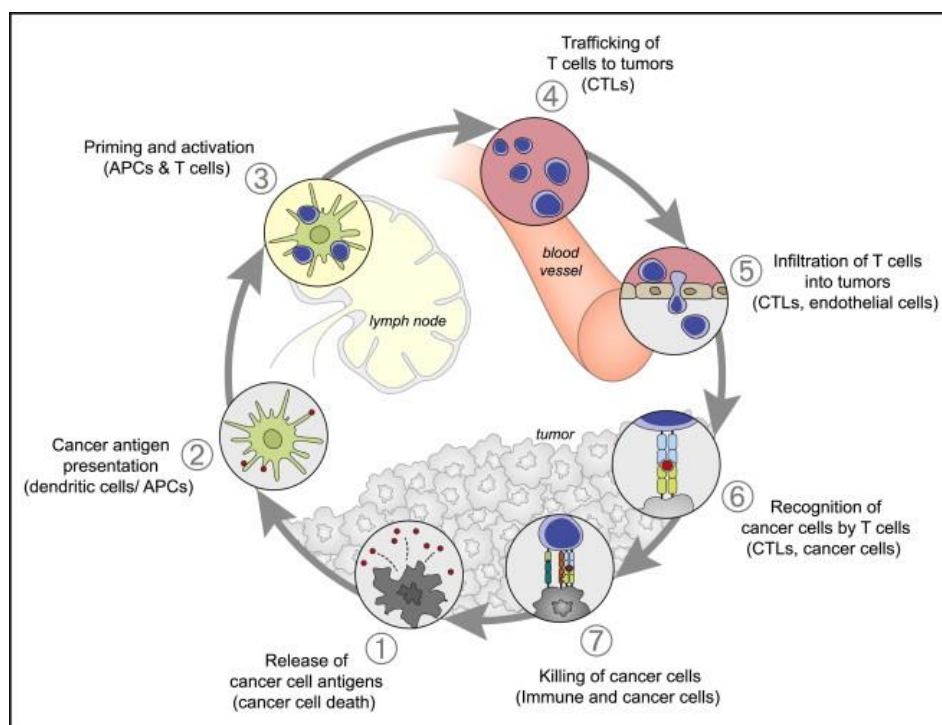


Рисунок 1 – Схематическое изображение противоопухолевого иммунного цикла в интерпретации D.S. Chen и I. Mellman (2013)

У больных злокачественными новообразованиями противоопухолевый иммунный цикл не функционирует оптимально. Опухолевые антигены могут не детектироваться, рассматриваться клетками иммунной системы как «свои», а не «чужие», что приводит к формированию регуляторного, а не эффекторного Т-клеточного ответа. Может быть нарушен нормальный трафик активированных Т-лимфоцитов к опухоли, что приводит к снижению инфильтрации опухоли клетками иммунной системы. Одновременно иммуносупрессивные факторы опухолевого микроокружения способны блокировать сформированные активированные клетки-эффекторы [57].

Цель противоопухолевой иммунотерапии, по мнению D.S. Chen и I. Mellman, состоит в том, чтобы инициировать или реинициировать противоопухолевый иммунный цикл, способствуя усилению и распространению противоопухолевого иммунного ответа без генерации неконтролируемых аутоиммунных воспалительных реакций.

Клинические исследования показывают, что основным ограничивающим фактором успешной реинициации иммунного цикла является иммуносупрессивное опухолевое микроокружение [345; 346]. На протяжении истории развития иммунотерапии все стратегии были связаны с попытками корректировать отдельные звенья иммунного цикла.

Здесь на первый план выходит собственно инициация противоопухолевого иммунного ответа: высвобождение опухолевых антигенов, их презентация и праймирование Т-лимфоцитов. Попытки активировать и стимулировать пролиферацию антиген-специфических противоопухолевых Т-лимфоцитов предпринимаются уже более 20 лет, и большая часть этих усилий была связана с разработкой и применением терапевтических противоопухолевых вакцин, которые теоретически должны были бы обладать большим клиническим эффектом, однако на практике их эффективность не была высокой [347]. Подобная ситуация сложилась прежде всего потому, что до недавнего времени существовало общее непонимание, как путем иммунизации достичь развития мощных цитотоксических Т-клеточных реакций.

До сих пор сохраняется неопределенность в отношении идентичности используемых антигенов, способа их доставки, типа адъювантов и непосредственных характеристик ответа Т-клеток, необходимого для успешной реализации цитотоксических реакций [348]. Кроме того, пришло понимание, что иммуностатические свойства опухолевого микроокружения могут оказать ингибиторный эффект на противоопухолевые иммунные реакции, прежде чем произойдет клинически значимая гибель опухолевых клеток.

Существующие подходы противоопухолевой иммунотерапии можно разделить на четыре основные категории: 1) блокада иммунных контрольных точек; 2) адаптивная клеточная терапия; 3) бивалентные антитела; 4) вакциноterapia [349].

### 1.2.1. Технологии блокады «иммунных контрольных точек» иммуно-модулирующими антителами

Среди специализированных механизмов, используемых опухолевыми клетками для оптимизации микроокружения, обеспечивающего их выживание и дальнейшую диссеминацию, необходимо выделить «уклонение» от так называемых контрольных точек иммунной системы (immune system checkpoints). В норме функции этих контрольных точек заключаются в мониторинге аутоиммунных реакций и регуляции процессов сопутствующего повреждения тканей вследствие иммунного ответа путем модуляции костимулирующей и тормозной сигнализации [350]. Однако при туморогенезе дисрегуляция экспрессии checkpoints-белков может привести к абберантной активации их ингибиторных рецепторов, что препятствует распознаванию и уничтожению Т-лимфоцитами злокачественных клеток. Ингибиторы контрольных иммунных точек – это класс иммунотерапевтических препаратов, которые индуцируют Т-клеточные противоопухолевые реакции путем селективной блокады патологически активированных ингибиторных checkpoints-рецепторов [351]. Среди immune checkpoints-рецепторов, которые являются основными объектами клинической иммунотерапии злокачественных новообразований, можно выделить следующие: антиген, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами, CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen), белок программируемой клеточной смерти PD-1 (programmed cell death protein 1), лиганд PD-1 (PD-L1), ген лимфоцитарной активации *LAG-3* (lymphocyte activation gene 3), В- и Т-лимфоцитарный аттенюатор BTLA (B and T lymphocyte attenuator) и TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin protein 3) [352]. Моноклональные антитела, направленные на коингибиторные молекулы иммунных контрольных точек, такие как ипилимумаб (моноклональные анти-CTLA-4 антитела), ниволумаб, пемпролизумаб (моноклональные анти-PD-1 антитела) и их комбинации, продемонстрировали высокую клиническую эффективность в терапии солидных опухолей и онкогематологических заболеваний, что было отмечено Нобелевской премией по медицине (2018) [353].

Тем не менее улучшение показателей клинического ответа является сейчас ключевым фактором для повышения их эффективности. И, прежде всего, здесь следует обратить внимание на гетерогенность клинических ответов у больных злокачественными новообразованиями, которая возникает под влиянием внутренних и внешних факторов, ассоциированных с опухолью. В частности, только 10–15% пациентов реагируют на терапию ипилимумабом [353; 354]. К внутренним факторам относят генетические и эпигенетические нарушения. Свойства стромальных элементов и разнообразных клеток иммунной системы, формирующих «негостериимое» микроокружение для ЦТЛ, и другие системные воздействия, как, например, микробиом кишечника, рассматривают как внешние факторы [355]. Кроме того,

иммунотерапевтические препараты нацелены на молекулы Т-лимфоцитов или опухолевых клеток для стимуляции Т-клеток и элиминации иммуносупрессии, опосредованной опухолью, но ингибиторные checkpoints-рецепторы Т-лимфоцитов имеют возможность соединиться с лигандами, которые находятся на поверхности АПК, таких как ДК, и оказать прямое воздействие на них [356]. Поэтому сочетание иммунотерапии на основе ДК с checkpoints-ингибиторами является одним из перспективных иммунотерапевтических подходов. В данном случае предполагается введение пациентам ДК, способных усилить специфические иммунные реакции на опухолевые антигены, с одновременным удалением ассоциированных с опухолью иммунных тормозных механизмов, ингибирующих иммунные контрольные точки.

С другой стороны, так как анти-CTLA-4- и анти-PD-1-терапия способна обеспечить долговременный ответ для небольшой подгруппы онкологических больных, было выявлено еще несколько рецепторов, которые могут использоваться в качестве новых мишеней для иммунотерапии опухолевых заболеваний. LAG-3 или CD223 – это коингибиторный рецептор, экспрессируемый на различных лимфоидных клетках, включая активированные Т-лимфоциты и регуляторные Т-клетки. LAG-3 ингибирует киллинг, осуществляемый эффекторными Т-лимфоцитами путем индукции Treg-опосредованной иммуносупрессии [357]. Установлено, что одновременная блокада LAG-3 и PD-1 восстанавливает иммунную функцию CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, что приводит к усилению противоопухолевого ответа при одновременном значительном снижении системной токсичности по сравнению с анти-CTLA-4-терапией [358]. В то же время многочисленные клинические испытания показали, что препарат анти-LAG-3 может рассматриваться как вакцинный адъювант при лечении меланомы кожи и рака предстательной железы, а также может быть составляющей в комбинированном химиотерапевтическом лечении метастатического рака молочной железы [359; 360].

ТИМ-3, мембранный рецептор, экспрессируемый Т-хелперами I типа, который связывается с галектином-9, активированным при раке молочной железы и меланоме кожи [361], также рассматривается как перспективная мишень для иммунотерапевтических воздействий. Предклинические исследования показали, что одновременная блокада ТИМ-3 и PD-1 снимает Т-клеточное «истощение», индуцированное взаимодействием ТИМ-3 и галектина-9, тем самым потенцируя противоопухолевый иммунный ответ, что приводит к снижению опухолевой нагрузки [362].

Доклинические исследования показали также перспективность ВТЛА, представляющего собой дополнительный коингибиторный рецептор, экспрессируемый лимфоидными клетками, как иммунотерапевтической мишени. При меланоме ВТЛА участвует в кросс-активации с рецептором HVEM, известным как медиатор проникновения вируса герпеса А и принадлежащем к суперсемейству фактора некроза опухоли, в результате чего происходит

индукция BTLA-зависимого ингибирования Т-лимфоцитов [363]. Было продемонстрировано, что моноклональные анти-BTLA-антитела могут способствовать активации Т-клеток у больных меланомой, предотвращая формирование сигнала при взаимодействии BTLA и HVEM, хотя оценку безопасности и токсичности препарата еще предстоит установить [364]. Demerlé С. и соавт. (2021) суммировали результаты исследований, посвященных изучению механизмов «ускользания» клеток опухолей легкого от иммунного надзора, где система BTLA/HVEM может рассматриваться как перспективная мишень для разработки новых иммунотерапевтических подходов [365]. Активация сверхэксперсии HVEM клетками рака легкого приводит к истощению противоопухолевого иммунитета за счет взаимодействия с BTLA, что приводит к прогрессированию и ухудшению прогноза заболевания.

Таким образом, в настоящее время стало понятно, что наиболее перспективным является комбинированное применение различных ингибиторов контрольных точек, чем монотерапия, также как поиск новых мишеней, так как опухоль способна реализовать множественные альтернативные механизмы «ускользания» от контроля иммунной системы.

### 1.2.2. Адоптивная клеточная терапия

Адоптивная клеточная терапия рассматривается как высокоперсонализированная терапия и основана на использовании клеток иммунной системы больного путем стимуляции этих клеток *ex vivo* и затем возвращения активированных клеток в организм пациента [366]. В стандартном виде адоптивная клеточная терапия подразумевала 3 этапа: лимфодеплецию, введение лимфоцитов и терапию высокими дозами ИЛ-2. Использование химиотерапевтических агентов или облучения для лимфодеплеции способствовало усилению противоопухолевого действия введенных лимфоцитов, а введение ИЛ-2 имело решающее значение для экспансии активированных *ex vivo* лимфоцитов [367]. Основными источниками Т-клеток, используемых для адоптивной иммунотерапии, являются:

- 1) Т-лимфоциты периферической крови или отдельные их субпопуляции;
- 2) выделенные и активированные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL);
- 3) *ex-vivo* модифицированные Т-клетки с экспрессией специфического Т-клеточного рецептора (TCR);
- 4) Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), представляющий собой комплекс антитела и внутриклеточного аппарата Т-клеточного рецептора [368].

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты считаются особенно перспективными для лечения солидных опухолей [369]. Эти клетки были впервые изучены в операционных образцах меланомы кожи, и было обнаружено, что они представлены в основном смешанной популяцией CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов [370]. В 2002 году было отмечено, что лимфодеплеция при

использовании немиелоабляционного режима химиотерапии непосредственно перед введением ТЛ может привести к регрессу опухоли, а также к стойкому олигоклональному воспроизведению введенных опухолеспецифических лимфоцитов [371]. У некоторых пациентов в течение нескольких месяцев после введения в периферической крови обнаруживалось до 80% этих клеток. Однако необходимо отметить, что ТЛ-терапия имеет определенные ограничения, в частности, количество собранных и культивированных ТЛ зависит от стадии заболевания, уровня LDH, локализации первичной опухоли, мутационного статуса, степени лимфоцитарной инфильтрации злокачественного новообразования, митотической активности опухоли и предшествующего лечения [372]. Наблюдения, сделанные при лечении меланомы кожи, показывают, что ТЛ-терапия может приводить к длительному, полному и, возможно, постоянному регрессу опухоли у пациентов с метастатической меланомой, что вызвало значительный интерес к использованию ТЛ для лечения других типов злокачественных новообразований. При этом оказалось, что несмотря на то, что ТЛ могут быть выделены и получены в значительном количестве *in vitro* практически из всех опухолей, только при меланоме можно получить действительно реактивные опухолеспецифические лимфоциты. Изучение экзомных мутаций более чем в 3000 пар опухолевых и нормальных образцов показало, что частота несинонимичных мутаций варьировала более чем 1000 раз для разных типов рака, причем при меланоме и раке легкого частота мутаций превышала 100/1Mb [373].

Предположение, что мутации являются мишенью для иммунного распознавания опухолевых клеток существует уже в течение некоторого времени. Подтверждением этой гипотезы служат наблюдения о том, что анти-PD-1-терапия может индуцировать объективный ответ у пациентов с меланомой, схожий с таковым у пациентов с раком легкого и мочевого пузыря – двумя наиболее близкими к меланоме видами опухолей по частоте мутаций [162]. В этом контексте интересно исследование, предпринятое N. van Rooij и соавт. (2013): у больного меланомой кожи, который получил четыре инфузии ипилимумаба, наблюдали выраженный регресс опухоли (25%) и близкий к верхней границе нормы показатель опухолевого маркера S100b после окончания лечения. Оказалось, что генерируемые опухолеспецифические Т-лимфоциты этого пациента, обнаруживаемые не только в периферической крови, но и в ткани опухоли, распознавали мутированные антигенные эпитопы, присутствующие в клетках меланомы [374].

Для того чтобы увеличить эндогенный репертуар Т-клеток, была разработана методика трансдукции аутологических Т-лимфоцитов генами опухолеспецифических Т-клеточных рецепторов (TCR) [375]. Данный метод обладает рядом преимуществ перед ранее существующими технологиями: во-первых, возникает устойчивая способность TCR-трансдуцированных Т-клеток генерировать ответ против множества опухолевых антигенов; во-

вторых, генно-инженерные подходы позволяют легко усилить экспрессию модифицированного TCR; в-третьих, TCR-трансдуцированные Т-клетки способны сохранять реактивность в течение длительного времени *in vivo* [376]. В исследовании, проведенном Nowicki T.S. и соавт. (2019), была использована комбинированная терапия трансгенными Т-лимфоцитами с NY-ESO1-специфическим TCR и ДК, нагруженными NY-ESO-1-пептидами, в сочетании/без ипилимумаба для лечения больных местнораспространенными или диссеминированными формами сарком мягких тканей и меланомы кожи [377]. В 66% случаев с применением ипилимумаба и в 50% без этого препарата был зарегистрирован объективный клинический ответ. Исследование периферической крови пациентов показало наличие экспансии NY-ESO1-специфических Т-лимфоцитов через 2 недели после начала терапии, также была обнаружена миграция этих клеток в опухолевые очаги. Многопараметрическая масс-цитометрия трансгенных Т-клеток продемонстрировала с течением времени сдвиг от иммунофенотипов памяти к более дифференцированным эффекторным иммунофенотипам.

Адоптивная клеточная терапия, основанная на использовании Т-лимфоцитов, несущих CAR, оказалась весьма эффективной в лечении острого и хронического В-клеточного лейкоза [378]. Технологии создания химерных рецепторов претерпели определенную эволюцию, так как применение первых вариантов CAR-Т-лимфоцитов не продемонстрировало значимую эффективность. Первое поколение химерных рецепторов представляло собой молекулы, в которых внеклеточная антиген-распознающая часть была получена из моноклонального антитела с известной специфичностью, а внутриклеточная часть представлена нативным TCR или химерной молекулой, включающей фрагмент  $\zeta$ -цепи CD3 [375]. Конструирование следующего поколения химерных рецепторов базировалось на понимании, что отсутствие лигандов костимуляторных рецепторов на поверхности опухолевых клеток предотвращает полноценную активацию CAR-Т-клеток. Таким образом, в структуру химерного рецептора были введены дополнительные сигнальные домены, заимствованные у костимуляторных рецепторов CD28 или CD137 [379].

Наиболее успешными являются результаты терапии острого лимфобластного лейкоза, которая проводилась в нескольких медицинских центрах США. В этих исследованиях удавалось достичь полного регресса в 60–90% случаев без проявлений минимальной остаточной болезни, и в случае использования конструкции с 4-1BB костимуляторным доменом клинический ответ коррелировал с длительным персистированием Т-клеток [380]. Однако одним из важных наблюдений, которое было сделано при терапии CAR-Т-лимфоцитами, направленными против антигена CD19, была потеря экспрессии данного таргетного антигена злокачественными клетками в процессе развития рецидива, что можно расценивать как проявление механизмов «ускользания» опухоли от эффекторного воздействия иммунной

системы. Предприняты также попытки разработать и применить аналогичные технологии для лечения солидных опухолей, но в этом случае исследователи сталкиваются с рядом проблем, которые отсутствуют при онкогематологических заболеваниях. Для солидных опухолей известно не так много идентифицированных антигенов, пригодных для таргетирования химерными рецепторами, так как, во-первых, эта мишень должна сверхэкспрессироваться опухолевой тканью при нулевой или минимальной экспрессии нормальными тканями. Во-вторых, антигенная мишень должна иметь локализацию на плазматической мембране. Кроме того, солидные опухоли – это очень гетерогенные образования, состоящие из множества клонов малигнизированных клеток с различными свойствами. Наличие иммуносупрессорного микроокружения может препятствовать массивной миграции иммунокомпетентных клеток в опухолевые очаги [381].

«Объектами интереса» в настоящее время являются такие молекулы, как белок активации фибробластов FAP и рецептор-2 фактора роста эндотелия сосудов VEGFR-2. Этот тип мишени не экспрессируется на самих опухолевых клетках, но высоко экспрессируется в ассоциированных с опухолью фибробластах в случае FAP [382] или в сосудистой сети опухоли в случае с VEGFR-2 [383], образуя поддерживающую нишу для опухолевых клеток. Следовательно, использование этих молекул в качестве мишеней может ингибировать онкогенез, препятствуя образованию стромы или ангиогенезу. Еще одним кандидатом для успешной CAR-T-клеточной терапии является ганглиозид GD2, который экспрессируется в большом количестве при нейробластоме и многих других типах солидных опухолей [384].

Вместе с тем разрабатываются стратегии воздействия на опухолевое микроокружение, чтобы превратить его в более «гостеприимное» для вводимых трансгенных CAR-T-лимфоцитов. В частности, для преодоления отрицательного влияния микроокружения на трансгенные PSCA-специфические CAR-T-лимфоциты, созданные для лечения рака поджелудочной железы, был дополнительно введен инвертированный рецептор цитокинов, в котором экзодомен рецептора IL-4 был слит с эндодоменом рецептора IL-7 [385]. Трансгенная экспрессия этой молекулы в PSCA-CAR-T-клетках должна инвертировать ингибирующее действие IL-4, присутствующего в опухоли, и вместо этого способствовать пролиферации T-клеток. Еще одним примером является комбинация checkpoint-ингибиторов с выбранной мишенью для CAR-T-лимфоцитов, поскольку ингибирование контрольных точек способствует функционированию эффекторных T-клеток. Несколько исследований продемонстрировали эффективность такого подхода в отношении солидных опухолей на экспериментальных моделях животных [386]. Таким образом, враждебное иммуносупрессивное опухолевое микроокружение можно модифицировать, чтобы препараты на основе CAR-T-клеток были эффективными, что, в свою очередь, способствует полной эрадикации опухоли.



### 1.2.3. Бивалентные антитела

В отличие от природных антител, которые являются моноспецифическими, биспецифические антитела распознают два разных эпитопа либо на одном, либо на разных антигенах. Начиная с 1960-х годов, ведутся исследования по созданию и применению биспецифических антител. Благодаря технологии гибридом, созданной в 1975 году, стало возможным генерировать биспецифичные антитела путем химического конъюгирования двух моноклональных антител или слияния двух антителопродуцирующих гибридом. Разработка методов получения рекомбинантных антител позволила производить биспецифичные антитела с определенной структурой, составом, биохимическими, функциональными и фармакологическими свойствами. Применение биспецифических антител охватывает широкий спектр, который включает диагностику, визуализацию, профилактику и терапию [387]. По состоянию на август 2021 года были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Министерства здравоохранения и социальных служб США (Food and Drug Administration, FDA) три биспецифических антитела: тандемный одноцепочечный вариабельный фрагмент (Fv) на основе CD19/CD3 Bispecific T-cell Engager (BiTE) – блинатумомаб, разработанный для лечения острого лимфолейкоза, эмицизумаб, гетеродимерное биспецифическое антитело IgG на основе APT-Ig, разработанное для лечения гемофилии А и гетеродимерное биспецифическое антитело IgG на основе EGFR/c-Met – амивантамаб для лечения немелкоклеточного рака легкого, несущего инсерционные мутации в экзоне 20 рецептора EGF [388].

В настоящее время более 100 биспецифических антител проходят клинические испытания. С развитием противоопухолевой иммунотерапии и появлением антител к ингибиторам иммунных контрольных точек началась разработка биспецифических антител для иммунотерапии. В этом контексте биспецифические моновалентные антитела, ингибирующие PD-1, одновременно нацеленные на рецепторы, ингибирующие контрольную точку TIM-3 или LAG-3, обеспечивают увеличение селективности в отношении PD-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup>TIM-3<sup>+</sup>/LAG-3<sup>+</sup>T-лимфоцитов [389; 390]. Большой интерес с клинической точки зрения представляет собой глофитамаб, предназначенный для лечения пациентов с рецидивирующей/рефрактерной неходжкинской лимфомой, где он продемонстрировал высокую клиническую эффективность [391]. Причем глофитамаб оценивается в нескольких клинических испытаниях у пациентов с лимфомой, включая пациентов с рецидивом после терапии CAR-T-клетками [392]. Использование стратегий, нацеленных сразу на несколько антигенов, дает лучшие результаты и в тоже время имеет определенные ограничения, связанные со способностью злокачественных клеток к реализации множественных механизмов «ускользания» от воздействий клеток иммунной системы. В частности, известно, что иммуносупрессивная среда TME меняет

направление поляризации клеток иммунной системы за счет накопления продуктов метаболизма опухолевых клеток, обладающих ингибирующей активностью, создает условия «истощения» эффекторных функций ЦТЛ и НК-клеток. В связи с этим для преодоления негативных последствий влияния ТМЕ вводят дополнительные генные модификации уже имеющихся иммуномодулирующих противоопухолевых препаратов. Например, с помощью генной инженерии эффекторные клетки были снабжены дополнительными молекулами, которые могут справиться с супрессивным ТМЕ: детоксифицирующими ферментами, такими как каталаза или доминантно-негативными рецепторами, которые противостоят воздействию TGF- $\beta$  [10; 393]. Кроме того, CAR или рекомбинантный TCR были наделены дополнительным внутриклеточными сигнальными доменами или метаболическими регуляторами, чтобы обеспечить повышенную приспособленность при активации *in vivo* в ТМЕ [394].

#### 1.2.4. Противоопухолевая вакциноterapia

Для того чтобы противоопухолевая вакцина успешно индуцировала противоопухолевый иммунный ответ, необходимо решить ряд серьезных проблем. Во-первых, это определение тех антигенов, воздействие на которые будет определяющим в формировании иммунного ответа. Так становится очевидным, что вакцины, разработанные против отдельных антигенов – производных точечных мутаций, генных транслокаций, РТА – не будут способствовать формированию достаточного иммунного ответа. Примером может служить рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование клинической эффективности вакцины, основанной на использовании рекомбинантного белка MAGE-A3 в комбинации с иммунологическим адъювантом AS15 (комбинация монофосфорил-липидов А QS21 и агониста TLR-9 CpG7909, заключенных в липосомы), которое показало, что применение этого вида лечения в адъювантном режиме не увеличивало безрецидивную выживаемость больных немелкоклеточным раком легкого по сравнению с плацебо (60,5 мес. против 57,9 мес. соответственно) [395]. В то же время выбор конфигурации поливалентных вакцин является очень сложной задачей, так как антигенные особенности опухоли могут варьировать от пациента к пациенту, и даже от клетки к клетке в опухоли одного больного. Экспрессия на уровне мРНК не гарантирует генерацию и экспрессию выбранных опухолеспецифических пептидов в комплексе с антигенами-МНС I класса. Ряд научных групп занимались этой проблемой, используя методы масс-спектропии пептидов, информационные технологии, и в качестве материала как клеточные линии, так и опухолевую ткань [396]. Во-вторых, большой проблемой остается «доставка» антигенов к клеткам иммунной системы в организме пациента. Самым разработанным способом является создание препаратов опухолеспецифических

пептидов в эмульгированной форме, однако в настоящее время все больше внимания уделяется разработке адресной векторной доставки антигена в ДК [397].

Учитывая, что активная специфическая иммунотерапия, использующая пептидные вакцины или трансфецированные ДК, в целом, не демонстрирует высокую клиническую эффективность, вероятно, необходимо использовать различные комбинации иммунотерапии и химиотерапии. Действительно, сочетание противоопухолевых цитотоксических препаратов и активации противоопухолевых иммунных реакций при использовании различных подходов таргетной иммунотерапии, например, антител, может обеспечить увеличение клинической эффективности терапии злокачественных опухолей. Однако для этого необходимы дальнейшие исследования клеточных и молекулярных механизмов, обеспечивающих противоопухолевые иммунные реакции.

Вакцины на основе ДК (ДКВ) были апробированы, начиная с 1990-х годов. Было показано, что ДКВ безопасны и хорошо переносятся пациентами, но их клиническая эффективность ограничена. Вместе с тем в 2010 году были опубликованы данные об успешном применении аутологичной ДКВ для лечения кастрационно-резистентной аденокарциномы предстательной железы. Было показано увеличение общей выживаемости (ОВ) пациентов, получавших данную вакцину, и в 2011 году эта вакцина была одобрена FDA (США) [398]. Проходят клинические исследования III фазы ДКВ, зарегистрированной для лечения глиобластомы [399].

Отсутствие значительной клинической эффективности ДКВ связывают со способностью метастатических опухолей использовать различные иммуносупрессивные стратегии, предотвращающие нормальное функционирование активированных ДК [400]. Работа над совершенствованием ДКВ проходит в нескольких направлениях [401]:

1) выбор репертуара антигенов и антигенная нагрузка ДК. Проблема центральной толерантности может быть решена путем использования неоантигенов для активации ДК. Так как неоантигены являются продуктом соматических мутаций, вызванных генетической нестабильностью опухоли, разработка ДКВ с использованием этих антигенов позволяет применять персонализированный подход к лечению. Персонализированные противоопухолевые вакцины могут быть изготовлены с использованием компьютерного программного обеспечения для прогнозирования неоантигенов и создания искусственных пептидов для активации ДК [402; 403]. Основными проблемами при создании такой вакцины являются время приготовления ДКВ и стоимость идентификации неоэпитопов. Инкубация ДК с лизатом клеток опухоли позволяет избежать необходимости идентификации неоантигенов и получения пептидов [404]. Кроме того, эти методы позволяют презентировать широкий спектр

неоантигенов на ДК, увеличивая в свою очередь антигенный спектр для специфической активации ЦТЛ.

2) Совершенствование процессов созревания ДК *in vitro*. В настоящее время исследуется созревание ДК с использованием стратегии, известной как TriMix (электропорация с мРНК, кодирующей CD40, CD70 и TLR4). Было установлено, что совместная электропорация ДК TriMix вместе с целой мРНК, кодирующей опухолевый антиген, индуцирует антиген-специфический Т-клеточный ответ у пациентов с меланомой кожи, и вакцины Tri-Mix DC были успешно использованы в комбинации с ипилимумабом для лечения этой категории пациентов [405].

3) Разработка способов введения ДКВ пациентам, так как недостаточный иммунный ответ также может зависеть от места инъекции препарата, что сильно влияет на эффективность миграции зрелых ДК в лимфатические узлы. При лечении рака предстательной железы с помощью Sipuleucel-T вакцину вводили внутривенно [398]. Однако в экспериментах на мышах было показано, что этот метод инъекции приводит к накоплению ДК не в лимфатических узлах, а в богато васкуляризированных тканях, где взаимодействие с ЦТЛ и их активация невозможна [406]. Исследования миграции ДК демонстрируют, что после введения ДК в лимфатические узлы там накапливается наибольшее количество ДК из-за отсутствия необходимости в миграции [407].

Таким образом, в последнее время исследования по улучшению эффективности ДКВ сосредоточены на разработке методов усиления активации ДК и стимулировании функций Т-лимфоцитов, а также на использовании различных адъювантов в сочетании с ДК-вакцинами для «нейтрализации» воздействия иммуносупрессивного микроокружения [401]. Работа над вакцинами должна продолжаться на систематической основе с проведением клинических исследований с участием пациентов, поскольку модели животных вряд ли позволят определить наилучший путь продвижения вперед [408].

### **1.2.5. Комбинированная терапия**

Терапевтическая противоопухолевая вакцинация – это не единственный подход к активации специфического Т-клеточного иммунитета. Учитывая констатацию спонтанных иммунологических реакций при опухолевом процессе, можно утверждать, что опухоль сама по себе является разновидностью эндогенной вакцины. Доступ к «природному источнику» опухолеассоциированных антигенов позволяет избежать проблем, связанных с их отбором и доставкой [409]. В то же время такой подход требует детальных знаний о том, какие методы химиотерапии или таргетной терапии нужно сочетать с иммунотерапией. Считается, что некоторые методы лечения вызывают иммуногенную смерть опухолевых клеток [410; 411].

Химиотерапия, таргетная и лучевая терапия также должны быть оценены на предмет их влияния на иммунную систему. Обычно полагают, что высокодозная химиотерапия не может положительно влиять на состояние иммунной системы, так как провоцирует лимфо- и миелопению. Однако, несмотря на массивную лимфодеплецию, иммунная система способна к полному восстановлению, включая все клеточные субпопуляции, в том числе и те, которые обладают эффекторным действием с противоопухолевым эффектом [412]. В обычной клинической практике используют дозы химиопрепаратов, которые значительно ниже максимально переносимой, и было показано, что на фоне таких схем лечения развивается полноценный иммунный ответ на вакцинацию против вируса гриппа [413]. Эти наблюдения продемонстрировали, что рутинная химиотерапия не препятствует инициации иммунного ответа. Таким образом, противоопухолевые вакцины на основе ДК, ДНК или антигенных пептидов могут применяться для лечения больных злокачественными новообразованиями, получающих стандартную химиотерапию [414]. Кроме того, клинические исследования показали, что возможно сочетанное применение химиотерапии и терапии ингибиторами «контрольных иммунных точек». В частности, мета-анализ эффективности и безопасности PD-1/PD-L1 или CTLA4 ингибиторов в сочетании с химиотерапией в качестве первой линии терапии рака легкого дал возможность установить, что пациенты, получавшие комбинированное лечение, превосходили больных, получавших один из видов монотерапии, по следующим показателям: доля объективных ответов, время до прогрессирования и общая выживаемость [415].

В ходе исследований достигнуто понимание, что воздействие, в том числе и сочетанное, различных видов терапии на малигнизированные клетки может индуцировать их иммуногенную гибель, в результате которой высвобождаются эндогенные «молекулы опасности» так называемые молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP) [416]. К этим веществам относят кальретикулин, амфотерин, аденизинтрифосфат, экспонированные молекулы на внешней мембране умирающих клеток, такие как белки теплового шока Hsp70 и 90, митохондриальная ДНК, белки эндоплазматического ретикулула и др. [417]. DAMP распознаются АПК, такими как ДК, с последующим формированием Т-клеточно-опосредованного адаптивного иммунитета. Если клеточный стресс, вызванный химио-, радиотерапией, не приводит к гибели клеток, он может способствовать экспрессии проапоптотических и иммунных молекул, взаимодействующих с клетками, такими как Fas, рецепторы TRAIL, и увеличению презентации антигенов, которые повышают чувствительность выживших опухолевых клеток к уничтожению иммунными клетками в процессе иммуногенной модуляции [418]. Это обеспечивает эффективный иммунный ответ против опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической терапии. Хотя ранее считалось, что иммуногенная гибель

клеток и иммуногенная модуляция являются отдельными процессами, становится все более очевидным, что они входят в спектр иммуногенного клеточного стресса. Данная концепция служит теоретической базой для разработки различных видов комбинированного лечения, включающего использование индукторов иммуногенной клеточной смерти и специфической клеточной иммунотерапии.

### **1.2.6. Роль опухолевого микроокружения для выбора тактики иммунотерапевтического лечения**

Применение препаратов ингибиторов иммунных контрольных точек показало, что эффект лечения во многом зависит от качества и количества иммунного инфильтрата в опухолях [419]. Предпринимаются попытки классифицировать ТМЕ в соответствии с широкими критериями – составом иммунного инфильтрата и характером воспалительного ответа [420]. Исследования состава ТМЕ с помощью самых современных технологий необходимо для расширения наших знаний о том, насколько клеточный состав ТМЕ и его пространственная организация варьируют в зависимости от гистологического типа и подтипа опухоли, как связана эффективность иммунотерапевтического лечения со строением и функционированием ТМЕ. Эти данные в конечном итоге будут стимулировать создание новых подходов в иммунотерапии злокачественных новообразований.

В настоящее время выделено три основных класса ТМЕ, главной характеристикой которых является инфильтрация цитотоксическими  $CD8^+$ Т-лимфоцитами (ЦТЛ) [419]. Первый класс ТМЕ («infiltrated-excluded») характеризуется отсутствием ЦТЛ-инфильтрации центральной части опухолевого очага, где ЦТЛ локализованы по периферии на границе опухолевой массы или в фиброзной капсуле, окружающей опухоль. Такой тип ТМЕ обнаружен в эпителиальных опухолях, в частности, колоректальном раке, аденокарциноме протоков поджелудочной железы, а также при меланоме [421; 422]. Предполагается, что злокачественные новообразования с данным типом ТМЕ являются слабоиммуногенными, что подтверждается наличием ЦТЛ со слабой экспрессией генов маркеров активации, таких как гранзим В (*GRZB*) и *IFN $\gamma$*  [423]. Вторым классом ТМЕ («infiltrated-inflamed») представлен опухолями с высокой инфильтрацией ЦТЛ, экспрессирующих PD-1 и характеризующихся высокой экспрессией *GRZB* и *IFN- $\gamma$* , лейкоцитов и опухолевых клеток, экспрессирующих иммуносупрессивный лиганд PD-1 и PD-L1. Третий класс ТМЕ («infiltrated-TSL») характеризуется формированием третичных лимфоидных структур, лимфоидных агрегатов, клеточный состав которых сходен с таковым в лимфатических узлах. Некоторые исследователи отмечают корреляцию между присутствием данных структур в ТМЕ и положительным прогнозом ответа на лечение и исход заболевания [424]. Углубленное изучение особенностей классов ТМЕ, а именно

продуцируемых опухолью цитокинов и хемокинов, экспрессии опухолевых онкогенов, определение мутационных «ландшафтов» развивают наши представления о формировании и поддержании комплекса специфических компонентов иммунной системы.

Центральное место в создании иммуносупрессивного ТМЕ занимает активация онкогенов и aberrантных сигнальных путей, которые приводят к продукции цитокинов, определяющих фенотип клеток иммунной системы и процессы их рекрутирования, особенно клеток миелоидного происхождения. Например, было показано *in vitro* при меланоме кожи BRAF<sup>V600E</sup>, что мутированная и высокоонкогенная форма члена семейства MAPK BRAF и STAT3, мощный регулятор транскрипции, часто связанный с онкогенной передачей сигналов, управляют экспрессией цитокинов IL-6, IL-10 и фактора роста сосудов VEGF, которые индуцируют толерогенный фенотип ДК [425].

Секреция в опухоли хемокинов, которая также определяется активацией специфических онкогенов, является еще одним важным моментом взаимосвязи между генотипом опухоли и ее заселяющими субпопуляциями клеток иммунной системы. Получены доказательства на моделях меланомы BRAF<sup>V600E</sup> и *Pten*-дефицитных мышей, что происходит индукция конститутивной передачи сигналов WNT/ $\beta$ -catenin, которая, в свою очередь, снижает продукцию хемокина CCL4, ответственного за рекрутирование CD103<sup>+</sup>ДК. Кроме того, было показано, что активация BRAF<sup>V600E</sup> индуцирует экспрессию таких факторов, как IL-0 и IL-1 $\alpha$ , которые могут индуцировать толерогенные формы ДК и формировать фенотип опухолиассоциированных фибробластов [426].

Экспериментальные исследования, проведенные на моделях животных, указывают на участие гуморальных факторов в регуляции функционирования иммунного компонента ТМЕ. В частности, пентраксин 3 (PTX3), который индуцирует классический путь активации комплемента и облегчает распознавание патогена макрофагами и ДК, играет важную роль в подавлении опухолевого роста, способствуя привлечению моноцитов и формированию фенотипа опухолиассоциированных макрофагов [427]. Изучение эпигенетических особенностей опухолей человека выявило гиперметилирование PTX3-промотора, что позволяет предположить сходную роль PTX3 в формировании архитектоники ТМЕ.

Реципрокное цитокиновое взаимодействие между опухолевыми клетками и специфическими иммунными инфильтратами влияет на злокачественный метастатический фенотип. Иммунологические изменения, индуцированные злокачественным новообразованием, воздействуют на процесс метастазирования, в частности, системная иммунная толерантность и изменения в характере циркулирующих миелоидных клеток могут приводить к стимуляции формирования метастатических образований. По мере того как опухолевые клетки метастазируют в отдаленные органы и ткани, вновь образованные структуры немедленно

заселяются различными вариантами популяций клеток иммунной системы, которые могут как способствовать, так и подавлять дальнейшее образование метастазов [428]. Множество реципрокных взаимодействий между опухолевыми клетками и ТМЕ позволяют минорным популяциям опухолевых клеток избегать апоптоза и развивать резистентность к внешним воздействиям. Обнаружено, что растворимые факторы, присутствующие в ТМЕ, необходимы для выживания злокачественных клеток и могут привести к химиопротекции. Примером подобного феномена являются исследования, где было показано, что инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), VEGF и IL-6 увеличивают выживаемость, миграцию и инвазию клеток множественной миеломы через митоген-активируемую протеинкиназу (МАРК), фосфоинозитол-3-киназу (PI3K) и сигнальные каскады протеинкиназы С [345].

Более того, IL-4, IFN- $\alpha$  и фактор роста фибробластов bFGF предотвращают апоптоз клеток хронического лимфоидного лейкоза через Bcl-2-зависимый путь. В клетках меланомы фактор роста гепатоцитов HGF, секретируемый опухолеассоциированными фибробластами, приводит к активации рецептора MET и сигнальных путей МАРК и PI3K/Akt, которые ответственны за внутреннюю резистентность к ингибиторам BRAF [429]. Устойчивость к лекарственным средствам, опосредованная адгезией малигнизированных клеток к компонентам внеклеточного матрикса, наблюдается во многих типах опухолей, а измененная и/или повышенная продукция белков экстрацеллюлярного матрикса может быть ассоциирована с плохим прогнозом и высокой частотой рецидивов заболевания [430]. Возможно формирование резистентности к терапевтическим агентам, опосредованной ответом клеток иммунной системы, присутствующих в ТМЕ. В частности, известно влияние химиотерапии цисплатином или карбоплатином на усиление способности опухолевых клеток индуцировать макрофаги M2, продуцирующие IL-10, который, в свою очередь, ингибирует экспрессию IL-12 ДК, таким образом блокируя активацию эффективного адаптивного ответа [431].

Некоторые химиотерапевтические агенты, такие как антрациклин и циклофосфамид, стимулируют выработку стромальными элементами опухоли молочной железы TNF- $\alpha$ , который увеличивает экспрессию CXCL1/2, что способствует привлечению MDSC, секретирующих S100A8/A9, приводя к выживанию опухолевых клеток под воздействием цитостатиков [432]. У онкологических больных невосприимчивость к антиангиогенной терапии, основанной на ингибировании VEGF, ассоциирована с количеством MDSC или OAM, инфильтрирующих опухолевые ткани [433]. Проведенные исследования указывают, что при разработке стратегий противоопухолевой иммунотерапии необходимо воздействовать не только на сами опухолевые клетки, но и на компоненты опухолевого микроокружения. Продолжается изучение возможностей сочетанного применения традиционных химио-, иммуноонкологических препаратов и антагонистов рецепторов для внеклеточного



блокирования растворимых факторов, происходящих из стромы злокачественных новообразований, антагонистов интегринов, воздействия на OAM и MDSC [346]. В то же время сложность и неоднородность TME на различных стадиях онкогенеза и после лекарственного лечения еще предстоит исследовать и подробно охарактеризовать.

### 1.3. Заключение

Разнообразные факторы, выделяемые опухолевыми клетками в микроокружение, играют центральную роль в образовании иммуносупрессивных сетей, которые способствуют прогрессии опухоли и метастазированию. Действительно, существование такой иммуносупрессии на системном уровне может быть критическим фактором в возникновении неудовлетворительного клинического ответа на проводимое иммунотерапевтическое лечение у больных диссеминированными формами злокачественных новообразований.

В результате обзора исследований литературы отмечается понимание того, что все процессы, протекающие в опухолевом микроокружении, являются отражением взаимодействия опухоли и иммунной системы, что позволило ввести термин «адаптивная резистентность» («adaptive resistance»), который описывает индукцию иммуносупрессивных путей, реализуемых злокачественными клетками в ответ на активность клеток иммунной системы [434]. Адаптивная резистентность – это масштабируемый процесс, где величина иммунной супрессии соответствует величине воздействия иммунной системы, и этот баланс определяет длительность противоопухолевого иммунного ответа и результат противоопухолевого лечения. Часто использование таргетной терапии с целью блокады одного иммуносупрессивного фактора не приносит желаемого эффекта, так как опухолевые клетки способны реализовать множество альтернативных механизмов для формирования благоприятной среды, делающей их «неуязвимыми» для иммунной системы. Несмотря на серьезные усилия, прилагаемые мировым научным сообществом в изучении разнообразных факторов, произведенных злокачественными клетками, их комбинаций и взаимодействия в опухолевом микроокружении, полученных данных еще недостаточно для полного понимания этих процессов, которое позволило бы успешно развивать комплексные подходы к лечению злокачественных новообразований.

Дальнейшее изучение феномена «ускользания» малигнизированных клеток от воздействия иммунной системы, поиск новых эффективных молекулярных мишеней в иммуносупрессивных сетях, позволяющих восстановить эффективные Т-клеточно-опосредованные иммунные реакции посредством комбинированного воздействия на иммуносупрессивные сети, в целом, является чрезвычайно актуальной задачей современной онкоиммунологии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

Исследование было выполнено на биологическом материале 826 больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2001–2019 годы. В качестве материала для экспериментального исследования были использованы: образцы опухолевой ткани, супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток, образцы периферической крови; компоненты крови после лейкафереза. Для оценки клинической значимости продукции ИСФ опухолевыми клетками был проведен дополнительный анализ исследований, проводившихся с 2001 по 2014 год в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, в рамках которых было пролечено 204 пациента с местнораспространенными и диссеминированными формами МК, РП, СМТ. Исследования проводились при поддержке гранта Правительства Москвы с участием Института биологии гена РАН под руководством академика РАН Г.П. Георгиева.

#### 2.1.1. Образцы опухолевой ткани

Из операционного материала 826 больных в стерильных условиях забирали фрагменты опухолей, из которых приготавливали культуры опухолевых клеток с целью последующей противоопухолевой вакцинации, приготовления опухолевого лизата или создания клеточных моделей. Распределение образцов по локализациям представлено в табл. 1.

Таблица 1 – Распределение образцов опухолей по локализациям

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

В исследовании было использовано 465 образцов опухолевой ткани МК, из них 57 образцов представляли собой первичную опухоль, 19 – рецидив новообразования и 389 – метастазы различной локализации (рис. 2 А, Б).

Согласно гистологической верификации 316 образцов было классифицировано как пигментная меланома и 149 – беспигментная. Все образцы относились преимущественно к трем гистологическим типам меланом – эпителиоидноклеточной, веретенклеточной и смешанного типа, содержащего эпителиоидные и веретеновидные клетки (рис. 2 В).

Из 161 образцов РП большая часть (140) представляла собой первичную опухоль, 5 – рецидивы новообразования и 16 – метастатические формы опухоли (рис. 3 А, Б). Гистологически большая часть образцов РП представляла собой почечно-клеточный рак светлоклеточный вариант (143), 10 образцов было классифицировано как зернисто-клеточный вариант почечно-клеточного рака и 8 образцов представляли собой смешанный вариант, содержащий клетки обоих типов (рис. 3 В).

В работе было использовано 121 образец СМТ/ОС, из них 25 – первичная опухоль, 28 – рецидив, 68 – метастатические образования (рис. 4 А, Б). Гистологическая верификация позволила распределить образцы следующим образом: синовиальная саркома – 21, липосаркома – 18, миксофибросаркома – 15, фибросаркома – 5, остеосаркома – 17, хондросаркома – 7, лейомиосаркома – 14, рабдомиосаркома – 8, шваннома – 3, альвеолярная саркома – 3, светлоклеточная саркома – 3, ангиосаркома – 2, эпителиоидная саркома – 2, дерматофибросаркома – 1, десмопластическая мелкокруглоклеточная саркома – 1, веретено- и полиморфноклеточная саркома – 1 (рис. 4 В).

Из 46 образцов РМЖ 35 было получено из первичной опухоли, 1 – рецидив и 10 – метастазы в лимфатические узлы, печень и мягкие ткани. Среди гистологических типов РМЖ присутствовали инвазивный неспецифический рак (37), дуктальная карцинома *in situ* (1) и инвазивный дольковый рак (8).

Образцы РПЖ в основном представляли собой материал биопсий первичной опухоли (n=14). Гистологически во всех случаях была выявлена аденокарцинома от 6 до 8 баллов по шкале Глисона. Один случай представлял собой метастаз гормонорезистентной аденокарциномы предстательной железы в печень.

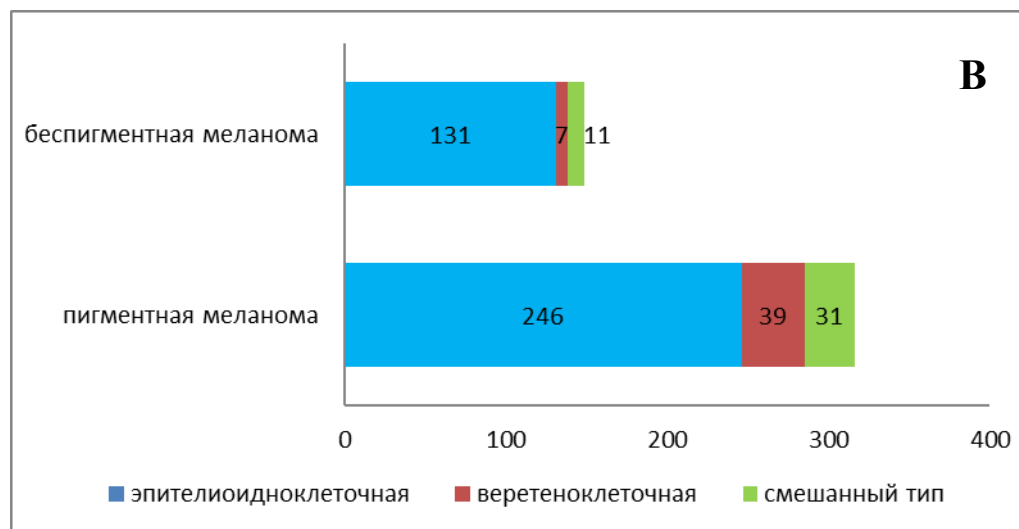
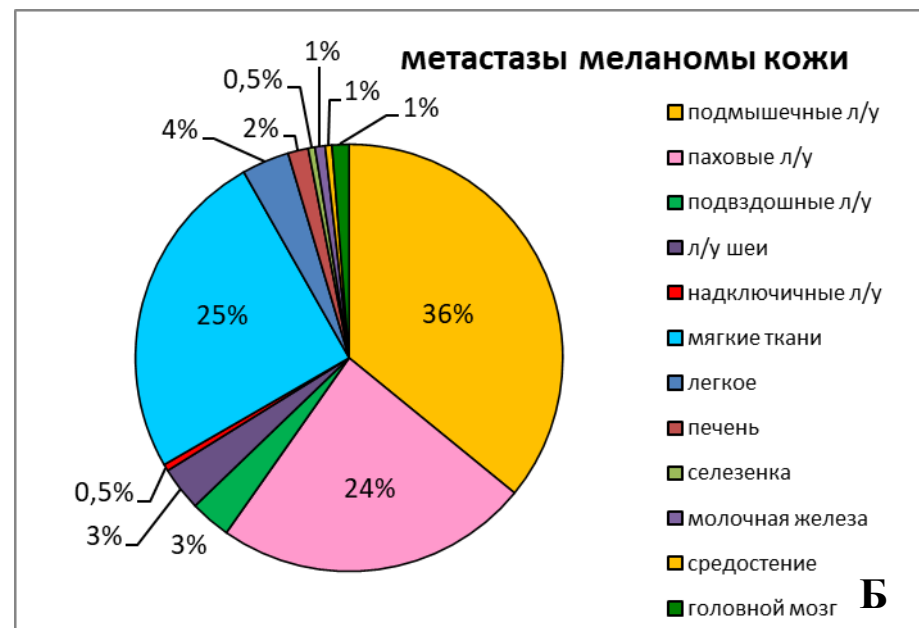
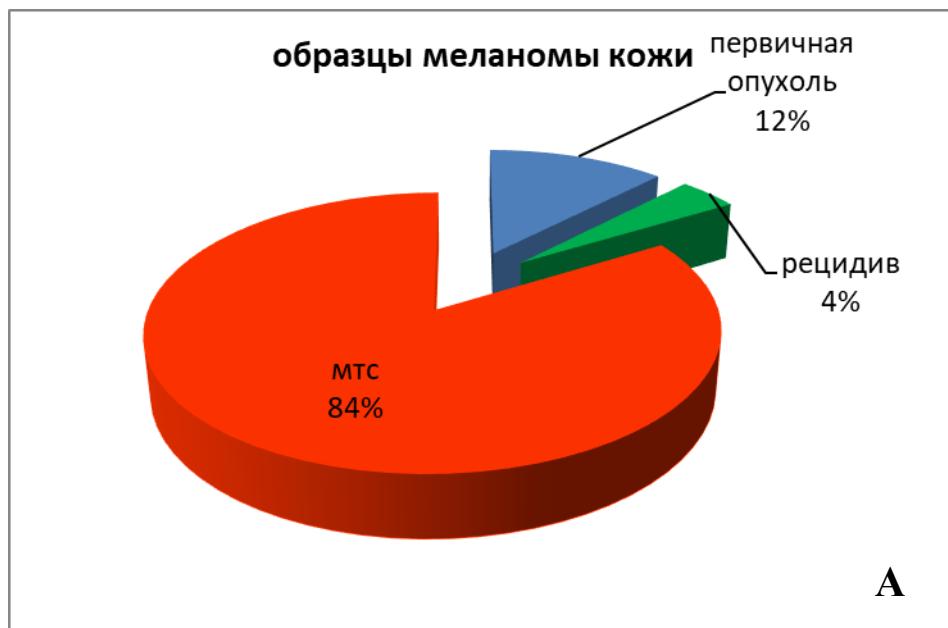


Рисунок 2 – Распределение образцов меланомы кожи по стадиям опухолевого процесса (А); распределение образцов метастатической МК по локализации метастазов (Б); нормированная гистограмма, отражающая долю каждого гистологического типа МК в общей сумме случаев (В); мтс – метастазы; л/у – лимфатические узлы

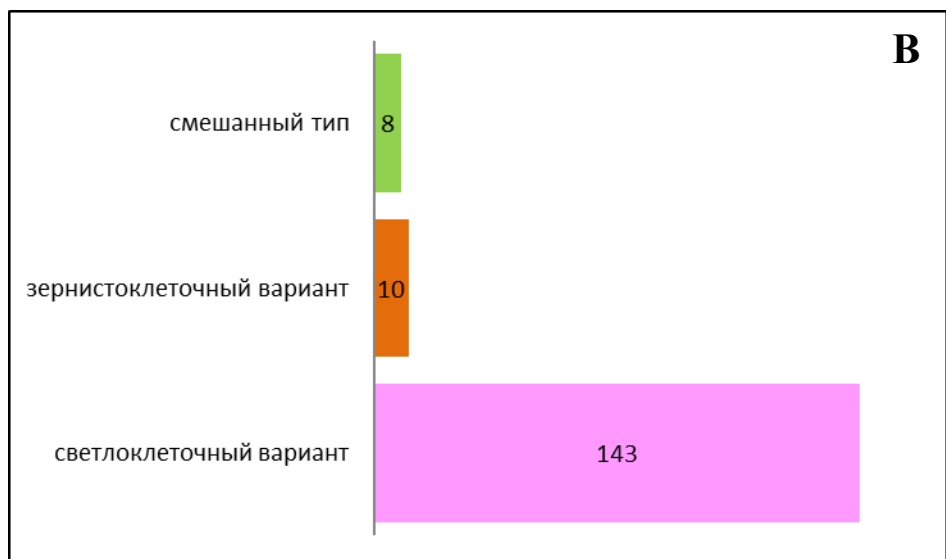
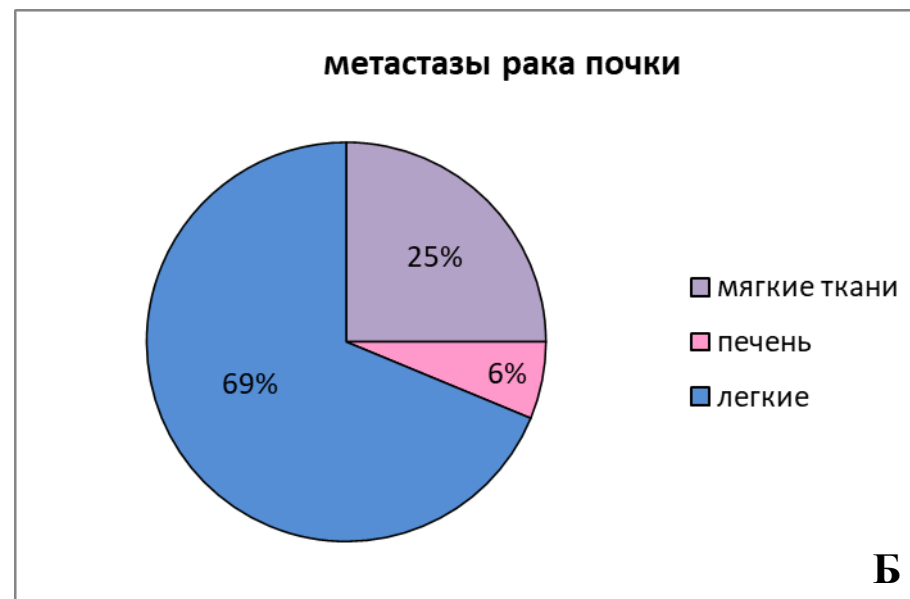


Рисунок 3 – Распределение образцов рака почки по стадиям опухолевого процесса (А); распределение образцов метастатического РП по локализациям метастазов (Б); распределение образцов почечно-клеточного рака, согласно гистологической верификации (В);  
МТС – метастазы

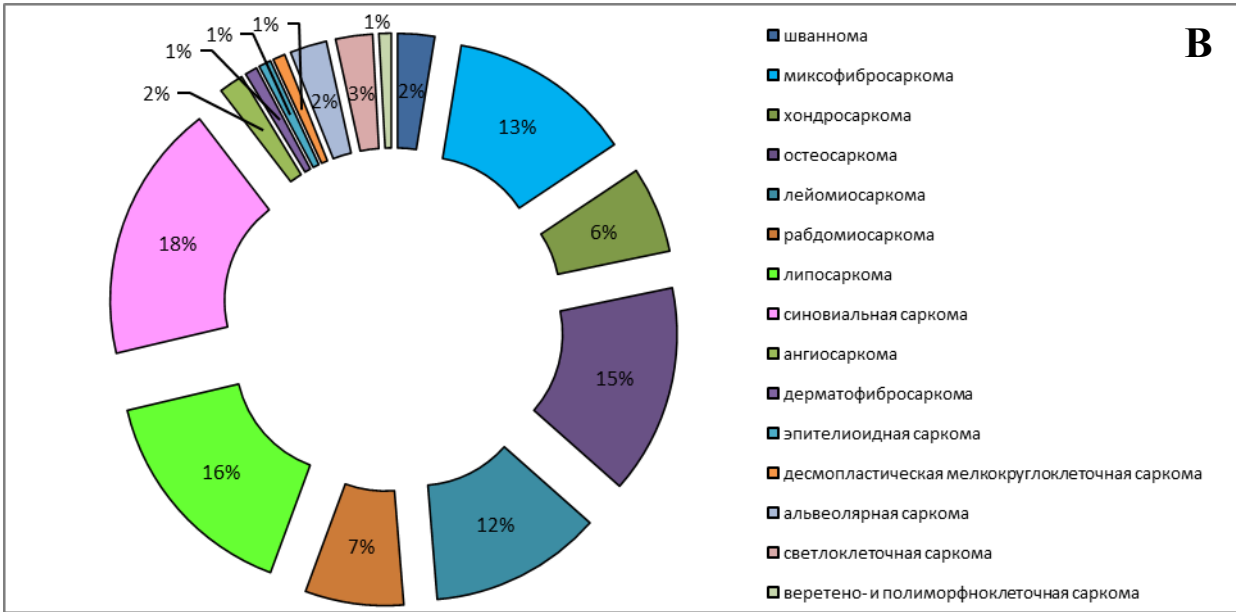
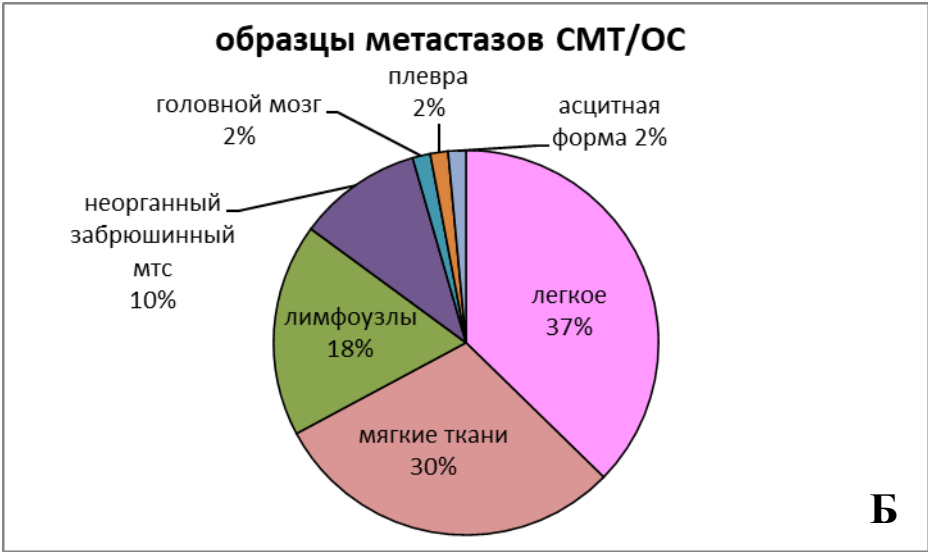
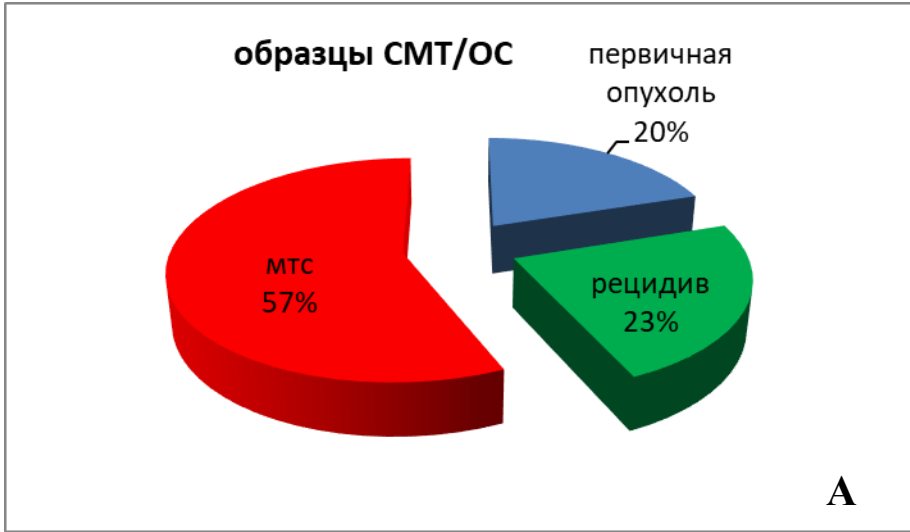


Рисунок 4 – Распределение образцов сарком мягких тканей и остеогенных сарком по стадиям опухолевого процесса (А); распределение образцов метастатических СМТ/ОС по локализациям метастазов (Б); распределение образцов СМТ/ОС по гистологическим типам опухоли (В)

Два образца РМП было получено из первичной опухоли, 53 – из рецидива злокачественного новообразования. Из них 42 образца были представлены инвазивной папиллярной уротелиальной карциномой high grade, 5 – неинвазивной папиллярной уротелиальной карциномой high grade, 6 – неинвазивной папиллярной уротелиальной карциномой low grade, 1 – плоскоклеточной уротелиальной карциномой, 1 – инвазивной переходноклеточной карциномой.

Образцы КРР (n=17) были фрагментами ткани метастатических опухолей, в том числе 6 – в лимфатических узлах, 1 – в печени, 1 – в легком, 1 – в головном мозге, 7 – в мягких тканях брюшной стенки, 1 – асцитная форма. Все новообразования представляли собой аденокарциному разной степени дифференцированности с фокусами слизееобразования и иммунофенотипом кишечного типа.

Среди образцов РЯ был один из первичной опухоли, 4 было взято из рецидива новообразования, 1 образец представлял собой метастаз в перикард, 1 – в молочную железу, 2 – в лимфоузел, 1 – в брюшину, 2 – в брыжейку толстой кишки, и один образец был получен в виде асцитного выпота брюшной полости. Гистологически среди полученных образцов было девять фрагментов серозной аденокарциномы, 2 – серозно-папиллярной аденокарциномы, 1 – папиллярной аденокарциномы, 1 – гранулезоклеточной опухоли.

### **2.1.2. Супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток**

Каждые пять пассажей отбирали супернатанты клеточных культур, представляющие собой надосадочную жидкость из расчета 1 мл на  $10^6$  клеток. Супернатанты замораживали и хранили при  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  до использования. Производили забор супернатантов при культивировании клеток солидных опухолей и фибробластов легких эмбриона человека FLECH (предоставлены КККП ЦИН РАН). Было подвергнуто анализу 1912 образцов надосадочной культуральной жидкости.

### **2.1.3. Образцы периферической крови и клеточный материал после лейкофереза**

Для приготовления культур ДК, использованных в экспериментах, и вакцинных препаратов на основе ДК проводили мобилизацию предшественников ДК из костного мозга в периферическую кровь пациентов с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF (5 мкг/кг массы тела подкожно в течение 4–5 дней) и операцию афереза периферической крови больных. Было получено 32 образца. Производили также забор 120 мл венозной крови, из нее выделяли МНК, которые затем подвергали направленной дифференцировке для получения ДК. Было получено 84 образца.

#### 2.1.4. Характеристика пациентов, получавших специфическую клеточную иммунотерапию

Для оценки клинической значимости продукции ИСФ опухолевыми клетками был проведен поданализ исследований, проводившихся с 2001 по 2014 год в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России [435; 436], в рамках которых было пролечено 204 пациента с местнораспространенными и диссеминированными формами МК, РП, СМТ. Исследования проводились при поддержке гранта Правительства Москвы с участием Института биологии гена РАН.

Критериями включения были следующие: участие больного в одной из следующих программ исследований: «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний» на 2001–2003 гг., «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2004–2009 гг., «Клиническое исследование противоопухолевых вакцин» на 2010–2012 гг., «Autologous Dendritic Cell Vaccine in Patients With Soft Tissue Sarcoma (ADCVCTAST)» ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01883518, 2013–2014 гг., наличие культуры аутологичных опухолевых клеток, наличие морфологически верифицированного диагноза МК, РП, СМТ, проведение вакцинотерапии (ДКВ или ГМВ), получение письменного информированного согласия.

Всего в исследование было включено 99 пациентов (рис. 5), из них 77 больных МК, 10 пациентов с РП, 12 – с СМТ/ОС, при этом 56 (56,6%) больных получило вакцинотерапию на основе аутологичных активированных ДК (ДКВ), 43 пациента (43,4%) – вакцинотерапию на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном *tag7/PGRP-S* (ГМВ). Характеристика больных представлена в табл. 2. Средний возраст пациентов составил 52 года (12–77). Большинство пациентов (76/86%) имели отдаленные метастазы. Для анализа различий в изучаемых ИСФ больные были классифицированы как имеющие достаточный (ДЭ) или недостаточный (НДЭ) эффект терапии. Под достаточным эффектом понимали отсутствие прогрессирования в течение 6 мес. при проведении самостоятельной (паллиативной) терапии и 12 мес. при проведении адъювантой иммунотерапии. При сравнении основных характеристик пациентов в группах ДЭ и НДЭ статистически значимых различий распределения больных по полу, возрасту, типу опухоли, стадии заболевания, разновидности клеточной иммунотерапии и характеру лечения не было выявлено, согласно критерию согласия Пирсона,  $p > 0,05$ .

Общую выживаемость оценивали от начала лечения до смерти больного по любой причине. Время до прогрессирования оценивали как время от начала лечения до появления признаков прогрессирования процесса, при этом смерть больного не от злокачественной



опухоли не расценивалась как прогрессирование процесса. Медиана времени наблюдения за больными, включенными в исследование, составила 557 дней (18,6 мес.), min – 47 (1,6 мес.), max – 5614 дней (187,1 мес.). Цензурированными оказалось 25% наблюдений – при анализе ВДП и 40% наблюдений – при анализе ОВ.

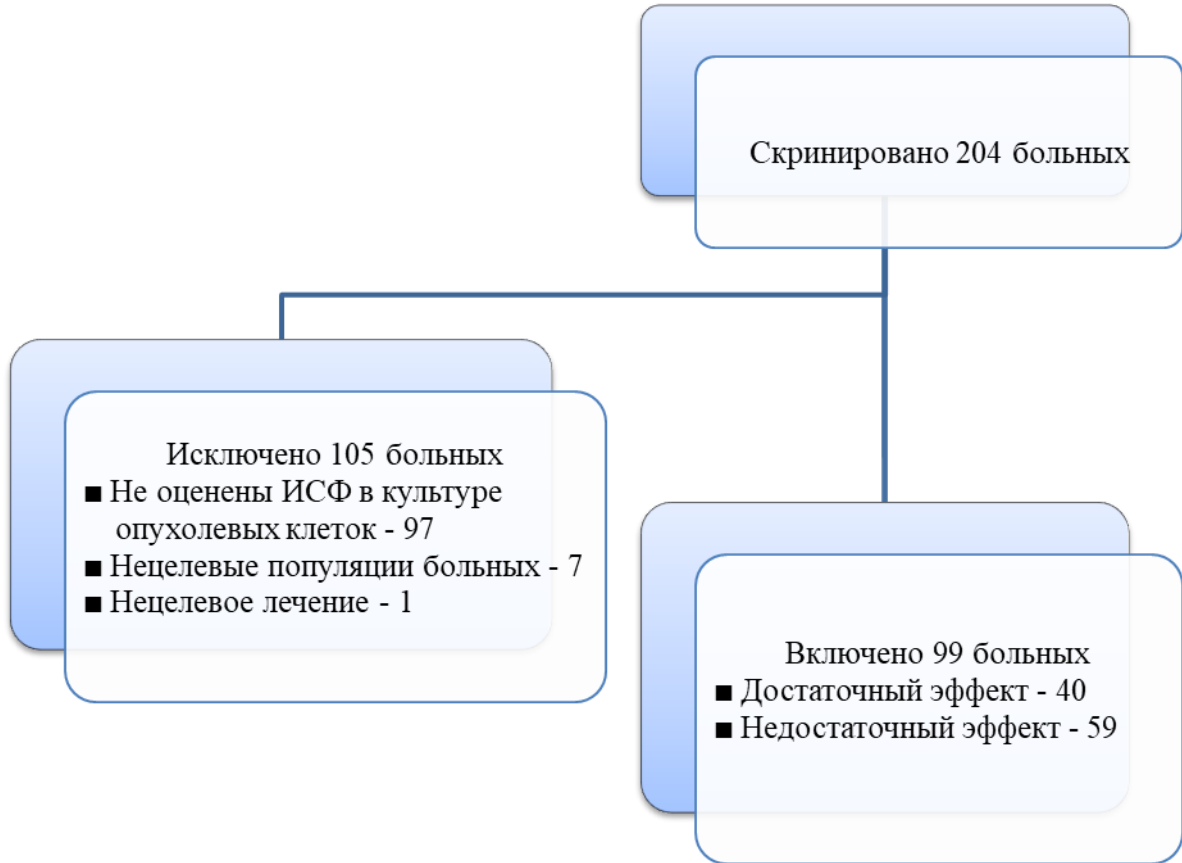


Рисунок 5 – Диаграмма, характеризующая процесс включения пациентов в исследование

Таблица 2 – Характеристика больных, включенных в исследование

Характеристика пациентов	ДЭ	НДЭ	Всего	p
1	2	3	4	5
Всего больных, n	40	59	99	
Пол:				
Женский, n (%)	28 (70,0)	35 (59,3)	63 (63,6)	0,278
Мужской, n (%)	12 (30,0)	24 (40,7)	36 (36,4)	
Возраст, лет				
Медиана	52	52	52	0,401
Диапазон	16–73	21–77	12–77	
Стадия:				
1	2 (5,0)	3 (5,1)	5 (5,1)	0,171
2	11 (27,5)	20 (33,9)	31 (31,3)	
3	17 (42,5)	13 (22,0)	30 (30,3)	
4	10 (25,0)	23 (38,0)	33 (33,3)	

1	2	3	4	5
Тип опухоли:				
почка, n (%)	7 (17,5)	3 (5,1)	10 (10,1)	0,124
меланома, n (%)	28 (70,0)	49 (83,1)	77 (77,8)	
саркома, n (%)	5 (12,5)	7 (11,9)	12 (12,1)	
Лечение:				
ДКВ, n (%)	18 (45,0)	38 (64,4)	56 (56,6)	0,056
ГМВ, n (%)	22 (55,0)	21 (35,6)	43 (43,4)	
Характер терапии:				
адьювантная, n (%)	22 (55,0)	25 (42,4)	47 (47,5)	0,217
самостоятельная, n (%)	18 (45,0)	34 (57,6)	52 (52,5)	

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

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

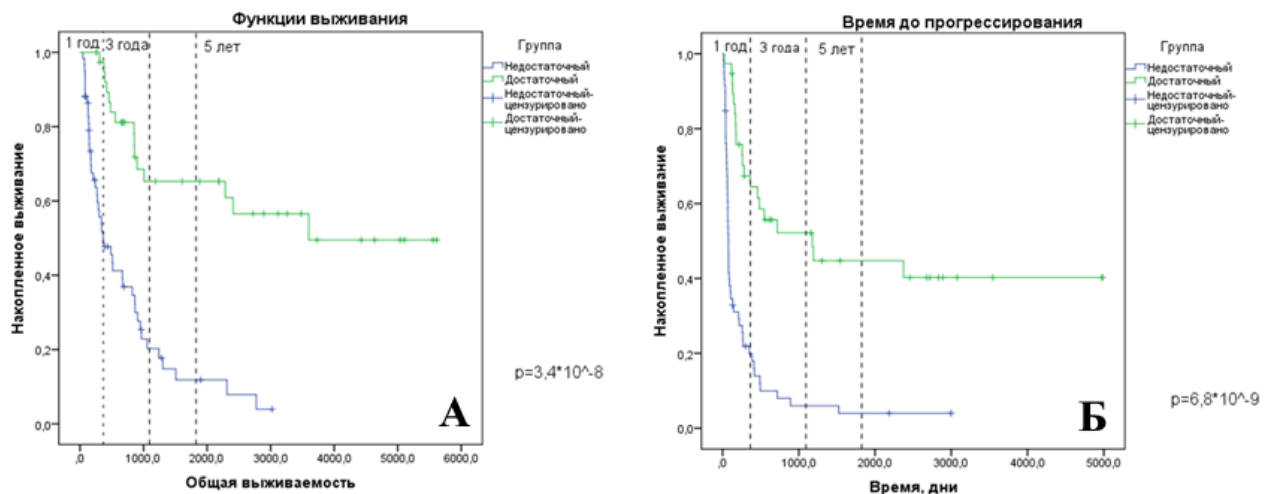


Рисунок 6 – Различия ОВ (А) и ВДП (Б) больных, получавших специфическую клеточную иммунотерапию с достаточным и недостаточным эффектом

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Методы культивирования клеток и анализа их свойств

#### 2.2.1.1. Выделение клеток из тканей опухолей

Удаленные на операции фрагменты опухолевой ткани размером не менее 1 см<sup>3</sup> немедленно помещали в стерильный контейнер, содержащий полную питательную среду DMEM/F12 с 20% СЭКРС. Образцы переносили в ламинар, установленный в стерильном боксе, и измельчали стерильным скальпелем на более мелкие фрагменты размером не более 3 мм<sup>3</sup>, которые помещали на стерильные ножи в 1 мл питательной среды без сыворотки и подвергали механической автоматической дезагрегации в течение 1–2 мин. Использовали систему автоматического измельчителя ткани «Медимашина» (ДАКО, Дания) с набором медиконов (разовых стерильных ножей и фильтров).

Далее отбирали клеточную суспензию с помощью инсулинового шприца и пропускали ее через стерильные фильтры диаметром 50–70 мкм (BD Filcon, США), чтобы освободиться от тканевых фрагментов и крупных клеточных конгломератов. Затем центрифугировали клеточную взвесь при 1000 об/мин в течение 10 мин и помещали клеточную взвесь в полную питательную среду для культивирования.

#### 2.2.1.2. Культивирование опухолевых клеток

Культивирование опухолевых клеток осуществляли, руководствуясь методами R.I. Freshney [437] с собственными модификациями [438]. Опухолевые клетки, полученные из образцов МК, РП, СМТ, РМЖ, РПЖ, РМП, КРР, РЯ, культивировали в пластиковых флаконах (Sarstedt, ФРГ) с использованием питательной среды DMEM/F12 («Биолот», РФ), содержащей 20% СЭКРС («Биолот», РФ), препарат трансферрин-инсулин-селен (Invitrogen, США) (конечная концентрация в среде: 5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 5 нг/мл соответственно), 50 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл фунгизона (Invitrogen, США), в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора «Heracel» (Termo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности. В качестве селективного агента, предотвращающего рост фибробластов, применяли 100 мкг/мл генетицина (Invitrogen, США) [439]. При необходимости для лучшего прикрепления клеток к субстрату использовали культуральные флаконы, предварительно покрытые матриксом, состоящим из бычьего коллагена I типа (Sigma, США) или фибронектина (BD Bioscience, США), или матригеля (BD Bioscience, США). При достижении монослоя производили пересев клеток с использованием равных объемов 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора версена («Биолот», РФ). Осуществляли непрерывное культивирование опухолевых клеток не менее 10 пассажей. Пассажем считали процесс однократного посева и роста клеток в культуре [437].

Каждые пять пассажей производили криоконсервацию клеточных культур с использованием криосреды, содержащей 90% СЭКРС и 10% DMSO (диметилсульфоксид) (Sigma, США). Суспензию клеток в криосреде вносили в стерильные полипропиленовые пробирки, помещали в пенопластовый контейнер с толщиной стенок не менее 15 мм и выдерживали в холодильнике с температурой  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем пробирки переносили в жидкий азот ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Для размораживания клеток пробирки помещали на 3 мин в воду с температурой  $+42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, заменяли криосреду на полную питательную среду и рассеивали для культивирования в открытой системе в концентрации  $1\text{--}3 \times 10^6$  кл/мл. Все образцы для исследования свойств культивируемых опухолевых клеток отбирались согласно алгоритму, представленному на рис. 7.



Рисунок 7 – Схема проведения сбора образцов клеточных культур для исследования свойств опухолевых клеток:

РТГ – раково-тестикулярные гены; ИСФ – факторы, ассоциированные с иммуносупрессией; ИФА – иммуноферментный анализ; ОАА – опухолеассоциированные антигены; ИЦХ – иммуноцитохимия; СКО – стволовые клетки опухоли

Каждые пять пассажей отбирали супернатанты клеточных культур, представляющие собой надосадочную жидкость из расчета 1 мл на  $10^6$  клеток, производили посев клеток на культуральные стекла (BD Bioscience, США), отбирали не менее  $3 \times 10^6$  клеток для анализа методом проточной цитометрии. После 20 пассажа производили забор клеток для

цитогенетического анализа и после 10 пассажа отбирали образцы клеток для молекулярно-генетического анализа методом полимеразной цепной реакции экспрессии РТГ.

### **2.2.1.3. Выделение и культивирование фибробластов кожи человека**

Фибробласты выделяли методом миграции из кожи здоровых людей. Применяли метод, использованный Юдинцевой Н.М. и соавт. (2010) [440]. Полученные биоптаты кожи промывали стерильным физиологическим раствором и измельчали механически скальпелем, затем экспланты размером 1–2 мм<sup>3</sup> распределяли по поверхности чашки Петри и помещали в каплю полной питательной среды DMEM/F12 («Биолот», РФ), содержащей 10% СЭКРС («Биолот», РФ) и антибиотики пенициллин/стрептомицин. Инкубировали 12 часов в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности, затем добавляли еще 1 мл полной питательной среды. Через 5–7 дней наблюдали миграцию фибробластов из эксплантов и их разрастание на поверхности культуральной посуды. При достижении монослоя производили пересев фибробластов с использованием равных объемов 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора версена («Биолот», Россия). Верифицировали полученную культуру с помощью моноклональных антител (МКАТ), специфичных к поверхностным структурам фибробластов. Использовали фибробласты кожи человека в качестве контрольной культуры нормальных клеток при анализе свойств малигнизированных клеток методом иммуноцитохимии.

### **2.2.1.4. Анализ морфологии и пролиферативной активности культивируемых клеток солидных опухолей**

Морфологическую характеристику клеток солидных опухолей в процессе их культивирования проводили методом прижизненной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа с цифровой камерой (Leica DMIL, Германия), методом культивирования на стеклах с последующей фиксацией, путем окрашивания клеток и анализа изображения с помощью микроскопа для лабораторных исследований с проходящим и отраженным светом «Axio Imager M1» и модулем для флуоресцентного анализа (Carl Zeiss, Германия). В качестве красителей использовали гемалаун Майера и эозин. Для детализации морфологических особенностей опухолевых клеток использовали флуоресцентное окрашивание, позволяющее выявлять ядра клеток (DAPI, Sigma-Aldrich, США), компонент цитоскелета F-актин (Alexa Fluor 488 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, США), митохондрии (MitoTracker® Red FM, Thermo Fisher Scientific, США), лизосомы (LysoTracker Deep Red, Thermo Fisher Scientific, США). Получали конфокальные изображения на микроскопе Olympus FV 3000 (Япония). Для оценки популяционной морфологии использовали систему наблюдения за живыми клетками Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия).

Пролиферативную активность культивируемых опухолевых клеток оценивали с использованием кинетического анализа в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ (с возможностью перевода данных в графическую или табличную форму) и с помощью автоматического клеточного анализатора в режиме реального времени xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США).

#### 2.2.1.4.1. Оценка пролиферативной активности в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ

Опухолевые клетки высевали предварительно в 6-луночные планшеты (Nunc, Дания) в количестве, достаточном для формирования 30% монослоя. Планшеты закрывали крышками, снабженными стерильными фильтрами, и герметизировали специальной лентой (Tesa, Франция). Далее помещали планшеты в камеру системы Cell-IQ и подключали воздушную газовую смесь, содержащую 5% CO<sub>2</sub>. Ввели наблюдение за популяциями злокачественных клеток и регистрировали изображение не менее 72 часов. Для количественной оценки общего числа живых опухолевых клеток создавали специальный протокол на основе выбора параметров сегментации и создания библиотеки различных типов клеточных образов, который использовали для качественного и количественного анализа изображений делящихся клеток в режиме реального времени (рис. 8). После создания протокола исследования проводили его тестирование и оценивали эффективность распределения клеток по выбранным классам.

Далее осуществляли подсчет клеток по выбранным классам в течение всего времени фиксации изображения клеточной популяции и получали результаты в виде цифровых данных и графических изображений.

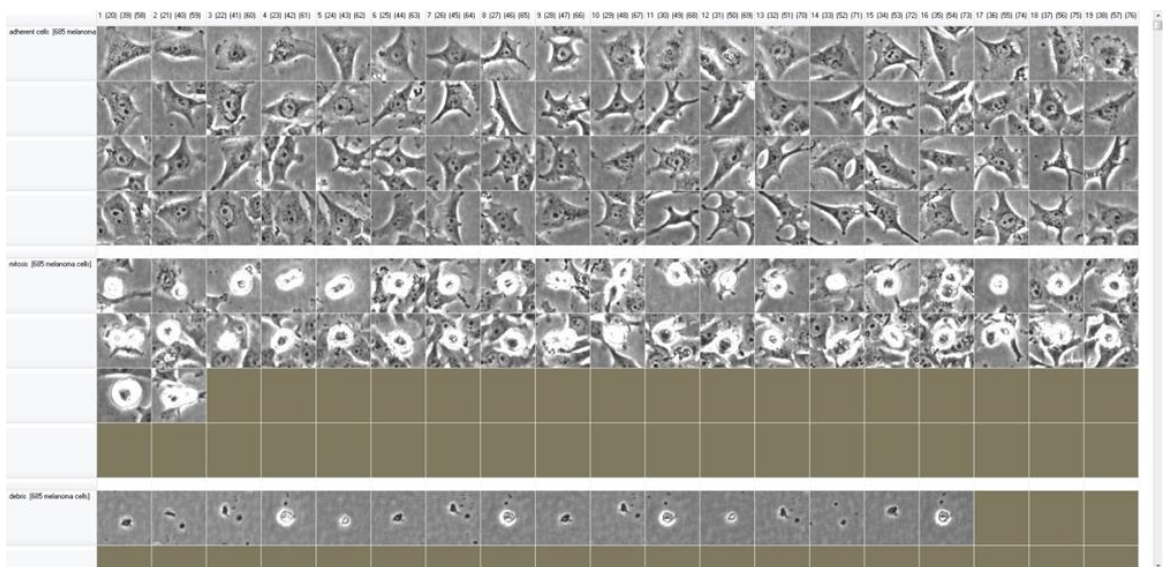


Рисунок 8 – Пример библиотеки клеточных образов с тремя идентификационными классами культуры меланомы кожи 685 на 29 пассаже

### 2.2.1.4.2. Оценка пролиферативной активности в автоматическом клеточном анализаторе в режиме реального времени xCelligence

Автоматический клеточный анализатор xCelligence (ACEA Bioscience Inc., США) позволяет осуществлять мониторинг морфологии, адаптации к субстрату, пролиферации, миграции, инвазии клеток в режиме реального времени. Мониторинг производится при помощи специальной технологии – измерения электрического сопротивления (импеданса) на электродах, расположенных на дне лунок планшета (рис. 9).

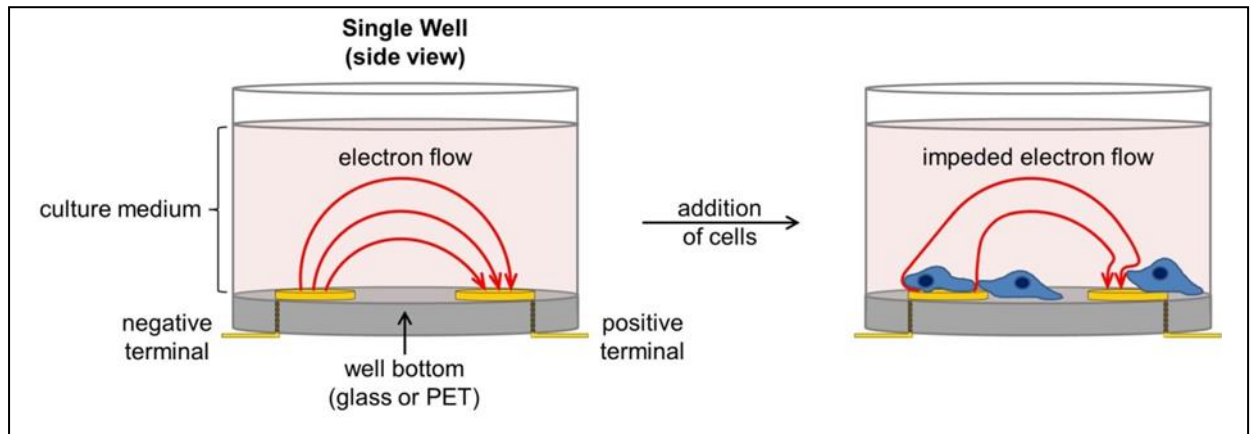


Рисунок 9 – Схематическое изображение регистрации электрического импеданса с помощью прибора xCelligence

Прибор измеряет электрическое сопротивление сенсорных электродов, которое пропорционально числу клеток, прикрепляющихся к сенсорным датчикам, позволяющим осуществлять измерение роста клеток в различные временные интервалы. Электроды покрывают 70–80% поверхности лунки планшета, что позволяет одновременно мониторировать всю популяцию клеток, находящихся в лунке. Изменения импеданса электрического тока под влиянием адгезии клеток с течением времени характеризуются параметром «Клеточный индекс» CI – соотношение импеданса в «нулевой» точке к импедансу в данной временной точке. Кроме того, для анализа также используют два параметра: 1) «Doubling time» (DT), характеризующий промежуток времени, необходимый для увеличения CI в два раза. Отрицательные значения DT отражают уменьшение CI с течением времени. 2) «Slope» – тангенс угла касательной к точкам кривой CI, параметр, ассоциированный со скоростью роста культуры клеток и отражающий скорость изменения CI в выбранный период времени. Графическое изображение динамики CI с течением времени наблюдения можно разделить на три основных периода: 1 – адгезия клеток, 2 – адаптация клеток к субстрату (распластывание), 3 – пролиферация клеток (рис. 10).

Для анализа пролиферативной активности опухолевые клетки высевали предварительно в планшеты E-16 (ACEA Bioscience Inc., США) в количестве от 2 до  $10 \times 10^4$  клеток на лунку.

Затем оставляли планшеты на 30 мин в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора для минимизации турбулентных потоков жидкостей. Далее устанавливали планшеты в ячейки прибора и начинали регистрацию электрических сигналов.

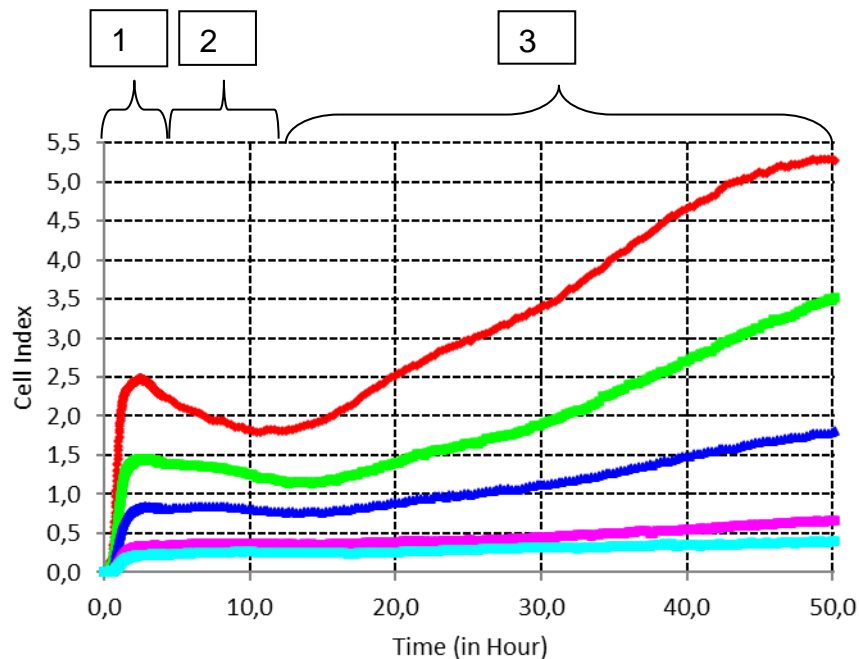


Рисунок 10 – Изменение СИ в течение заданного времени наблюдения на примере культуры меланомы кожи #520, 73 пассаж: 1 – адгезия клеток; 2 – адаптация клеток к субстрату (распластывание); 3 – пролиферация клеток;  
 ■ –  $5 \times 10^3$  кл/лунка; ■ –  $10 \times 10^3$  кл/лунка; ■ –  $20 \times 10^3$  кл/лунка; ■ –  $50 \times 10^3$  кл/лунка;  
 ■ –  $100 \times 10^3$  кл/лунка

### 2.2.1.5. Анализ миграционных и инвазивных свойств культивируемых клеток солидных опухолей

1. Анализ скорости миграции опухолевых клеток проводили по методу, описанному в руководстве Александровой А.Ю. (2008) [441]. Клетки высевали в 6-луночные планшеты (Nunc, Дания) в количестве 400 тысяч на лунку. После образования монослоя аспирировали питательную среду и удаляли часть монослоя в виде «узкой раны». Далее вносили снова новую порцию питательной среды, закрывали планшеты крышками, снабженными стерильными фильтрами, и герметизировали специальной лентой (Tesa, Франция). Помещали планшеты в камеру системы Cell-IQ и подключали воздушную газовую смесь, содержащую 5% CO<sub>2</sub>. Вели наблюдение за популяциями злокачественных клеток и непрерывно регистрировали изображение не менее 48 часов. Эффективность миграции оценивали по скорости зарастания участков субстрата, свободных от клеток. Для анализа скорости миграции клеток создавали протокол на основе выбора пороговых значений измерений таким образом, чтобы все клетки, в отличие от фона, входили в установленный диапазон, после чего система Cell-IQ выполняла



измерение фоновой области (рис. 11). Получали результаты в виде цифровых данных и графических изображений.

2. Анализ количества опухолевых клеток, способных к миграции и инвазии, был осуществлен на основе протокола, предложенного Corning Life Sciences (США).

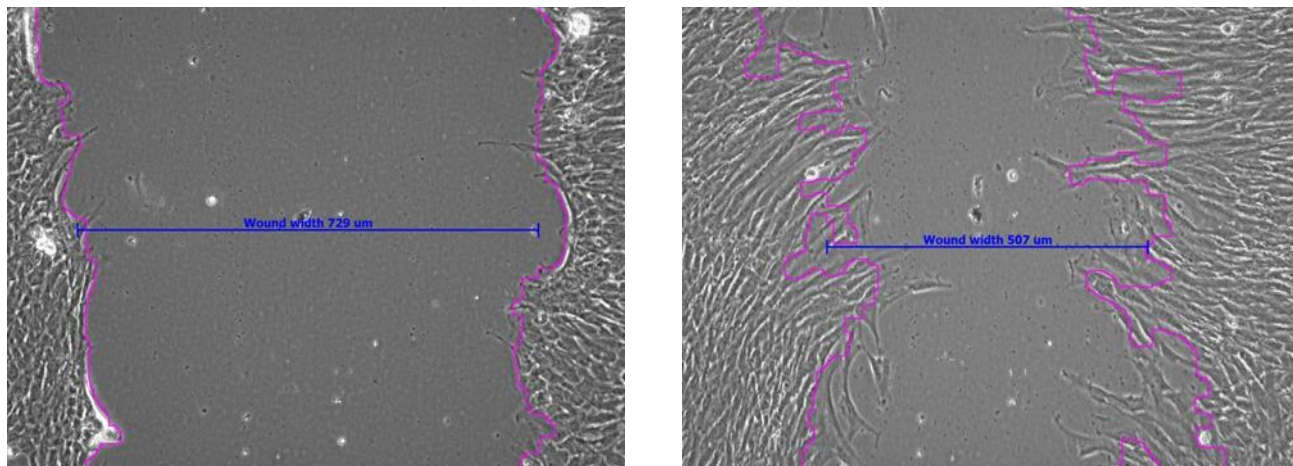


Рисунок 11 – Пример измерения фоновой области, свободной от клеток, культуры рабдомиосаркомы 862, 14 пассаж

Для осуществления экспериментов готовили 0,01М трис-буфер (рН 8,0) на физиологическом растворе и пропускали через фильтр с порами 0,2 мкм (Millipore, США). Матригель (BD Bioscience, США) (концентрация 8–12 мг/мл) разводили буфером, охлажденным до 4 °С, до конечного объема 2 мл с концентрацией белков 200–300 мкг/мл. Все манипуляции с матригелем проводили на холоде. Количество приготовленного раствора матригеля было достаточно для покрытия дна 20 инsertов для 24-луночного планшета (BD Falcon, США), на дне которых находилась мембрана с порами 8 мкм (Corning, США), (100 мкл на инsert). Инкубировали инsertы при 37 °С 2 часа для полимеризации матригеля.

Готовили суспензию исследуемых клеток в количестве  $5 \times 10^4$  клеток на мл. Добавляли по 500 мкл клеточной суспензии ( $2,5 \times 10^4$  клеток) на бессывороточной среде в каждый инsert. В качестве хемоаттрактанта использовали культуральную среду DMEM/F12 с 20% СЭКРС в количестве 750 мкл на лунку 24-луночного планшета, куда вставляли инsertы с клетками. Инкубировали 24 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Подсчет инвазивных клеток осуществляли не менее чем в трех полях зрения при объективе  $\times 40$  в инвертированном микроскопе. Процент клеток с инвазивными свойствами рассчитывали как соотношение количества клеток, мигрировавших через матригель, к количеству клеток, мигрировавших через мембрану без покрытия:

$$\% \text{ инвазии} = \frac{\text{кол-во клеток, мигрировавших через покрытие Corning® Matrigel® Matrix}}{\text{кол-во клеток, мигрировавших через мембрану без покрытия}} \times 100$$

3. Для наблюдения за процессом миграции и инвазии опухолевых клеток в режиме реального времени был использован автоматический клеточный анализатор xCelligence. Принцип метода базируется на создании направленного градиента миграции клеток через пористую мембрану, на нижней стороне которой располагаются электроды. Этот метод реализуется при использовании специальных двухкамерных планшетов CIM-16 (ACEA Bioscience Inc., США).

Планшеты имеют две камеры, разделенные микропористой мембраной. Для изучения миграции клетки вносят в верхнюю камеру, расположенную над мембраной, либо на слой базального матрикса, нанесенного предварительно на микропористую мембрану в случае изучения инвазии. Клетки двигаются под влиянием хемоаттрактанта, находящегося в нижней камере, проникают через поры и располагаются на электродах нижней поверхности мембраны.

Для осуществления экспериментов вносили в каждую лунку нижней камеры по 160 мкл питательной среды DMEM/F12 с 20% СЭКРС в качестве хемоаттрактанта, затем присоединяли верхнюю камеру и добавляли 25–50 мкл бессывороточной среды или матригеля, чтобы покрыть дно лунок с мембранами. Оставляли планшеты на 1 час в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Далее проводили фоновые измерения.

В каждую лунку планшетов высевали по 100 мкл суспензии, содержащей  $4 \times 10^4$ /мл культивируемых опухолевых клеток, прошедших не менее 20 пассажей, после чего планшеты помещали в ячейки прибора xCelligence и через 30 мин начинали регистрацию электрических сигналов, чтобы исключить турбулентные возмущения жидкости в лунках. Качество процессов миграции и инвазии с течением времени оценивали по изменению трех параметров: CI, DT и Slope в цифровом и графическом выражении.

#### **2.2.1.6. Определение количества и жизнеспособности культивируемых клеток (клеток солидных опухолей, мононуклеаров, лимфоцитов, миелоидных предшественников и дендритных клеток)**

В процессе культивирования клеток осуществляли подсчет их количества и определяли их жизнеспособность стандартным методом окрашивания трипановым синим с последующим анализом в автоматическом счетчике клеток «Countess» (Invitrogen, США). Для этого смешивали 10 мкл суспензии клеток и 10 мкл 0,4% раствора трипанового синего, который проникает и окрашивает ядра только в мертвых клетках. Полученный образец вносили в камеру специального слайда и вставляли в прибор. Получали увеличенное изображение образца на экране прибора с результатами подсчета в цифровом виде.

Оценку жизнеспособности опухолевых клеток при различных экспериментальных воздействиях проводили с помощью МТТ-теста с использованием набора Cell Proliferation Kit

(МТТ) (Roche, Швейцария), представляющего собой колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток.

Принцип метода основан на том, что активность НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов может проявляться только в жизнеспособных клетках. Эти ферменты способны восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол 2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ-labeling reagent) в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание. Растворяющий компонент (раствор детергента додецилсульфат натрия (SDS) в соляной кислоте), переводит нерастворимый пурпурный формазан в цветной раствор. Коэффициент поглощения этого цветного раствора может быть выражен количественно путем измерения при определенной длине волны (обычно между 500 и 600 нм) методом спектрофотометрии.

Клетки высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в конечном объеме 100 мкл на лунку в количестве  $5 \times 10^4$  клеток на лунку. Культивировали клетки в стандартных условиях в течение времени, необходимого для эксперимента. После инкубационного периода добавляли в каждую лунку 10 мкл МТТ-labeling reagent в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Инкубировали 4 часа в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. Затем добавляли в каждую лунку 100 мкл растворяющего компонента и помещали планшет на ночь в  $\text{CO}_2$ -инкубатор. После того как кристаллы формазана полностью растворялись, использовали микропланшетный ридер Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo LabSystems Inc., США) с блоком считывания и обработки информации при длине волны 620 нм для измерения спектрометрической поглощательной способности образцов.

#### **2.2.1.7. Получение костномозговых и периферических предшественников дендритных клеток**

Миелоидные предшественники получали из лейкоферезного материала и периферической крови. Аферез костномозговых предшественников периферической крови проводили на аппарате CobeSpectra (Gambro BCT Inc., США). Использовали программу афереза с визуальным контролем качества во время процедуры по цветовой шкале для исключения примеси эритроцитов периферической крови. Это является обязательным условием при выделении миелоидных предшественников ДК. Принцип разделения периферической крови основан на различной плотности клеток и скорости их осаждения за счет различного размера. Разделение происходит при непрерывном центрифугировании путем отбора требуемых слоев расслоившейся клеточной массы и плазмы. Оставшиеся компоненты возвращаются пациенту.

Для получения  $2,4\text{--}6,2 \times 10^{10}$  костномозговых миелоидных предшественников (гемопозитические стволовые клетки, ранние предшественники моноцитопоза,

дендрцитопоэза, моноциты) производили забор от 200 до 220 мл лейкоцитарного материала, мобилизуя выход в периферическую кровь предшественников ДК с помощью G-CSF (5 мкг/кг массы тела подкожно в течение 4–5 дней). Периферические миелоидные предшественники получали с помощью венопункции 120 мл венозной крови, что позволяло выделить  $100\text{--}200 \times 10^6$  клеток. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартным методом, путем центрифугирования в градиенте плотности «Ficoll-Paque Premium» «GE Healthcare» (Великобритания) согласно Woym A. (1968) [442]. Моноциты (CD14<sup>+</sup>) выделяли методом адгезии на пластике [443].

Периферическую венозную кровь помещали в стерильные 50-мл пробирки и разбавляли равным объемом питательной среды RPMI-1640, после чего проводили центрифугирование в градиенте плотности «Ficoll-Paque Premium» в 15-мл стерильных центрифужных пробирках при 1500 об/мин в течение 40 мин при комнатной температуре. Во время центрифугирования эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки, а на границе раздела фаз находятся МНК.

Прозрачный слой среды, расположенный непосредственно над опалесцирующим слоем МНК удаляли, МНК собирали по всей площади сечения пробирки. Взвесь МНК вносили в стерильные 15-мл центрифужные пробирки и разбавляли четырехкратным избытком питательной среды RPMI-1640 без сыворотки, ресуспендировали, отмывали МНК двукратным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин.

Проводили подсчет и оценку жизнеспособности МНК с помощью автоматического счетчика клеток «Countess™» и 0,4% трипанового синего, получали  $10\text{--}15 \times 10^6$  и более клеток, с жизнеспособностью не менее 98%.

#### **2.2.1.8. Дифференцировка дендритных клеток из миелоидных предшественников *ex vivo***

Метод приготовления культур ДК человека был разработан и оптимизирован в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ранее [444]. Для дифференцировки ДК из предшественников, полученных в результате лейкофереза или из МНК периферической крови, последние помещали в неполную питательную среду RPMI-1640 (посевная доза  $5 \times 10^6$  кл/мл) и 2 плоскодонных культуральных флакона 75 см<sup>2</sup> с вентилируемыми крышками (BD Falcon, США). Инкубировали в условиях контролируемого 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности при 37 °С. Через 2 часа среду с неприлипшими клетками (преимущественно лимфоцитами) аккуратно отбирали, а к клеткам, адгезированным на пластике, (преимущественно моноцитам) добавляли свежую бессывороточную среду «CellGro DC». Ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (15 нг/мл) (CellGenix, ФРГ) вносили на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования.

Для приготовления опухолевого лизата культуры опухолевых клеток снимали с субстрата, оценивали их жизнеспособность, подсчитывали количество, смешивали в равных пропорциях и проводили 6 последовательных циклов моментального замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и оттаивания до комнатной температуры в фосфатно-солевом буфере без криопротектора (качество лизиса клеток контролировали с помощью 0,1% трипанового синего и светового микроскопа). Затем проводили осаждение клеточного детрита центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Осуществляли фильтрацию надосадочной фракции через фильтр 0,2 мкм и расфасовку опухолевого лизата в криопробирки с хранением при  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

На 7-е сутки культивирования для созревания ДК вносили опухолевые антигены, исходя из соотношения 1 ДК/3 лизированные опухолевые клетки, ростовые факторы – GM-SCF (72 нг/мл), IL-4 (15 нг/мл) (CellGenix, ФРГ) и TNF- $\alpha$  (20 нг/мл) (BD Bioscience, США). Инкубацию проводили в течение 48 часов.

Через 48 часов ДК собирали, осаждали центрифугированием, отмывали в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, содержащего 10% альбумина человека, производили подсчет и оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток «Countess» и 0,4% трипанового синего.

#### **2.2.1.9. Приготовление культуры специфически активированных цитотоксических Т-лимфоцитов**

При приготовлении культуры специфически активированных ЦТЛ руководствовались методом Märten A. и соавт. (2002) [445]. После выделения МНК методом лейкофереза периферической крови пациентов или центрифугирования периферической крови в градиенте плотности, клетки вносили в плоскодонные культуральные флаконы 75 см<sup>3</sup> для разделения фракций (преимущественно моноцитов и преимущественно лимфоцитов) методом адгезии к субстрату как описано выше. Среду с неприлипшими клетками (преимущественно лимфоцитами) аккуратно отбирали, подсчитывали количество, отбирали пробу для анализа методом проточной цитофлуорометрии и криоконсервировали до использования. С прилипшей фракцией клеток работали, как описано выше, получали активированные ДК, нагруженные РТА. Фракцию лимфоцитов размораживали и кокультивировали со зрелыми ДК в присутствии цитокинов GM-CSF (72 нг/мл), IL-2 (12,5 МЕ/мл), IL-4 (15 нг/мл), IL-7 (10 нг/мл), TNF- $\alpha$  (20 нг/мл) (BD Bioscience, США). Затем собирали лимфоциты и переносили их для кокультивирования со свежей порцией зрелых ДК в присутствии искомого коктейля цитокинов. Проводили кокультивирование лимфоцитов и зрелых ДК в течение 14 дней, добавляя цитокины каждые 48 часов. Полученную суспензию лимфоцитов анализировали методом проточной

цитофлуорометрии, подвергали методу негативной магнитной сепарации с целью выделения субпопуляции ЦТЛ и использовали для экспериментов.

#### **2.2.1.10. Сортировка клеток**

Сортировку клеток осуществляли методом негативной магнитной сепарации с использованием прибора EasySep™ Magnet. CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты были выделены из клеточной суспензии с помощью набора EasySep™ Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies Inc., Канада). Принцип метода заключается в выделении интересующей клеточной популяции за счет образования тетрамерного комплекса антител, специфичных к поверхностным антигенам клеток всех остальных субпопуляций (CD4, CD11b, CD45R (B220), NK cells (DX5), TER119, Ly-6G (Gr-1)), и магнитных наночастиц, покрытых декстраном, позволяющим удерживать «нежелательные» клеточные элементы с помощью создания высокоградиентного магнитного поля.

#### **2.2.1.11. Цитогенетический анализ клеток солидных опухолей**

В клеточную культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, добавляли 0,4 мг/мл колхицина (Merck, ФРГ) на 6 часов, трипсинизировали в стандартных условиях, центрифугировали в течение 10 мин, обрабатывали осадок гипертоническим раствором 0,075 мМ KCl в течение 30 мин, после чего фиксировали в 3-х порциях смеси метанол-уксусная кислота в отношении 1:3 и раскапывали на охлажденные влажные стекла. Препараты подвергали так называемому «aging»-созреванию в течение 24 часов при температуре 56 °С, затем обрабатывали протеиназой и окрашивали по Гимзе [446]. Анализировали от 30 до 100 клеток, в зависимости от состава культуры. Структурные и численные повреждения определяли в соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры человека [447]. Цифровые изображения получали, используя микроскоп 90iNikon (Nikon, Япония), объектив 90×, камеру NikonDS-Fi1. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v.7. Цитогенетический анализ клеток солидных опухолей проводили на базе лаборатории клеточных и генных технологий научно-исследовательского отдела медико-биологических исследований ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны РФ. Данная процедура была необходима для паспортизации клеточных линий солидных опухолей.

#### **2.2.1.12. Приготовление вакцин на основе аутологичных генетически модифицированных опухолевых клеток**

Индивидуально для каждого больного, которому была назначена вакциноterapia генетически модифицированными опухолевыми клетками, приготавливали культуру аутологичных опухолевых клеток и хранили в замороженном состоянии по приведенной выше

методике. За неделю до вакцинации клетки размораживали, отмывали дважды в полной культуральной среде, помещали в культуральную посуду и подвергали трансфекции репортерными плазмидами для подбора условий оптимальной трансфекции геном *tag 7*. В течение трех дней оценивали максимальную эффективность трансфекции, после чего проводили трансфекцию основной массы клеток геном *tag 7*. Использовали метод липосомной трансфекции плазмид pCMV $\beta$  (Clonotech, США) и EGFP (предоставлены НИИ биологии гена РАН).

Препараты для липосомной трансфекции (связывающий буфер (10 мМ Hepes, 0,9% NaCl, pH 7,4), Enhancer, Unifectin-21, Unifectin-56) и рекомендации по ее проведению предоставлены разработчиками [448]. Накануне трансфекции клетки высевали в плотности 60–80% монослоя, и на следующий день смешивали ДНК и липиды для формирования трансфекционной смеси, которую вносили в культуральную среду трансфецируемых клеток, инкубировали 24–72 часа, после чего снимали с культуральной поверхности, используя трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США), и проводили анализ экспрессии введенных генов. С этой целью применяли генетические конструкции, кодирующие ген  $\beta$ -галактозидазы и EGFP-ген. Эти репортерные гены кодируют белки, присутствие которых можно выявлять визуально при помощи флуоресцентной микроскопии по свечению зеленого флуоресцентного белка GFP в ультрафиолетовом свете (EGFP) и световой микроскопии препаратов, предварительно окрашенных хромогенным субстратом X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил  $\beta$ -D-галактопиранозид) (ген  $\beta$ -галактозидазы) [449]. Этот анализ производили через 24–72 часа после трансфекции. Эффективность трансфекции оценивали по отношению окрашенных (трансфецированных) клеток к общему количеству клеток и выражали в процентах. Через 3 дня трансфецированные опухолевые клетки подвергали облучению для блокады пролиферации. Культуру опухолевых клеток в день вакцинации облучали в суммарной дозе 2000 сГр на терапевтическом аппарате «Рокус- $\gamma$ » Co<sup>60</sup> 1,25 mev (мощность дозы 0,99 сГр/с). Считается, что облучение в таких дозах приводит к полному торможению пролиферации опухолевых клеток. Затем облученные опухолевые клетки дважды отмывали от культуральной среды физиологическим раствором и вводили больному строго внутривенно паравerteбрально в 3 точки на расстоянии 3 см друг от друга в суммарном количестве  $10^7$  клеток [450]. В четвертую точку вводили нетрансфецированные облученные опухолевые клетки. Полный курс лечения состоял из 6 введений вакцины с интервалом 21 день.

#### **2.2.1.13. Приготовление вакцин на основе дендритных клеток, активированных лизатом опухолевых клеток**

Для приготовления ДК-вакцины полученные ДК, нагруженные опухолевым клеточным лизатом (от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$ ), ресуспендировали в 1,5 мл 0,9% изотонического раствора NaCl,

содержащего 10% альбумина человека, переносили в ампулу и доставляли в клиническое отделение для введения больному. После получения стандартизированного препарата производили введение аутологичных зрелых ДК внутривенно паравертебрально в 4 точки. Вакцину вводили внутривенно паравертебрально в дозе 5–10 млн клеток на одну инъекцию с интервалом для 1-й, 2-й вакцинации – 2 недели, для 3-й, 4-й вакцинации – 3 недели, для и 5–12-й вакцинации – 4 недели. Перед 1-й, 3-й, 5-й, 7-й и 12-й вакцинацией за 3 дня до введения вакцины в/в в течение 2 часов вводился циклофосфан в дозе 300 мг/м<sup>2</sup>.

## **2.2.2. Методы иммуноферментного анализа**

### **2.2.2.1. Иммуноферментный анализ в «сэндвич-варианте»**

Методом иммуноферментного анализа в «сэндвич-варианте» определяли количественное содержание в супернатантах культур клеток и в сыворотке и/или плазме крови больных лиганда рецептора NKG2D цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров MICA, трансформирующего ростового фактора TGF- $\beta_1$ , интерлейкина IL-10, сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF.

#### **2.2.2.1.1. Определение MICA**

Для определения MICA были использованы наборы MICA Duoset ELISA Kit (R&D Systems, США). Все этапы процедуры проводили при комнатной температуре. В 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа вносили «захватывающие» антитела (моноклональные мышиные антитела против MICA человека) в конечной концентрации 2,0 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) в количестве 100 мкл на лунку. Инкубировали 12 часов, затем удаляли раствор из лунок и промывали трижды PBS, содержащим 0,05% Tween-20, pH 7,2–7,4. Процедуру промывки повторяли после каждого этапа взаимодействия реагентов.

Для блокады неспецифического связывания инкубировали планшет в течение 1 часа с PBS, содержащим 1% BSA, pH 7,2–7,4, предварительно пропущенным через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Затем вносили по 100 мкл на лунку стандарты и образцы на 2 часа. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали рекомбинантный MICA человека в серии концентраций (начальная концентрация – 4000 пг/мл, конечная – 15,125 пг/мл). Каждый образец вносили в двух повторах.

Далее следовал этап внесения «детектирующих» антител (биотинилированные козы антитела против MICA человека), которые добавляли по 100 мкл на лунку в конечной концентрации 400 нг/мл в PBS, содержащем 1% BSA и 2% инактивированной козьей сыворотки крови. Инкубацию проводили в течение 2 часов. Затем вносили по 100 мкл на лунку Streptavidin-HRP-комплекс, представляющий собой полимерный конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, в разведении 1:200, инкубировали 20 мин в темноте.



Далее добавляли по 100 мкл субстратного раствора, состоящего из равновесной смеси водного раствора  $H_2O_2$  и тетраметилбензидина, и инкубировали также 20 мин в темноте, после чего вносили по 50 мкл 2N раствора серной кислоты (стоп-раствор) для остановки реакции и немедленно измеряли оптическую плотность в каждой лунке планшета с помощью микропланшетного ридера Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo LabSystems Inc., США) с блоком считывания и обработки информации при длине волны 450 нм.

#### **2.2.2.1.2. Определение TGF- $\beta_1$**

Для определения TGF- $\beta_1$  были использованы наборы Human TGF- $\beta_1$  BMS249/2 (Bender MedSystems, Австрия). Все этапы процедуры проводили при комнатной температуре в шейкере ELMi ST-3M (Elmi Ltd, Латвия) при 100 об/мин. После каждого этапа осуществляли промывку с помощью PBS, содержащим 1% Tween-20. До начала процедуры разводили образцы (супернатанты клеточных культур, плазма, сыворотка крови пациентов и здоровых людей) 1:10 буфером, содержащим PBS с 2% Tween-20 и 10% BSA. К 200 мкл каждого разведенного образца добавляли 20 мкл 1N соляной кислоты и инкубировали 1 час, после чего нейтрализовали образец с помощью добавления 20 мкл 1N гидроксида натрия.

В 96-луночный планшет, с адсорбированными на поверхности лунок антителами против TGF- $\beta_1$  человека, вносили по 100 мкл стандарта и предварительно подготовленных образцов. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали рекомбинантный TGF- $\beta_1$  человека в серии концентраций (начальная концентрация – 30,0 нг/мл, конечная – 0,5 нг/мл). Затем добавляли по 50 мкл HRP-конъюгата, представляющего собой мышинные анти-TGF- $\beta_1$ -моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Инкубацию с образцами и HRP-конъюгатом проводили в течение 4 часов.

Для приготовления субстратного буфера смешивали в равных пропорциях тетраметилбензидин и 0,02% забуференный раствор перекиси водорода. Добавляли по 100 мкл субстратного буфера в каждую лунку на 10 мин. Развитие цветной реакции мониторировали с помощью микропланшетного ридера Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo LabSystems Inc., США) с блоком считывания и обработки информации при длине волны 450 нм после добавления стоп-раствора (1M фосфорная кислота). При расчете концентраций после измерения оптической плотности учитывали, что образцы были разведены 1:30.

#### **2.2.2.1.3. Определение интерлейкина-10**

Определение IL-10 производили с помощью наборов Human IL-10 Platinum ELISA (eBioscience, США). Все этапы процедуры проводили при комнатной температуре в шейкере ELMi ST-3M (Elmi Ltd, Латвия). После каждого этапа осуществляли четырехкратную промывку с помощью PBS, содержащим 1% Tween-20. В 96-луночный планшет, с адсорбированными

на поверхности лунок антителами против IL-10 человека, добавляли по 100 мкл стандарта, в качестве которого использовали рекомбинантный IL-10 человека в серии концентраций (начальная концентрация – 200 пг/мл, конечная – 3,1 пг/мл). В лунки для образцов вносили сначала по 50 мкл буфера, PBS с 2% Tween-20 и 10% BSA, затем по 50 мкл каждого образца и по 50 мкл конъюгата моноклональных антител против IL-10 с биотином. Инкубировали в течение 2 часов в шейкере при 100 об/мин. Далее добавляли полимерный комплекс стрептавидина и пероксидазы хрена по 100 мкл на лунку и инкубировали в шейкере при 200 об/мин. Затем вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидина на 10 мин в темноте. Развитие цветной реакции мониторировали с помощью микропланшетного ридера Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo LabSystems Inc., США) с блоком считывания и обработки информации при длине волны 620 нм или после добавления стоп-раствора (1М фосфорная кислота) при длине волны 450 нм. При расчете концентраций после измерения оптической плотности учитывали, что образцы были разведены 1:2.

#### **2.2.2.1.4. Определение VEGF**

Определение VEGF производили с помощью наборов Human VEGF-A Platinum ELISA (eBioscience, США). Все этапы процедуры проводили при комнатной температуре в шейкере ELMi ST-3M (Elmi Ltd, Латвия) при 100 об/мин. После каждого этапа осуществляли шестикратную промывку с помощью PBS, содержащим 1% Tween-20. В 96-луночный планшет, с адсорбированными на поверхности лунок поликлональными антителами против VEGF-A человека, добавляли по 100 мкл стандарта, в качестве которого использовали рекомбинантный VEGF-A человека в серии концентраций (начальная концентрация – 1000 пг/мл, конечная – 15,6 пг/мл). В лунки для образцов вносили сначала по 50 мкл буфера для разведения образцов, затем по 50 мкл каждого образца и инкубировали 1 час. Затем добавляли по 100 мкл поликлональных антител против VEGF-A человека, конъюгированных с биотином и инкубировали еще 1 час.

Следующим этапом было внесение полимерного комплекса стрептавидина и пероксидазы хрена по 100 мкл на лунку с инкубацией в течение часа. Для проявления реакции связывания антител с антигеном использовали раствор тетраметилбензидина по 100 мкл на лунку с инкубацией 30 мин в темноте. Результаты мониторировали с помощью микропланшетного ридера Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo LabSystems Inc., США) с блоком считывания и обработки информации при длине волны 620 нм или после добавления стоп-раствора (1М фосфорная кислота) при длине волны 450 нм. При расчете концентраций после измерения оптической плотности учитывали, что образцы были разведены 1:2.

### 2.2.2.2. Мультиплексный анализ

Для исследований использовали измерительную систему мультиплексного анализа Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США) с программным обеспечением Bio-Plex Manager™ v.6.1 (Bio-Rad, США) и вспомогательные приборы: промывающее устройство Bio-Plex Pro™ II Wash Station (Bio-Rad, США); инкубатор-шейкер Cobas EIA Incubator (Roche, Швейцария).

В работе были использованы наборы реагентов Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel 1, 16-plex (#171AC500M, Bio-Rad, США), Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel 2, 18-plex (#171AC600M, Bio-Rad, США), Bio-Plex Pro™ Human Chemokine 40-plex Panel (#171AK99MR2, Bio-Rad, США), позволяющие определять в биологических жидкостях следующие аналиты:

Панель 1: растворимый лиганд рецептора CD40 (sCD40L), эпидермальный фактор роста (EGF), endoglin, растворимый лиганд рецептора CD95 (sFASL), гепарин-связывающий EGF-подобный ростовой фактор (HB-EGF), белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1), интерлейкины (IL-6, IL-8, IL-18), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), плацентарный фактор роста (PLGF), трансформирующий фактор роста (TGF- $\alpha$ ), фактор некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ), активатор урокиназного плазминогена (uPA), изоформы сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D).

Панель 2: растворимый рецептор эпидермального ростового фактора (sEGFR), фактор роста фибробластов (FGF-basic), Follistatin, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), Leptin, Osteopontin, тромбоцитарный фактор роста (PDGF-AB/BB), молекула клеточной адгезии PECAM-1, Prolactin, фактор роста стволовых клеток (SCF), растворимый тирокиназный рецептор sTIE-2, растворимые рецепторы сосудистого эндотелиального фактора роста 1 и 2 (sVEGFR-1, sVEGFR-2).

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

Для анализа использовали супернатанты клеток солидных опухолей, культивируемых в 2D- и 3D-формате, а также культур нормальных фибробластов кожи человека и FLECH. Всего было проанализировано 137 образцов.

### 2.2.3. Методы иммуногисто- и цитохимии

Для иммуногистохимических исследований изготавливали парафиновые срезы на базе патологоанатомического отделения с прозектурой ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Операционный материал обрабатывали по стандартной методике: фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине, далее гистологические образцы проводили в процессоре карусельного типа Leica TP1020 tissue processor (Leica Biosystems, ФРГ) с инкубацией в изопропиловом спирте и в расплавленном парафине при температуре 58–60 °С. Затем заливали материал в парафин с использованием заливочной станции Leica EG1150 H tissue embedder (Leica Biosystems, ФРГ), блоки охлаждали на специальном столике Leica EG1150 C (Leica Biosystems, ФРГ). Далее изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм на санном микротоме, которые помещали на предметные стекла, предварительно покрытые раствором поли-L-лизина (Dako, Aglient, США).

Срезы высушивали в термостате при 7 °С, после чего их прогревали при температуре 60 °С в течение 30 мин, затем подвергали депарафинизации в ксилоле и последовательной процедуре гидратации в изопропиловом, этиловом спирте, дистиллированной воде. Проводили ингибирование активности эндогенной пероксидазы в растворе 3% перекиси водорода в течение 5 мин. Термическую демаскировку антигенов осуществляли в EDTA-буфере, pH 9,0 или в цитратном буфере, pH 6,0 при температуре 95–99 °С в течение 20 мин. Срезы инкубировали с первичными моноклональными антителами во влажной среде в течение 30–60 мин при 37 °С, далее со вторичными антителами и стрептавидин-пероксидазным комплексом. Затем проявляли реакцию антиген-антитело при помощи раствора диаминобензидина 3–5 мин, проводили дегидратацию по батарее из спиртов и ксилолов, заключали в канадский бальзам.

Для иммуноцитохимических исследований культивируемые клетки солидных опухолей высаживали на 8-, 4- и 2-луночные культуральные стекла (BD Falcon, США) в объеме полной культуральной питательной среды от 250 мкл до 1 мл. После прикрепления клеток к поверхности при достижении монослоя не менее 60% аспирировали культуральную среду, промывали лунки теплым фосфатно-солевым буфером для удаления остатков сыворотки и фиксировали в абсолютном ацетоне 5 мин. Далее высушивали стекла на воздухе, помещали в герметичный контейнер и хранили при -30 °С до использования. Перед иммуноцитохимическими реакциями стекла размораживали при комнатной температуре, помещали на 2 мин в дистиллированную воду, затем проводили блокаду активности эндогенной пероксидазы с помощью реагента DAKO® Peroxidase Blocking Reagent. Термическую демаскировку антигенов осуществляли в EDTA-буфере, pH 9,0 или в цитратном буфере, pH 6,0

при температуре 85–90 °С в течение 5 мин. Инкубацию с первичными поли- и моноклональными антителами проводили во влажной среде в течение 30–60 мин при 37 °С. Все последующие манипуляции проводили аналогично как для парафиновых срезов. Используемые поли- и моноклональные антитела указаны в табл. 3.

Таблица 3 – Характеристика моно- и поликлональных антител, использованных для иммуногисто- и цитохимических реакций

Антитело/ клон	Время инкубации (мин)	Разведе- ние	Система детекции	Производи- тель	Буфер	Тип образца
1	2	3	4	5	6	7
Для исследования клеток меланомы кожи						
MelanA/A103	45	1/25	1	Novocastra	pH6,0	P, Fr
Tyros/T311	45	1/50	1	Novocastra	pH6,0	P, Fr
TRP-1/G3E6	45	1/40	1	Novocastra	pH9,0	P, Fr
MITF/34CA5	45	1/40	1	Novocastra	pH9,0	P, Fr
S100	30	1/400	2	Dako	pH6,0	P, Fr
Anti-melanosome/	30	1/50	1	Dako	pH6,0	P, Fr
CD63/TS63	45	1/100	1	Abcam	б/о	P, Fr
CD146/ P1H12	45	1/100	1	Abcam	pH6,0	P, Fr
Для исследования клеток эпителиального происхождения						
MCK/AE1/AE3	30	1/50	1	Dako	pH6,0	P, Fr
CK7/OV-TL 12/30	30	1/100	1	Dako	pH9,0	P, Fr
CK18/DC10	30	1/200	1	Dako	pH6,0	P, Fr
CK19/b170	45	1/100	1	Dako	pH9,0	P, Fr
CK20/K 20.8	30	1/50	1	Dako	pH9,0	P, Fr
EMA/GP1.4	60	1/200	1	Novocastra	б/о	P, Fr
Для исследования клеток сарком мягких тканей						
SMA/asm-1	60	1/50	2	Vector Lab.	pH9,0	P, Fr
MSA/ SC28	30	1/400	1	Novocastra	pH6,0	P, Fr
Desmin/DE-R-11	30	1/200	1	Novocastra	pH9,0	P, Fr
Vimentin/CRL33	30	1/400	1	Novocastra	pH9,0	P, Fr
Calponin/CALP	60	1/250	2	Abcam	pH9,0	P, Fr
Caldesmon/E83	60	1/300	2	Abcam	б/о	P, Fr
Для исследования клеток рака предстательной железы						
PSA/35H9	45	1/50	1	Novocastra	б/о	P, Fr
PSMA/1D6	30	1/50	1	Novocastra	pH9,0	P, Fr
PIP/4A6A6	30	1/20	1	Novocastra	б/о	P, Fr
PTOV1/17C6	30	1/40	1	Novocastra	pH9,0	P, Fr
PAP/PASE/4LG	30	1/100	1	Novocastra	б/о	P, Fr

1	2	3	4	5	6	7
Для исследования сосудистого эндотелиального фактора роста						
VEGF/VG1	30	1/40	1	DBS	pH9,0	P, Fr
Для исследования пролиферативной активности клеток						
Ki-67/MIB-1	30	1/75	1	Dako	pH6,0	P, Fr
Для исследования антигенов МНС I и II класса						
HLA ABC/W632	30	1/100	1	Dako	б/о	Fr
HLA DP, DQ, DR/CR3/43	30	1/100	1	Dako	б/о	P, Fr
Для исследования опухолеассоциированных антигенов						
RCC/ 66.4.C2/PN-15	45	1/150	1	Abcam	pH9,0	P, Fr
CA-125/M11	45	1/100	1	Dako	pH6,0	P, Fr
CEA/II-7	45	1/50	1	Dako	pH6,0	P, Fr
CDX2	45	1/500	1	Abcam	pH6,0	P, Fr
Для исследования раково-тестикулярных антигенов						
NY-ESO-1/E978	45	1/200	1	Lifespan bioscience	б/о	P, Fr
BAGE/R-15	45	1/300	2	Santa Cruz Biotechnology	б/о	P, Fr
MAGE1/MA5-11338	45	1/50	1	Thermo Fisher Scientific	pH6,0	P, Fr
Для выявления фибробластов						
Anti-fibroblast/ 5B5 <sub>[T1]</sub>	30	1/50	1	DBS	б/о	Fr

*Примечание:* P – парафиновые срезы; Fr – криостатные срезы или препараты фиксированных клеток; б/о – без термической обработки буфером; 1 – DakoCytomation EnVision+ System Labelled Polymer-HRP Anti-mouse; 2 – Dako EnVision+ System HRP Labelled Polymer Anti-rabbit; Tyros/T31 – тирозиназа.

## 2.2.4. Методы проточной цитофлуориметрии

### 2.2.4.1. Определение иммунофенотипа опухолевых клеток

Определение иммунофенотипа опухолевых клеток производили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США) с программным обеспечением BD FACSDiva v8.0.1. Приготавливали клеточную суспензию и отмывали образцы с помощью буфера Stain Buffer кат. № 554656 (BD Bioscience, США) путем центрифугирования на центрифуге «Heraeus Labofuge 400 R» (Thermo Scientific Fisher, ФРГ) при 1500 об/мин в течение 5 мин. Для снижения неспецифического связывания блокировали клеточные Fc-рецепторы, используя реагент Fc Block кат. № 564220 (BD Bioscience, США), в течение 15 мин. Дважды

отмывали клетки в растворе для разбавления клеточной суспензии CellWASH кат. № 349524 (BD Bioscience, США), ресуспендировали осадок в буфере Stain Buffer. Осуществляли фиксацию и пермеобилизацию клеток в течение 15 мин, используя раствор BD Perm/Wash из расчета 250 мкл раствора на  $10^6$  клеток. Отмывали образцы и вносили первичные МКАТ, меченные соответствующими флуорохромами, или использовали немеченные первичные МКАТ с последующей инкубацией со вторичными антителами, меченными флуорохромами (табл. 4). Инкубировали 45 мин, дважды отмывали образцы и подвергали анализу. В качестве контроля использовали соответствующие изотипические антитела. Результат представляли в виде процентного количества клеток, экспрессирующих исследуемые антигены.

Таблица 4 – Характеристика моноклональных и поликлональных антител, использованных для определения иммунофенотипа опухолевых клеток

МКАТ	Флуорохром	мкл/тест
Мышиные против CD309 (VEGFR-2) человека, Clone: 89106, кат. № 560495, BD Bioscience, США	Alexa Fluor® 647	20
Мышиные против CD194 (CCR4) человека, Clone: 1G1, кат. № 563066, BD Bioscience, США	BV510	5
Мышиные против CD197 (CCR7) человека, Clone: 150503, кат. № 562555, BD Bioscience, США	BV421	5
Мышиные против CD304 (Neuropilin-1) человека, Clone: 12C2, кат. № 354514, BioLegend, США	Brilliant Violet 421	5
Мышиные против CD338 (ABCG2) человека, Clone: 5D3/CD338, кат. № 561180, BD Bioscience, США	PE	5
Мышиные против CCR 10 человека, Clone: 6588-5, кат. № 341506, BioLegend, США	APC	5
Мышиные против CD133 (Prominin-1) человека, Clone: TMP4, кат. № 12-1338-42, eBioscience™, Invitrogen, США	PE	5
Мышиные против Ki-67 человека, Clone: B56, кат. № 561165, BD Bioscience, США	Alexa Fluor® 488	5
Мышиные моноклональные антитела против NY-ESO-1 (E978), кат. № 53869, Santa Cruz Biotechnology	–	5
Кроличьи поликлональные антитела против BAGE (R-15), кат. № 19086, Santa Cruz Biotechnology	–	5
Козьи поликлональные антитела против GAGE (N-10), кат. № 138012, Santa Cruz Biotechnology	–	5
Крысиные анти-мышинные антитела, Clone A85-1, кат. № 553443, BD Bioscience, США	PE	5
Мышиные анти-кроличьи антитела, кат. № 45098, Santa Cruz Biotechnology	PerCP	5
Кроличьи анти-козьи антитела, кат. № 2777, Santa Cruz Biotechnology	FITC	5

#### 2.2.4.2. Определение иммунофенотипа дендритных клеток и лимфоцитов

Определяли иммунофенотип дендритных клеток и лимфоцитов на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США) с программным обеспечением BD FACSDiva v8.0.1.

Приготавливали суспензию дендритных клеток или лимфоцитов и отмывали образцы от питательной среды с помощью центрифугирования в центрифуге Heraeus Labofuge 400 R (Thermo Scientific Fisher, ФРГ) при 1500 об/мин в течение 5 мин с использованием буфера Stain Buffer кат. № 554656 (BD Bioscience, США). Для снижения неспецифического связывания блокировали клеточные Fc-рецепторы, используя реагент Fc Block кат. № 564220 (BD Bioscience, США), в течение 15 мин. Дважды отмывали клетки в растворе для разбавления клеточной суспензии CellWASH кат. № 349524 (BD Bioscience, США), ресуспендировали осадок в буфере Stain Buffer. В пробирки для цитофлуориметрического анализа помещали соответствующее количество МКАТ (табл. 5, 6), после чего добавляли по 100 мкл клеточной суспензии, перемешивали при помощи вихревого встряхивателя VWR Signature Digital Vortex Mixer (VWR International, США) 1–3 секунды. Образцы инкубировали в защищенном от света месте в течение 15–30 мин, отмывали от реагентов с помощью раствора для разбавления клеточной суспензии CellWASH и проводили анализ образцов.

Таблица 5 – Характеристика МКАТ, использованных для иммунофенотипирования ДК

Тип МКАТ, BD Bioscience, США	Флуорохром	мкл/тест
Мышиные против CD14, кат. № 345784	FITC	20
Мышиные против CD11c, кат. № 555392	PE	20
Мышиные против CD86, кат. № 561129	PerCP-Cy5.5	5
Мышиные против CD83, кат. № 561132	PE-Cy7	5
Мышиные против CD1a, кат. № 559775	APC	20
Мышиные против CD80, кат. № 561134	APC-H7	5
Мышиные против CD40, кат. № 555589	PE	20
Мышиные против CD209, кат. № 558263	PerCP-Cy5.5	20
Мышиные против CD3, кат. № 561416	V500	5
Мышиные против CD197 (CCR7), кат. № 562555	BV421	5
Мышиные против HLA-DR, кат. № 641411	APC-H7	5

Таблица 6 – Характеристика МКАТ, использованных для иммунофенотипирования лимфоцитов

Тип МКАТ, BD Bioscience, США	Флуорохром	мкл/тест
Мышиные против CD3, кат. № 555332	FITC	20
Мышиные против CD4, кат. № 555347	PE	20
Мышиные против CD8, кат. № 555366, 555367, 345774	FITC, PE, PerCP	20
Мышиные против CD14, кат. № 555397	FITC	20
Мышиные против CD19, кат. № 345777	PE	20
Мышиные против CD25, кат. № 555431	FITC	20
Мышиные против CD38, кат. № 345806	PE	20
Мышиные против CD95, кат. № 561655	PerCP-Cy5.5	5
Мышиные против CD127, кат. № 557938	PE	0,2 мг/мл
Мышиные против HLA-DR, кат. № 347402	PerCP-Cy5.5	20
Мышиные против INF $\gamma$ , кат. № 340449	FITC	20
Мышиные против GranzymeB, кат. № 561142	PE	5



С целью выявления количества живых ДК или лимфоцитов использовали краситель для определения жизнеспособности клеток Fixable Viability Stain 450 кат. № 562247 (BD Bioscience, США). Результат представляли как процентное соотношение популяции живых клеток, экспрессирующих исследуемые антигены, от общего количества исследуемых дендритных клеток или лимфоцитов.

## **2.2.5. Молекулярно-генетические методы**

### **2.2.5.1. Выделение кДНК из образцов культивируемых клеток солидных опухолей**

Экстракция нуклеиновых кислот производилась тризолом и хлороформ-изоамиловым спиртом (24:1). Затем мРНК осаждали изопропанолом в присутствии гликогена, промывали 70% этанолом и растворяли в 10 мкл воды. Полученный раствор РНК использовали для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции.

Обратная транскрипция проводилась в объеме 20 мкл. В состав реакционной смеси входили 10 мкл раствора РНК, 5x буфер для обратной транскриптазы, обратная транскриптаза M-MuLV (Sibenzyme), смесь dNTP (10 mM каждого), случайные гексапраймеры (конц. 10 ое/мл), ингибитор РНКаз (5 МЕ/мкл). Температурный режим обратной транскрипции: 20 °С – 5 мин, 38 °С – 30 мин, 95 °С – 5 мин. В завершение образец растворялся в 60 мкл воды.

Далее образцы были подвергнуты проверке на содержание кДНК необходимого качества. Проверка проводилась путем оценки уровня экспрессии РНК-транскрипта гена SDHA в реакции ПЦР в реальном времени. Во всех образцах показатель Ct SDHA не превышал 32, что свидетельствует о высоком содержании кДНК. Образцы кДНК хранили при -30 °С до использования. Образцы кДНК были приготовлены на базе лаборатории молекулярной онкологии отдела биологии опухолевого роста ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

### **2.2.5.2. Генотипирование по антигенам HLA I класса**

Основным принципом современного молекулярно-биологического анализа для HLA-типирования является гаплотип-специфическая ПЦР-амплификация полиморфных экзонов HLA-генов, с последующим послеамплификационным специфическим определением гипервариабельных регионов для идентификации аллелей. Получившийся ампликон подвергают гибридизации, продукт которой визуализируется фермент-зависимым колориметрическим методом ПЦР-SSP.

Принцип метода основан на использовании сиквенс-специфических детектирующих пар праймеров (sequence specific primers), комплементарных аллелям специфических локусов HLA. При совпадении нуклеотидных последовательностей праймеров со специфическими участками ДНК пациента происходит их отжиг. В присутствии фермента Taq-полимеразы запускается

амплификация. Амплифицированные продукты ДНК визуализируют с помощью электрофореза в агарозном геле. Для последовательного выделения ДНК из клеток использовали стандартный набор Протранс ДНК Box 500 (Protrans medizinische diagnostische Produkte, Germany).

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

### 2.2.5.3. Идентификация экспрессии раково-тестикулярных антигенов

Исследовали кДНК культивируемых клеток солидных опухолей. ПЦР в реальном времени генов *GAGE*, *HAGE*, *NY-ESO1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SLLP1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* проводили с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, подобранных на места слияния экзонов исследуемых генов. Дизайн праймеров и зондов осуществлялся при помощи ресурсов, доступных онлайн по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (табл. 7). Синтез праймеров был произведен компанией «Евроген» (Россия). Синтез флуоресцентных зондов – компанией «ДНК-синтез» (Россия). В качестве референсного использовали контрольный ген *ABL* (назван по имени американского биолога J.N. Abelson), так как он экспрессируется с равной интенсивностью во всех тканях человека. Образцы, в которых экспрессия гена *ABL* оказывалась меньше, чем 105 копий, исключались из анализа, как имеющие неудовлетворительное количество кДНК.

Реакции проводили на ПЦР-амплификаторе «Light Cycler 96» (Roche, Швейцария). РНК выделяли по методу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi (1987) [451]. Выделенную мРНК использовали для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции.

Для каждого образца определяли уровень экспрессии гена *ABL* и 11 изучаемых РТГ. Анализ проводили на ПЦР-амплификаторе «Light Cycler 96» (Roche, Швейцария) в триплетах. В качестве положительного контроля применяли векторы, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, США). Анализ осуществляли на базе лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Таблица 7 – Последовательности праймеров и зондов, используемых для определения экспрессии изучаемых генов

Ген	Праймеры	Зонд
<i>GAGE1</i>	5'-AGCTGCTCAGGAGGGAGAGGAT-3'; 5'-GGTGACCCTGTTCCCTGGCTA-3'	5'-(R6G)- CATCTGCAGGTCAAGGGCCGAAGCCT GAA-(BHQ1)-3
<i>HAGE</i>	5'-GCCACAAGTGCCATGTCAAA-3'; 5'-CCTTCAAGTCATCCCACGTT-3	5'-(R6G)- AGCAGATAGTTGGAGGAAAGAAAAT TTTAA-(BHQ1)-3
<i>MAGEA1</i>	5'-GAAGGAACCTGACCCAGGCT-3'; 5'-AATCCTGTCCTCTGGGTGG-3'	5'-(R6G)- TGTGAGGAGGCAAGGTTTTTCAGGGGA C-(BHQ1)-3'
<i>NY-ESO1</i>	5'-TCTGAAGGAGTTCCTGTGT-3'; 5'-AGACAGGAGCTGATGGAGAG-3	5'-(R6G)- AACATACTGACTATCCGACTGACTGC TGCA-(BHQ1)-3'
<i>PASDI</i>	5'-GTGGGAAATGTTTGCATTCT-3'; 5'-AGCTTCATCACTGACTGCCT-3'	5'-(R6G)- TCAGCTCCTGCAGCAACTTTACACTTC -(BHQ1)-3'
<i>SCPI</i>	5'-AAAAGGAACAGAACAAGAAC-3'; 5'-TGTGGTAATGGCAGTTAACT-3'	5'-(R6G)- CCAAGCCAGAGAGAAAGAAGTACAT GATTT-(BHQ1)-3'
<i>SEMG1</i>	5'-TCCTCATCTTGGAGAAGCAA-3'; 5'-TGGGAAAATTCACTTGGTAA-3'	5'-(R6G)- ATGGGACAAAAAGGTGGATCAAAAG GCC-(BHQ1)-3
<i>SLLP1</i>	5'-ACTTCGGGCTGGACGGATAC-3'; 5'-GCGTTGAAACCGCTTGTGAA-3'	5'-(R6G)- ATACAGCCTGGCTGACTGGGTCTGCC TTGCTTA-(BHQ1)-3'
<i>SPANXA I</i>	5'-GAGGAGCGTCCCCTGTGATT-3'; 5'-AGCAGGTTGCGGGTCTGAGT-3'	5'-(R6G)- AGGCCAACGAGATGATGCCGGAGAC CCCAA-(BHQ1)-3';
<i>SSX1</i>	5'-GTATATGAAGAGAACTATAAGG- 3';5'-TATTACACATGAAAGGTGGG-3'	5'-(R6G)- ATGACTAAACTAGGTTTTCAAAGTCAC C-(BHQ1)-3'
<i>PRAME</i>	5'-TCTTCCTACATTTCCCCGGA-3'; 5'-GCACTGCAGACTGAGGAACTGA-3';	5'-(FAM)- AAGGAAGAGCAGTATATCGCCCAGTT CACC-(Tamra)-3'

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

## 2.2.6. Методы экспериментального моделирования

### 2.2.6.1. Экспериментальное моделирование для изучения подвижности дендритных клеток под влиянием факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, продуцируемых опухолевыми клетками

Создание клеточной модели для изучения подвижности ДК под влиянием различных стимулов включало следующие этапы:

1. Получение культуры незрелых ДК из МНК периферической крови больных МК и определение их иммунофенотипа.

2. Кокультивирование незрелых ДК и клеток МК, продуцирующих разное количество ИСФ и экспрессирующих разное количество ОАА.

ДК и опухолевые клетки высевали в 6-луночные планшеты, содержащие 2-камерные инсерты (Ibidi, ФРГ) в концентрации  $3 \times 10^5$  кл/мл на 70 мкл питательной среды. После прикрепления клеток к субстрату удаляли инсерты и вносили полную питательную среду DMEM/F12, содержащую GM-CSF (72 нг/мл), IL-4 (15 нг/мл) (CellGenix, Германия) и TNF- $\alpha$  (20 нг/мл) (BD, США). Помещали планшеты в систему Cell-IQ для наблюдения методом фазового контраста в течение 22–34 часов. Расстояние между популяциями клеток составляло 500 мкм.

3. Культивирование ДК в присутствии ИСФ IL-10 (1 нг/мл), TGF- $\beta_1$  (10 нг/мл), VEGF-A (50 нг/мл). Концентрации ИСФ были выбраны на основе анализа литературных данных [452; 453].

4. Оценку скорости и направления движения ДК в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ осуществляли с помощью программного обеспечения Cell-IQ® Analyser™ (CM Technologies Oy, Finland).

### 2.2.6.2. Экспериментальное моделирование для изучения эффективности иммунологических синапсов

Создание клеточной модели для изучения эффективности иммунологических синапсов включало следующие этапы (рис. 12):

1. Получение культуры ДК из МНК лейкоцитарного материала или периферической крови больных солидными опухолями.

2. Получение культуры зрелых ДК, активированных РТА<sup>+</sup>опухолевым лизатом.

3. Двухэтапное кокультивирование зрелых РТА<sup>+</sup>активированных ДК с фракцией преимущественно лимфоцитов, выделенных методом адгезии МНК.

4. Анализ методом проточной цитофлуорометрии иммунофенотипа специфически активированных лимфоцитов и выделение  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов путем сортировки клеток с помощью метода негативной магнитной сепарации.

5. Кокультурирование в соответствии с HLA I класса специфически активированных  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов с опухолевыми клетками, выделенными из фрагментов опухоли пациентов.

6. Оценка эффективности взаимодействия специфически активированных  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов с опухолевыми клетками с помощью системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ, клеточного анализатора в режиме реального времени xCelligence и в МТТ-тесте.

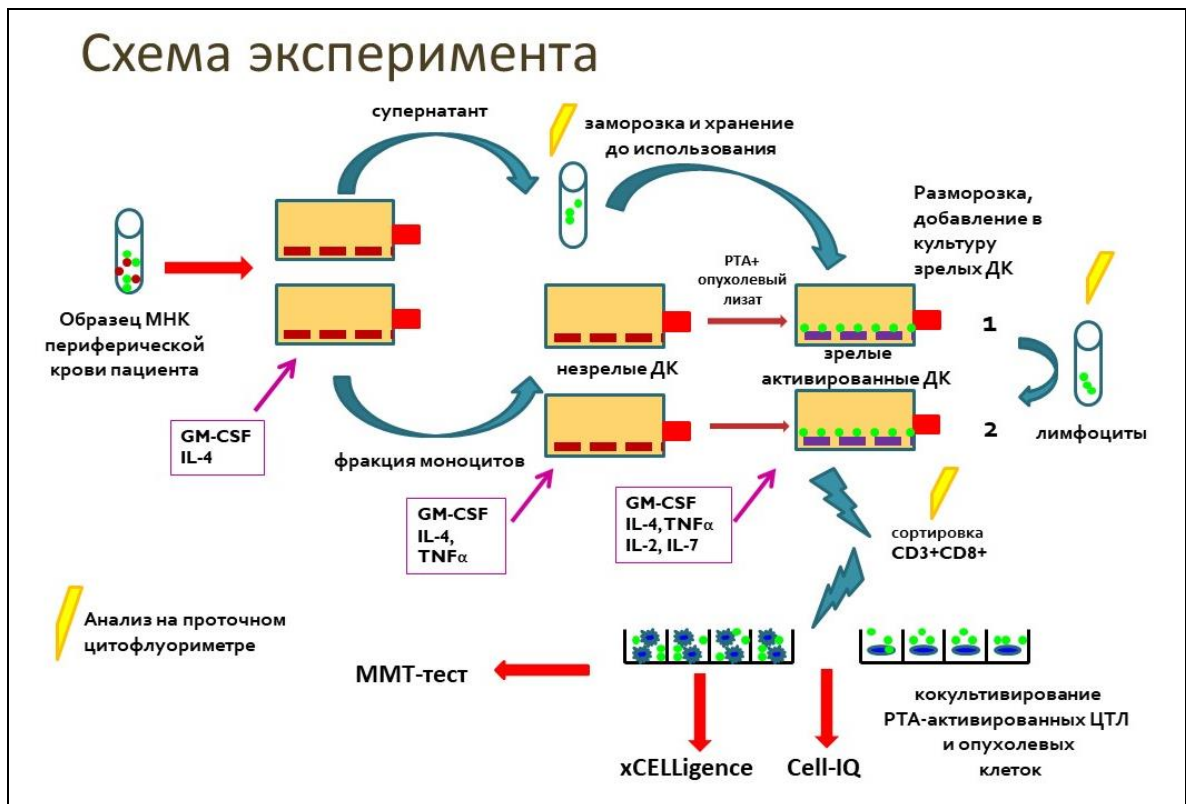


Рисунок 12 – Схема экспериментального моделирования взаимодействия специфически активированных ЦТЛ и опухолевых клеток для оценки эффективности иммунологического синапса

МНК – моноклеарные клетки; ДК – дендритные клетки; РТА – раково-тестикулярные антигены; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

Для анализа эффективности иммунологического синапса в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ опухолевые клетки высевали предварительно в 6-луночные планшеты в количестве  $10-20 \times 10^4$  тысяч на лунку. После адаптации клеток к субстрату вносили активированные ЦТЛ в соотношении 1 оп.кл./10 лимфоцитов, герметизировали планшетку специальной лентой, подключали воздушную смесь, содержащую 5%  $CO_2$  и помещали планшетку в специальную камеру с температурой  $37^\circ C$ . Перед внесением активированных ЦТЛ

с целью более точной идентификации клеток производили их окрашивание флуоресцентным красителем CellVue Claret FAR red (Sigma-Aldrich, США), накапливающимся в липидной области клеточных мембран. Проводили фиксацию изображения клеточной популяции в течение 90 часов. Осуществляли анализ изменения количества распластанных опухолевых клеток в период наблюдения. Оценивали индекс жизнеспособности (ИЖ) опухолевых клеток, представляющий собой отношение количества распластанных клеток в стартовый момент времени наблюдения к количеству распластанных клеток, подсчитанному автоматически в последующий конкретный момент времени наблюдения, выраженному в процентах.

Для оценки эффективности взаимодействия активированных ЦТЛ с опухолевыми клетками в клеточном анализаторе xCelligence опухолевые клетки высевали предварительно в количестве  $2 \times 10^4$  на лунку в планшеты E-16. Оставляли планшеты в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора на 30 мин для минимизации турбулентных потоков жидкости, затем вносили в систему активированные ЦТЛ в соотношении опух.кл./лимф. 1/5, 1/10, 1/50. Помещали планшеты в ячейки прибора и осуществляли регистрацию электрических сигналов в течение 48 часов. На втором этапе эксперимента в качестве клеток мишеней использовали клетки СМТ/ОС с разной эксперсией РТА. Вычисляли процент клеточного лизиса в процессе взаимодействия Т-лимфоцитов и клеток сарком путем соотношения клеточного индекса в экспериментальной системе к таковому в контрольной системе, не содержащей эффекторных Т-клеток [454]:

$$\frac{CI_{\text{опух.кл}} - CI_{\text{опух.кл+ЦТЛ}}}{CI_{\text{опух.кл}}} \times 100.$$

Для оценки жизнеспособности опухолевых клеток методом МТТ в системе кокультивирования с активированными ЦТЛ высевали малигнизированные клетки в 96-луночную планшету в количестве  $5 \times 10^4$ /лунка, затем вносили последовательно активированные ЦТЛ в соотношении 1/4 и инкубировали 12 часов в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Меняли питательную среду в лунках, удаляя суспензионные клетки. Далее вносили реагент МТТ-labeling reagent, инкубировали 4 часа при 37 °С, добавляли SDS на 12 часов при 37 °С и производили анализ на микропланшетном ридере Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo LabSystems Inc., США) при длине волны 620 нм. Оценивали ИЖ, представленный как отношение оптической плотности в опыте и контроле, выраженное в процентах.

### **2.2.6.3. Метод трехмерного клеточного моделирования для изучения свойств опухолевых клеток**

Для создания трехмерных клеточных моделей (сфероидов) использовали метод «висячей капли» и технологию низкоадгезивных поверхностей.

Метод «висячей капли» предполагал культивирование опухолевых клеток в посевной концентрации 1000 кл/кап в каплях объемом 25 мкл полной питательной среды DMEM/F12. Капли помещали на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри, в нижнюю часть чашки заливали стерильный 0,9% раствор NaCl. Чашки Петри были помещены в CO<sub>2</sub>-инкубатор «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °С, во влажной атмосфере с 5% уровнем CO<sub>2</sub> от 3 до 8 суток в зависимости от клеточной линии. По окончании культивирования отбирали супернатанты для последующего анализа. Рисунок 13 иллюстрирует пример гомосфероид, сформированного из клеток МК #226.

Для получения гетеросфероидов, содержащих клетки солидных опухолей и фибробласты легкого эмбриона человека FLECH, имитирующих стромальные элементы злокачественного новообразования, с помощью технологии на низкоадгезивных поверхностях использовали 96-луночные планшеты Ultra-Low Attachment Surface (Corning, США).

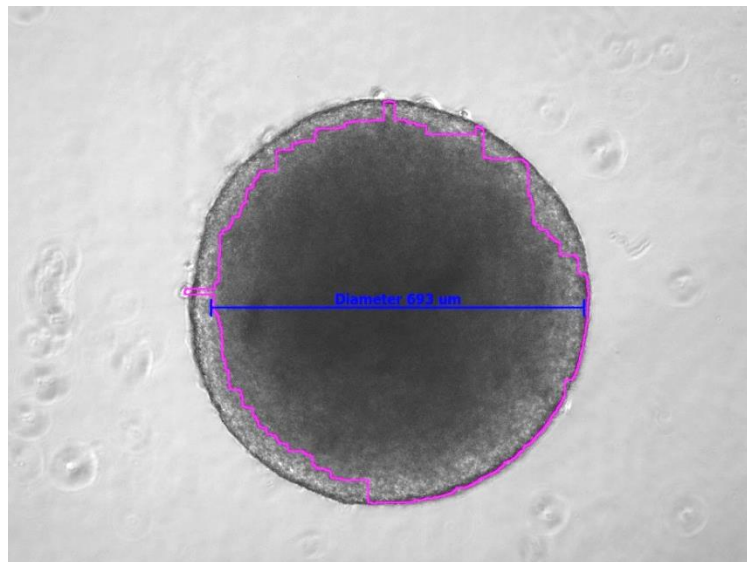


Рисунок 13 – Сфероид, сформированный из клеток культуры МК #226.  
Фазовый контраст, ув. ×100, Cell-IQ

Малигнизированные клетки и фибробласты в различных посевных концентрациях помещали в лунки планшета, содержащие 200 мкл полной питательной среды DMEM/F12. В систему вводили 10, 20 и 30% клеток культуры FLECH на 10<sup>4</sup> опухолевых клеток.

Гетеросфероиды культивировали от 3 до 8 суток в зависимости от клеточной линии аналогично в CO<sub>2</sub>-инкубаторе «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °С, 100% влажности и 5% CO<sub>2</sub>. Раствор матригеля (Corning Matrigel Matrix, США) в объеме 50 мкл переносили в лунки предварительно охлажденного 48-луночного планшета и равномерно распределяли по дну, после чего помещали планшет на 30 мин при температуре +37 °С для полимеризации матригеля. По окончании культивирования гетеросфероиды отмывали

в растворе фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) и помещали в матригель с добавлением полной питательной среды DMEM/F12. Наблюдение за процессом распространения сфероида в матригеле вели с помощью автоматизированной аналитической системы Cell-IQ (СМ Technologies Oy, Финляндия) в течение 96 часов. Анализ изменения занимаемой сфероидом площади и диаметра осуществляли с помощью программного обеспечения Cell-IQ Analyser TM (СМ Technologies Oy, Финляндия), которое позволяет на основе фазового контраста производить процесс количественного измерения пространства, занимаемого клетками.

### **2.2.7. Методы статистического анализа**

Статистическая обработка была проведена с использованием IBM SPSS 23, R v.3.5.2, согласно руководству Everitt B.S., Pickles A. (2004) [455]. Для систематизации и наглядного представления эмпирических данных были использованы основные описательные статистики: среднее значение, минимум, максимум, медиана, среднеквадратическое отклонение, 25-й и 75-й процентиля, межквартильный размах. Для проверки гипотезы о нормальности распределения – критерий Шапиро–Уилка. При исследовании взаимосвязи между номинальными и порядковыми переменными были использованы таблицы сопряженности, анализ которых проводится с помощью критерия хи-квадрат и точного теста Фишера. В случае количественных признаков применяли коэффициент ранговой корреляции rho Спирмана. Определение различий в группах по значениям количественной переменной проводили с помощью t-критерия, U-критерия Манна–Уитни, критерия Вилкоксона, критерия Краскела–Уоллиса (для межгрупповых сравнений применялся апостериорный тест Данна).

Анализ выживаемости был осуществлен на основе процедуры Каплана–Майера. При сравнении кривых выживаемости в группах были использованы логранговый критерий и критерий Гехана. Для оценки взаимосвязи между предикторными переменными и частотой выживаемости – регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса. Проводили также иерархический кластерный анализ (в качестве меры близости выбирается расстояние Манхэттена), результаты которого визуализируются в формате тепловой карты при помощи пакета «gplots» (v.3.0.1.1). Все различия считались статистически значимыми на уровне значимости  $\alpha=0,05$ .



## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Развитие исследований по получению опухолевых клеточных линий имеет долгую историю. Начиная с 1951 года, когда была выделена первая способная к бесконечному росту клеточная линия рака шейки матки HeLa [456], метод культивирования малигнизированных клеток приобрел широкое распространение, так как исследование опухолей животных и человека, адаптированных к росту *in vitro*, дает ряд преимуществ: возможность получать неограниченное количество клеток для любых экспериментов, позволяющих проводить манипуляции с ними и осуществлять контроль способами, невозможными для исследований *in vivo*, изучать специализированные свойства живых клеток в строго контролируемых условиях окружающей среды вне коррелятивных влияний целостного организма. Наконец, существование банков постоянных линий опухолевых клеток создает условия для проведения исследований на идентичном материале, что важно для выработки стандартных подходов к решению ряда проблем в биологии и медицине [248; 457]. Созданию клеточных моделей *in vitro* из фрагментов опухолей больных придается большое значение, так как экспериментальное клеточное моделирование позволяет изучать механизмы, лежащие в основе канцерогенеза и событий на клиническом уровне, таких как терапевтический эффект, резистентность к тому или иному лечебному воздействию, рецидивирование, метастазирование [458–460]. Кроме того, исследования с использованием клеточных линий позволяют производить эффективный первичный скрининг лекарственных средств [461].

Необходимо отметить, что клеточные линии являются важнейшим инструментом в реализации одного из основных гуманных принципов исследований *in vivo*, связанного с уменьшением количества лабораторных животных, используемых во время первичного скрининга лекарств: замена, сокращение и уточнение [462]. В то же время модели, основанные на использовании клеточных линий, демонстрируют упрощение природных явлений, так как они лишены многосторонних связей между различными клеточными популяциями, микроокружением и реакциями на уровне организма [463]. Эти ограничения могут быть частично преодолены путем кокультивирования клеток или создания сложных трехмерных систем, которые лучше имитируют естественное клеточное окружение, сохраняя в то же время контролируемые условия и простоту работы с моделью [464].

В нашем исследовании в культуру были переведены клетки из опухолевых образцов от 465 больных МК, 161 – РП, 121 – СМТ/ОС, 46 – РМЖ, 15 – РПЖ, 55 – РМП, 17 – КРР, 13 – РЯ. Из них адаптировались к адгезионному или суспензионному росту *in vitro* первичные культуры

431 больного МК, 147 пациентов с РП, 114 – СМТ, 45 – РМЖ, 12 – РПЖ, 37 – РМП, 14 – КРР, 7 – РЯ (табл. 8). Наблюдаемые неудачи в культивировании могут быть классифицированы на четыре основные группы:

1) Малое количество опухолевого материала имело критическое значение в основном для работы с образцами РП, РМЖ и РПЖ, которые были представлены материалом биопсий.

2) Малая жизнеспособность и/или низкая пролиферативная активность опухолевых клеток зависели главным образом от количества жизнеспособных опухолевых клеток, выделенных в результате диссоциации, и от индивидуальных свойств клеточной культуры, нуждающейся в создании подложки из белкового матрикса в процессе адаптации. Эти свойства были присущи некоторым образцам МК, РП, СМТ, РМЖ, РМП, КРР, РЯ.

3) Контаминация стромальными клеточными элементами, которые на первых этапах культивирования имели преобладающую пролиферативную активность, была значима в работе с определенными образцами МК, СМТ, РП, РМЖ, РЯ, РМП и РПЖ.

4) Бактериальная контаминация была выражена при манипуляциях с опухолевыми фрагментами МК, РПЖ, и особенно КРР, так как в этом случае удалось получить клеточные культуры только из метастатических образцов.

Выход жизнеспособных опухолевых клеточных культур, полученных путем механической дезагрегации, был максимальным для образцов МК и составил 78,3%, минимальным – для образцов КРР и РМЖ (41,2 и 34,8% соответственно) (табл. 9). Из образцов РП было получено 63,4% культур с хорошими пролиферативными характеристиками и высокой жизнеспособностью, из образцов СМТ/ОС – 61,9%, РЯ – 53,8%, РПЖ – 53,3%, РМП – 41,9%.

Длительное пассирование субкультур злокачественных клеток позволило выделить опухолевые клеточные линии, обладающие стабильными пролиферативными характеристиками: 69 из 364 (18,95%) случаев для МК, 4 из 102 (3,92%) – РП, 24 из 75 (32%) – СМТ, 2 из 16 (12,5%) – РМЖ, 9 из 23 (39,13%) – РМП, 1 из 7 (14,28%) – КРР, 1 из 7 (14,28%) – РЯ (см. табл. 9). Для образцов РПЖ не было получено стабильных клеточных линий в стандартных условиях культивирования. В этой связи следует сказать, что другие исследователи отмечали особенные трудности на пути создания клеточных линий РПЖ, по сравнению с другими типами эпителиальных опухолей, при этом полученные клеточные линии часто не сохраняли свойства исходной опухоли и не могли служить адекватной моделью для воспроизведения реальных клинических ситуаций [465]. В частности, Navone N.M. и соавт. (1997) получили 2 клеточные линии РПЖ из 30 образцов первичных опухолей (6,6%) [466], причем все клеточные культуры РПЖ были получены из материала биопсий, взятых из первичной опухоли, поэтому малое количество выделенных малигнизированных клеток являлось основным препятствием для успешного создания клеточных линий.

Таблица 8 – Результаты дезагрегации образцов опухолей и получения первичных культур малигнизированных клеток

Тип опухоли	Дезагрегация образцов				Первичные культуры				Общий выход, %
	Всего образцов, n	Первичная опухоль, n (%)*	Рецидив, n (%)	Метастаз, n (%)	Всего, n	Первичная опухоль, n (%)**	Рецидив, n (%)	Метастаз, n (%)	
Меланома кожи	465	57 (12,2)	19 (4,1)	389 (83,7)	431	39 (68,4)	15 (78,9)	377 (96,9)	92,68
Саркомы мягких тканей	121	24 (19,9)	29 (23,4)	68 (56,2)	114	21 (87,5)	28 (96,5)	65 (95,6)	94,21
Рак почки	161	140 (86,9)	5 (3,1)	16 (10,0)	147	133 (95,0)	2 (40,0)	12 (75,0)	65,21
Рак молочной железы	46	35 (76,1)	1 (2,2)	10 (21,7)	45	11 (31,4)	0	7 (70,0%)	39,13
Колоректальный рак	17	0	0	17 (100,0)	14	0	0	14 (82,3)	82,35
Рак мочевого пузыря	55	2 (3,6)	53 (96,4)	0	37	1 (50,0)	36 (67,9)	0	67,27
Рак яичников	13	1 (7,8)	4 (30,7)	8 (61,5)	7	1 (100,0)	1 (25,0)	5 (62,5)	53,84
Рак предстательной железы	15	14 (93,3)	0	1 (6,7)	12	11 (78,6)	0	1 (100,0)	80,0
Всего	893	276	108	509	807	175 (63,4)	79 (73,1)	422 (82,9)	90,36

Примечание: \* – процент от общего числа образцов опухоли. \*\* – процент от числа данного типа образцов (первичная опухоль, рецидив, метастаз).

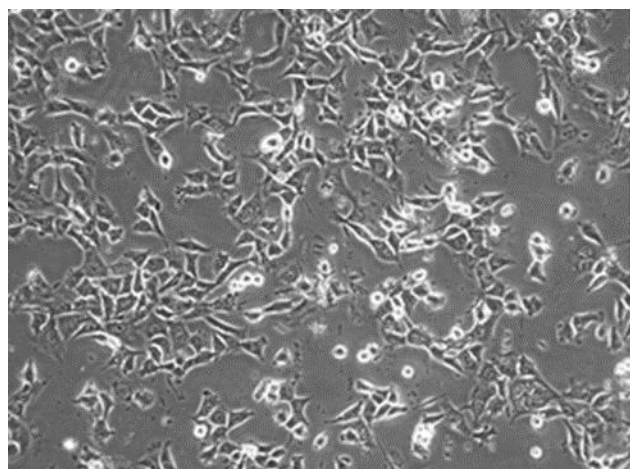
Таблица 9 – Результаты длительного культивирования клеток солидных опухолей

Параметры	Меланома кожи	Саркомы мягких тканей	Рак почки	Рак молочной железы	Колорек- тальный рак	Рак мочевого пузыря	Рак яичников	Рак предста- тельной железы
Адаптация к росту <i>in vitro</i> n (%)*	364 (78,3)	75 (61,9)	102 (63,4)	16 (34,8)	7 (41,2)	23 (41,9)	7 (53,8)	8 (53,3)
<5 пассажей	99	75	63	15	3	23	6	8
5–10 пассажей	157	68	29	7	4	10	4	4
<40 пассажей	154	61	15	2	3	9	1	2
≥40 пассажей (клеточные линии)	69	24	4	1	1	9	1	0
Неудачи в культивировании: n (%)*	101 (21,7)	46 (38,1)	45 (36,6)	30 (65,2)	10 (58,8)	32 (58,1)	6 (46,2)	7 (46,6)
1. Малое кол-во опухолевого материала	18	12	12	20	2	7	0	0
2. Малая жизнеспособность или низкая пролиферативная активность опухолевых клеток	60	13	25	8	3	15	5	0
3. Контаминация стромальными элементами	9	18	5	2	0	10	1	4
4. Бактериальная контаминация	14	3	3	0	5	0	0	3
Выход клеточных культур после 5 пассажа, %**	43,1	90,6	28,4	43,8	57,1	43,5	57,1	50,0
Выход стабильных клеточных линий (≥40 пассаж), %**	18,95	32,0	3,92	12,5	14,28	39,13	14,28	0

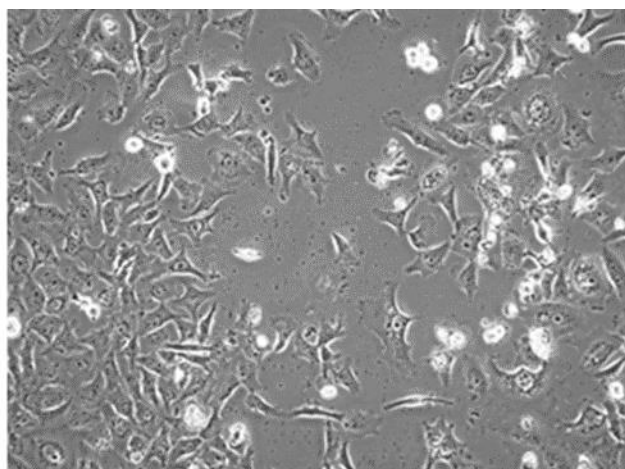
Примечание: \* – процент по отношению к числу образцов опухоли. \*\* – процент по отношению к числу первичных культур, прошедших адаптацию *in vitro*.

Морфологически все полученные культуры опухолевых клеток отличались высокой гетерогенностью, в том числе в пределах одного гистологического типа. Адгезионные культуры МК демонстрировали наиболее выраженное разнообразие морфологических типов, включая фибробластоподобную, веретеновидную, эпителиоидную, звездчатую, полигональную, округлую форму клеток (рис. 14). Культуры РП также характеризовались значительным разнообразием морфологии, но эпителиоидная форма клеток с формированием пласта «булыжной мостовой» была преобладающей (рис. 15). Кроме того, в начале пассирования культуры, полученные из светлоклеточного почечно-клеточного рака, имели значительное количество крупных округлых или полигональных клеток с зернистой цитоплазмой и достаточно низким ядерно-цитоплазматическим отношением. Культуры, полученные из других опухолей эпителиального происхождения (РМЖ, РПЖ, РМП, КРР, РЯ), демонстрировали полигональные, округлые и/или фибробластоподобные морфологические типы клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, клоногенным типом роста и формированием симпластов (рис. 16–19).

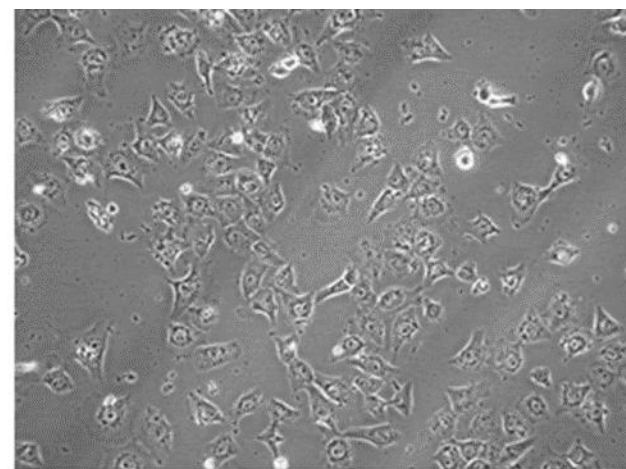
Морфология культур клеток СМТ/ОС характеризовалась особенной вариабельностью, что коррелировало с разнообразием гистологических типов (рис. 20). Культуры хондро-, рабдо- и лейомиосарком были представлены преимущественно фибробластоподобными, сильно вытянутыми веретеновидными клетками. В культурах липосарком наблюдали более мелкие полигональные клетки, в культурах синовиальных сарком могли обнаруживаться как сильно вытянутые клетки, так и полигональной отростчатой формы. Фибросаркомы имели клетки с сильно волокнистой цитоплазмой исчерченной структуры или были представлены фибробластоподобными клетками, но во всех случаях морфология опухолевых клеток в структуре ткани и в культуре была различна. В дальнейшем, в процессе пассирования происходила унификация морфологии, независимо от исходного гистологического типа опухоли, когда все культивируемые опухолевые клетки имели преобладающую фибробластоподобную или полигональную форму с крупным ядром и мелкими отростками. Из всех образцов опухолей только клетки МК обладали адгезионным, полусуспензионным и суспензионным типами роста культуры, то есть в ряде случаев проявляли субстрат-независимый характер роста. В случае полусуспензионного типа роста использование культуральной посуды с покрытием из желатина, коллагена или фибронектина усиливало адгезивные свойства клеток меланом. Среди образцов РП было получено 12 суспензионных культур, но эти культуры характеризовались крайне низкой пролиферативной активностью и не представляли интереса в контексте создания клеточных линий. Среди культур РМЖ один образец демонстрировал суспензионный тип роста, когда культивируемые опухолевые клетки спонтанно формировали сфероиды: шарообразные конгломераты до 30–50 клеток (см. рис. 20).



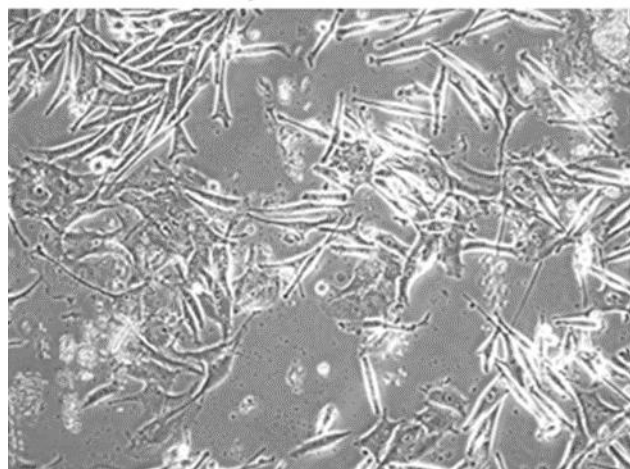
#226, 25 пассаж



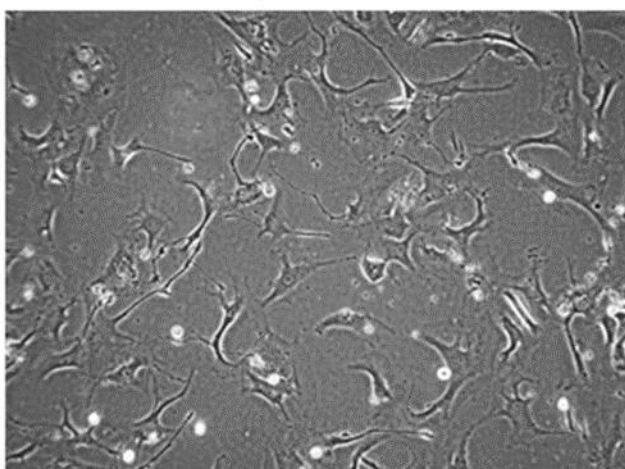
#515, 44 пассаж



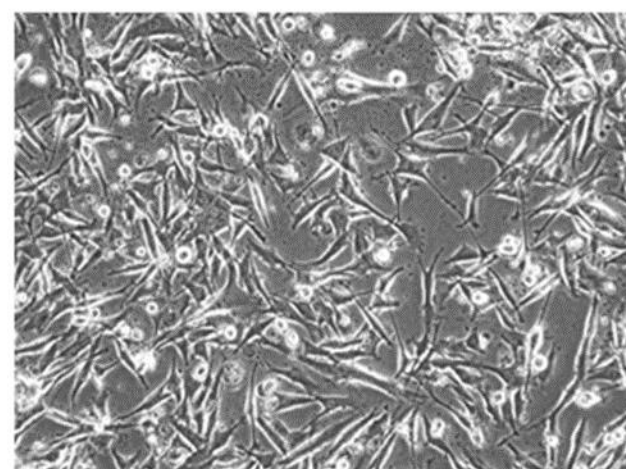
#519, 46 пассаж



#694, 10 пассаж

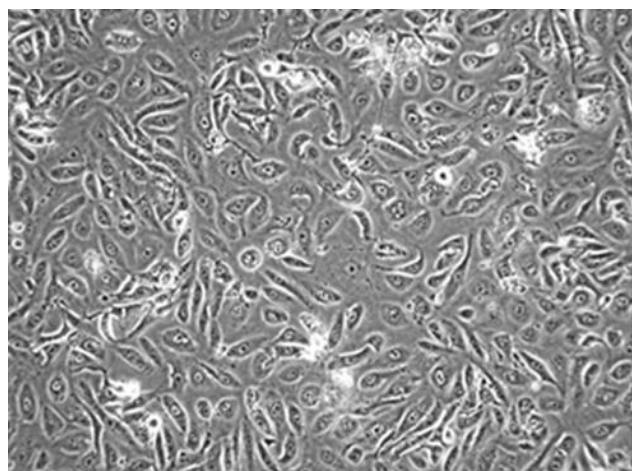


#719, 15 пассаж

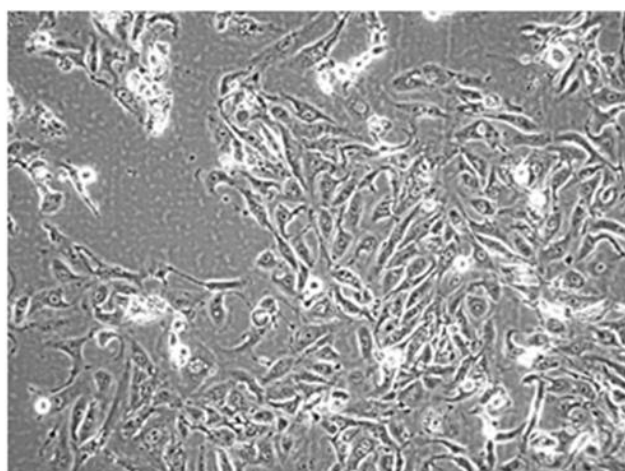


#912, 11 пассаж

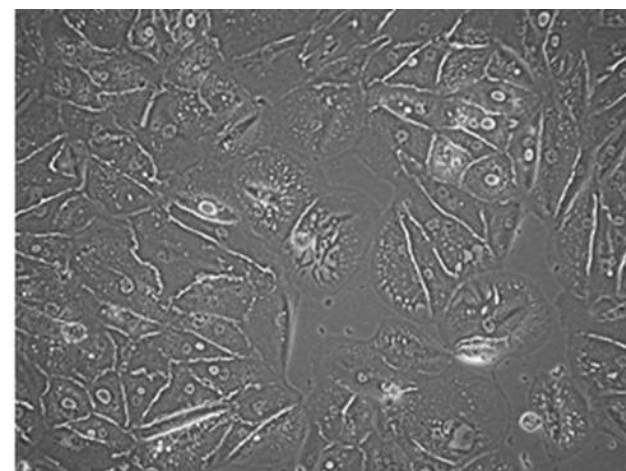
Рисунок 14 – Гетерогенность морфологии культивируемых клеток меланомы кожи.  
Инвертированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$



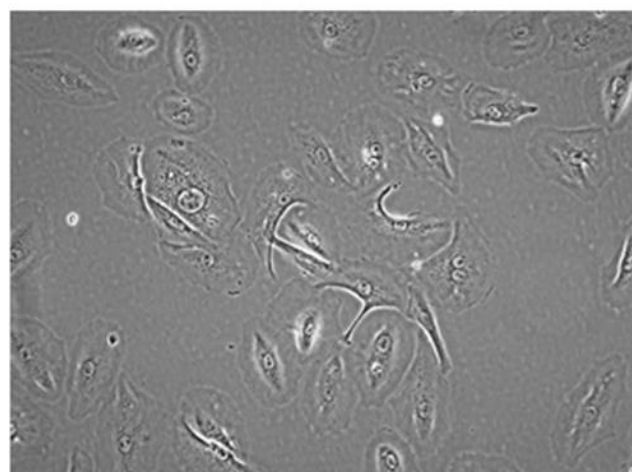
#291, 69 пассаж



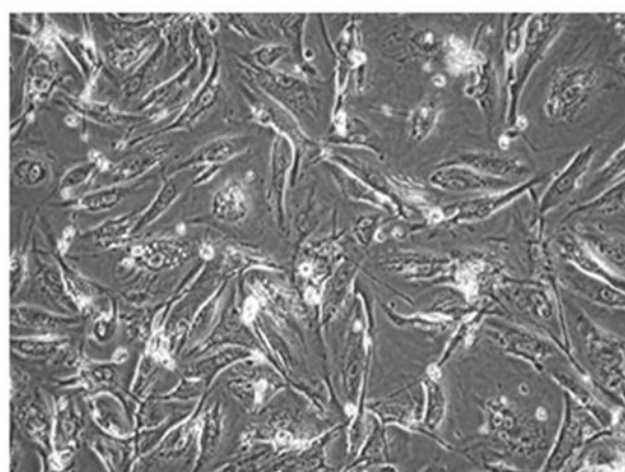
#584, 40 пассаж



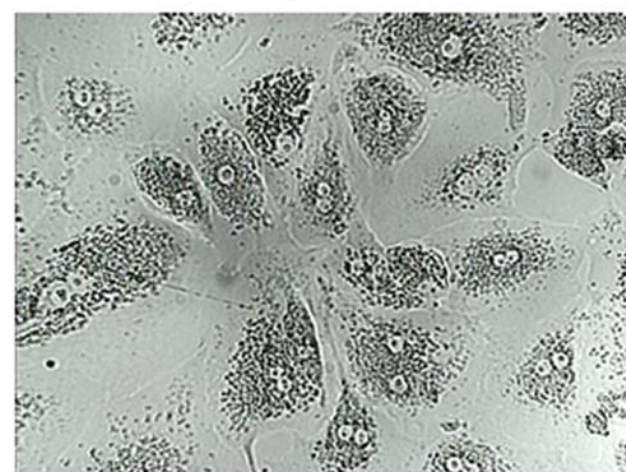
#864, 5 пассаж



#276, 15 пассаж



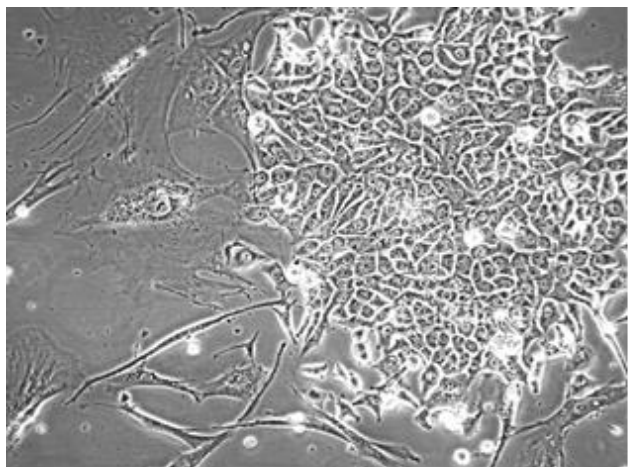
#828, 8 пассаж



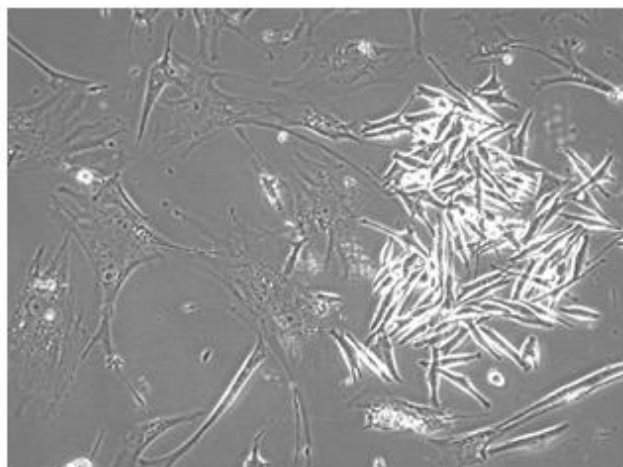
#266, 10 пассаж

Рисунок 15 – Гетерогенность морфологии клеток рака почки, светлоклеточный вариант.

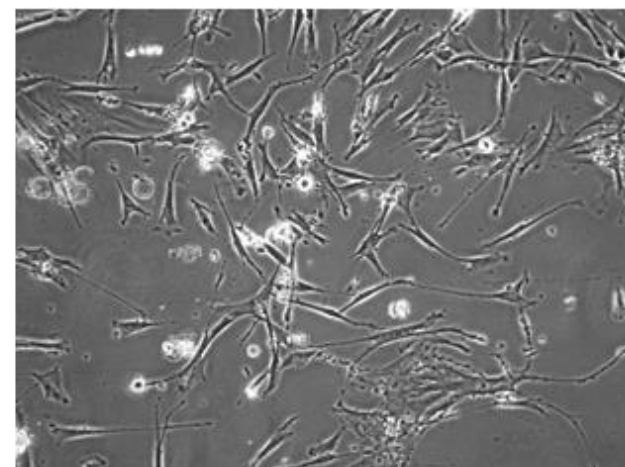
Инвертированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$ .



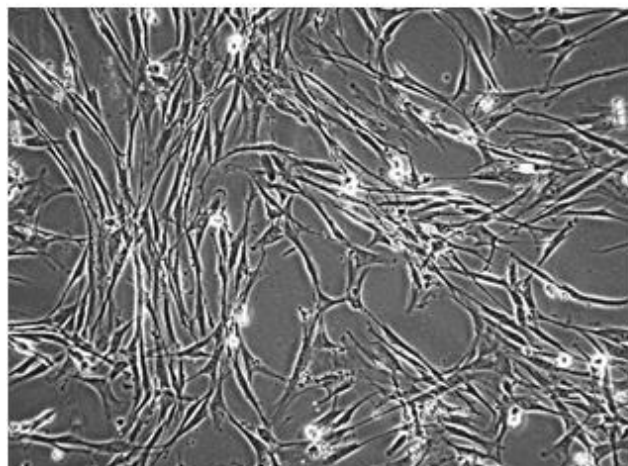
#485, 12 пассаж



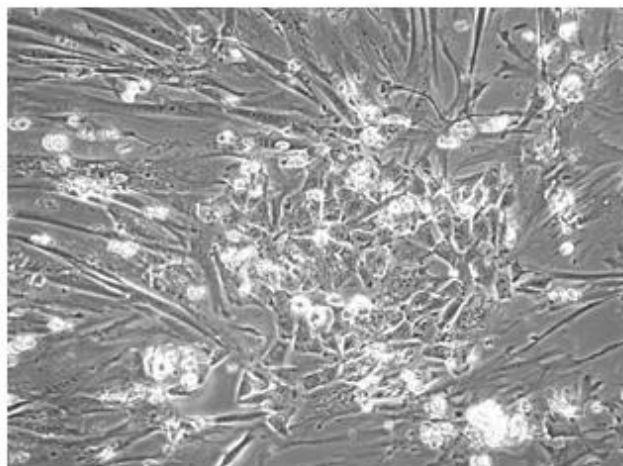
#502, 2 пассаж



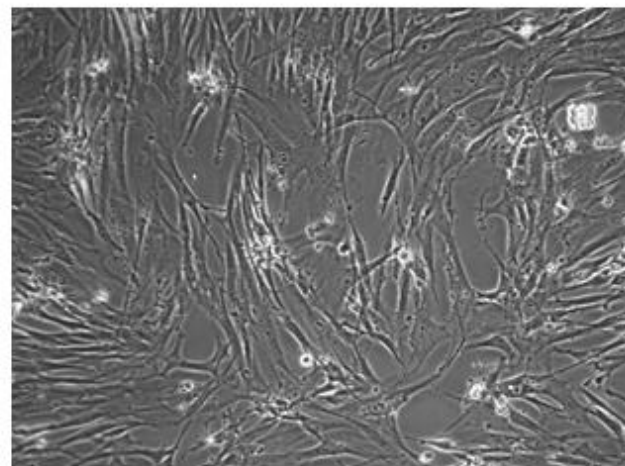
#995, 13 пассаж



#1018, 8 пассаж



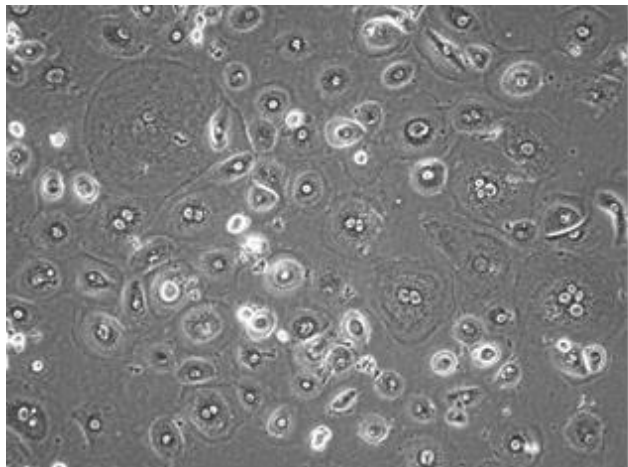
#270, 8 пассаж



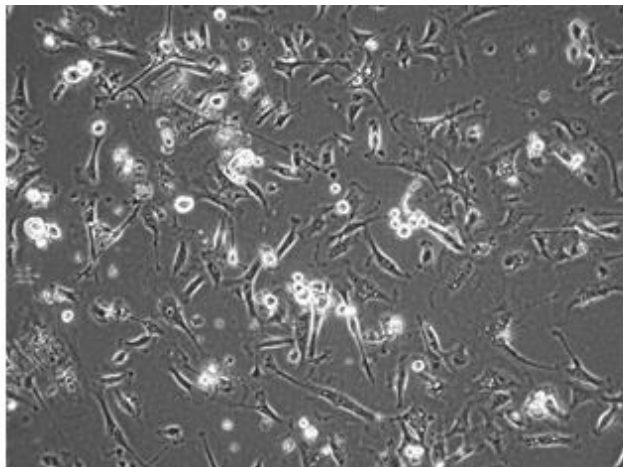
#1002, 7 пассаж

Рисунок 16 – Различный тип роста клеток колоректального рака.  
Инвертированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$

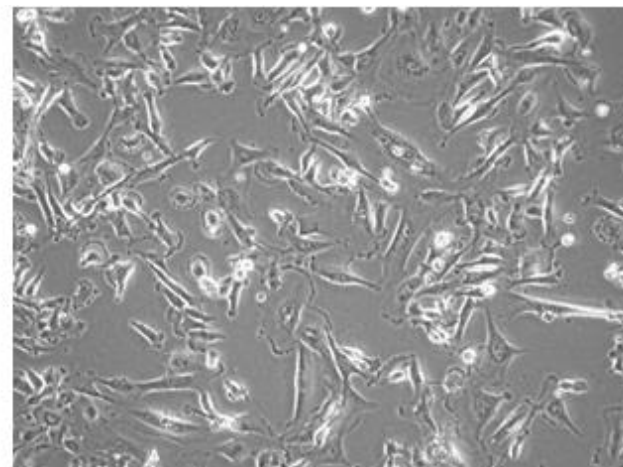




#533, 6 пассаж

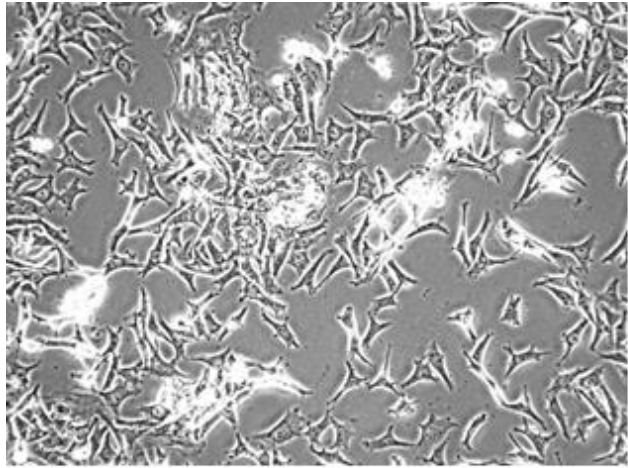


#832/2, 3 пассаж

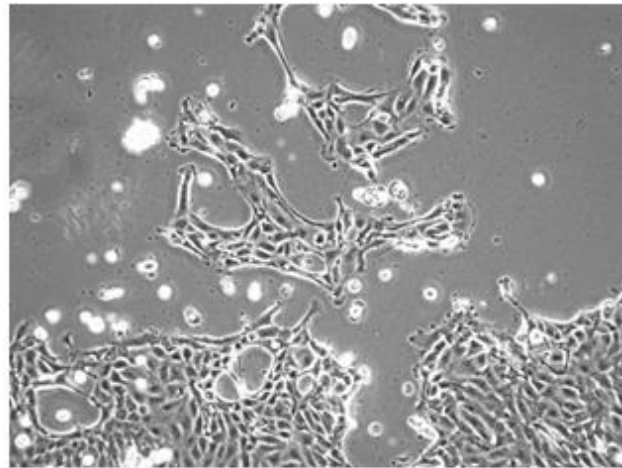


#880/2, 5 пассаж

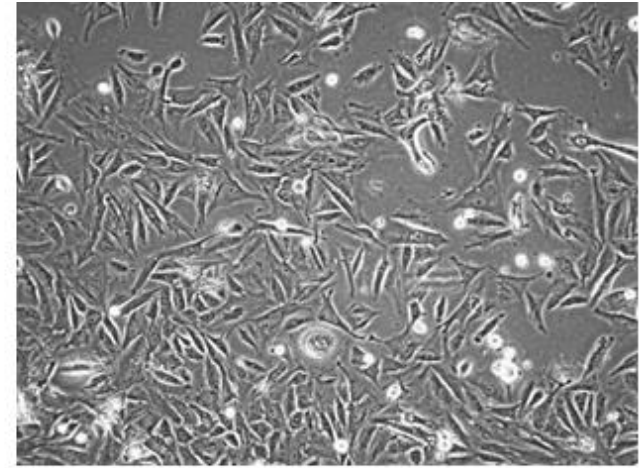
Рисунок 17 – Гетерогенность морфологии клеток рака яичников.  
Инвертированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$



#847, 2 пассаж

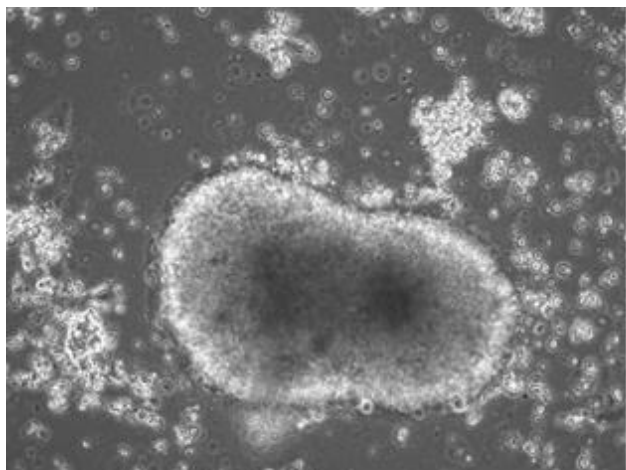


#849, 2 пассаж

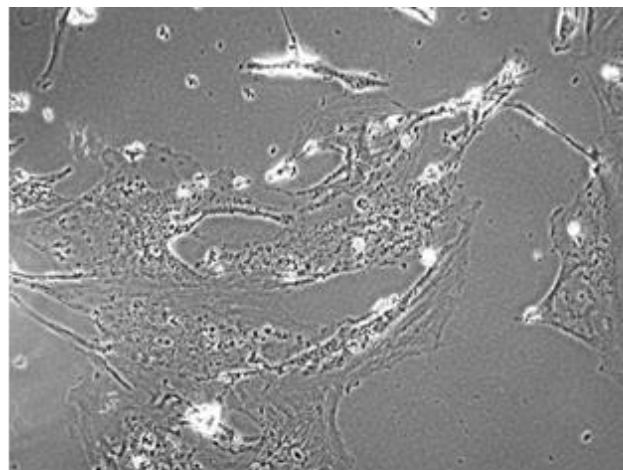


#874, 4 пассаж

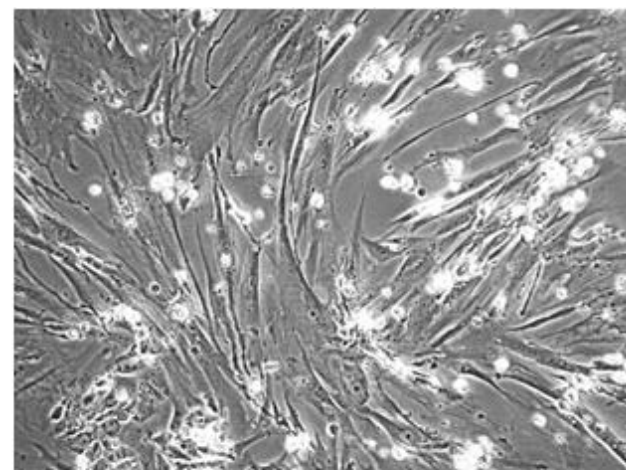
Рисунок 18 – Гетерогенность морфологии клеток рака мочевого пузыря.  
Инвертированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст. ув.  $\times 100$



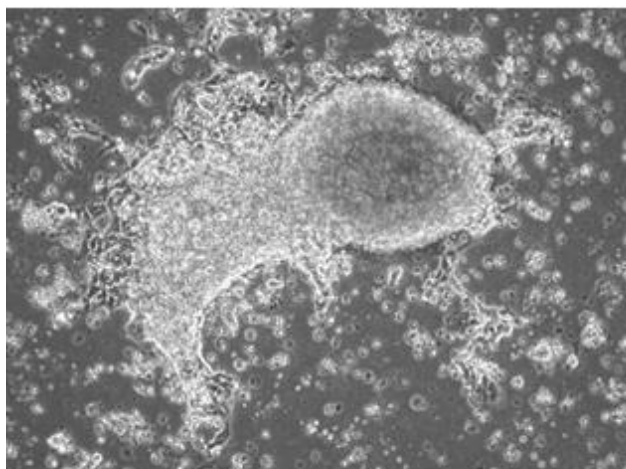
#973, 24 пассаж



#1035, 5 пассаж

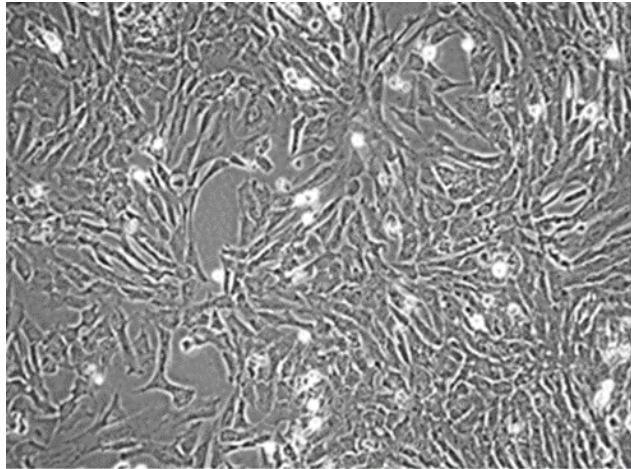


#704, 5 пассаж

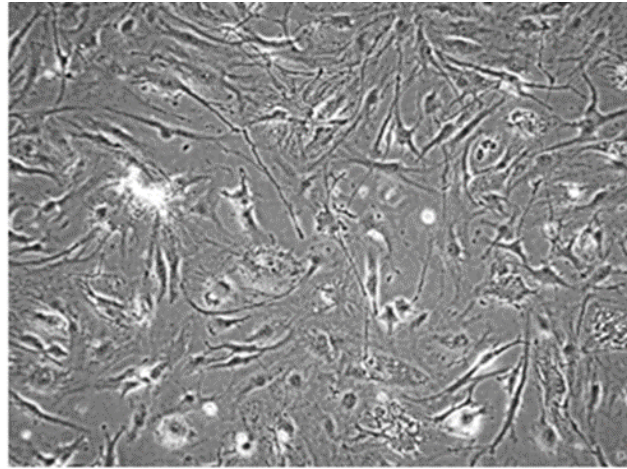


#973, 25 пассаж

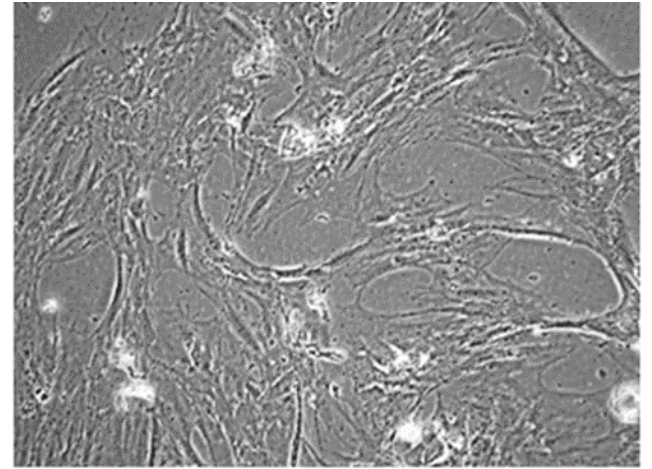
Рисунок 19 – Различный тип роста культур рака молочной железы.  
Инвертированный микроскоп Cell-IQ;  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$



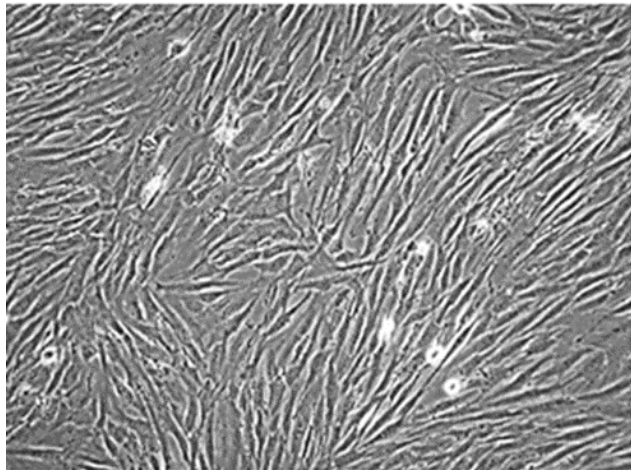
#716 синовиальная саркома, 25 пассаж



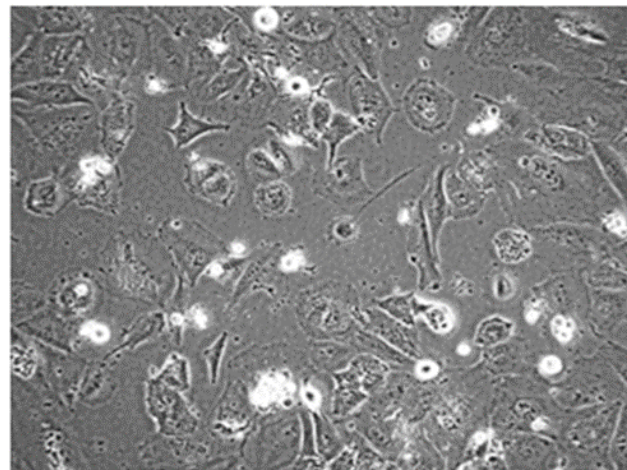
#678 миксофибросаркома, 29 пассаж



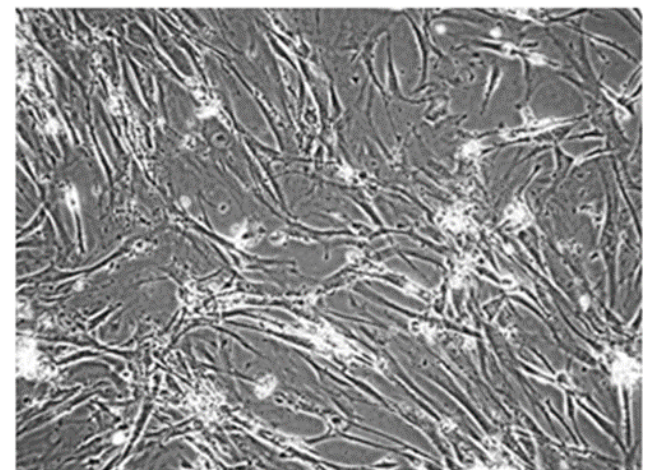
#739 хондросаркома, 11 пассаж



#862 рабдомиосаркома, 13 пассаж

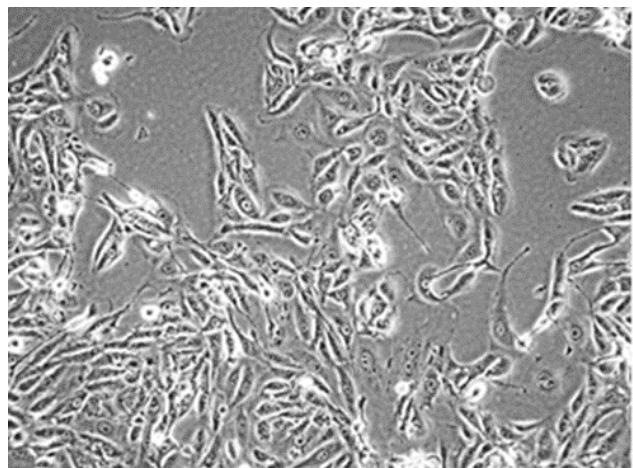


#921 остеосаркома, 2 пассаж

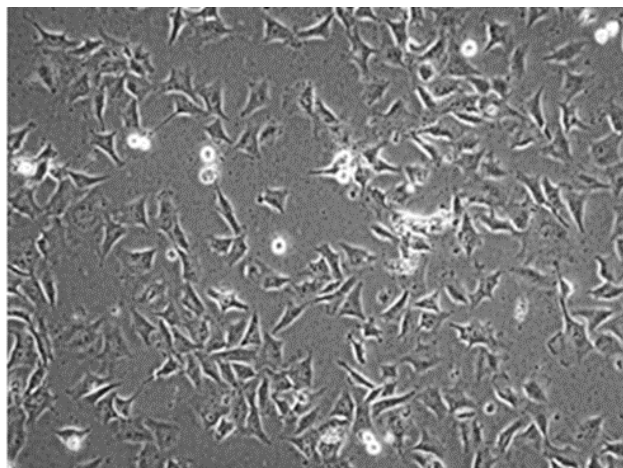


#699 лейомиосаркома, 16 пассаж

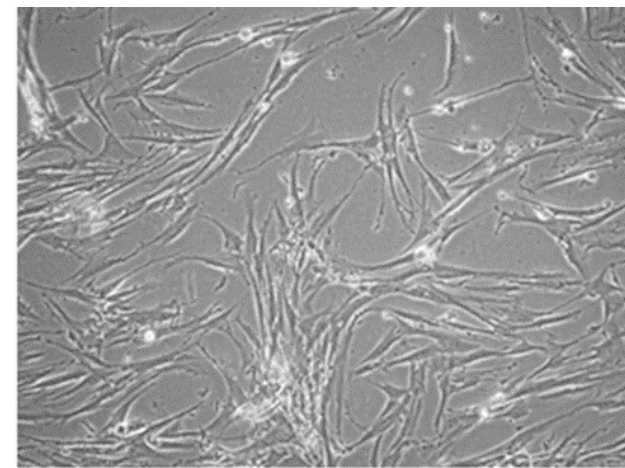
Рисунок 20 (начало) – Гетерогенность морфологии культур сарком мягких тканей разных гистологических типов.  
Инвертированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$



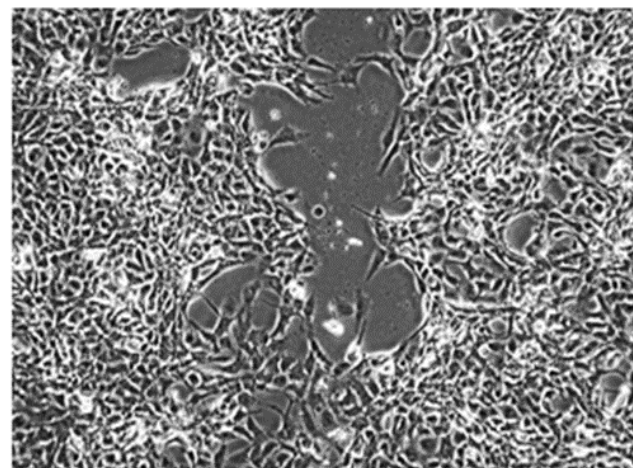
#702 липосаркома, 22 пассаж



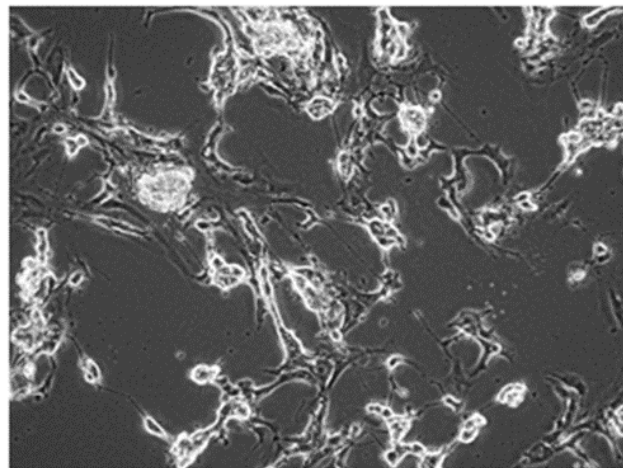
#705 дерматофибросаркома, 22 пассаж



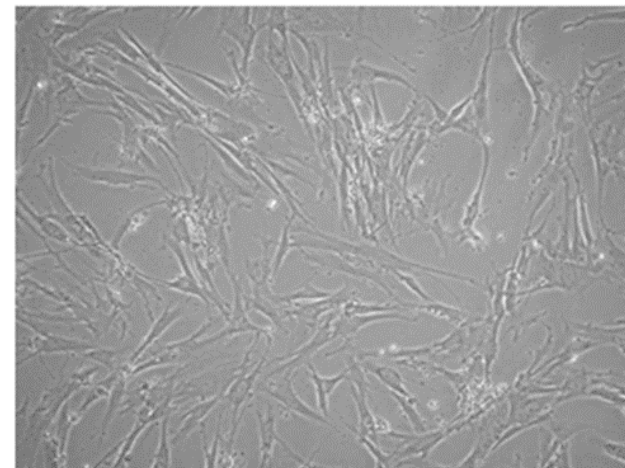
#947 ангиосаркома, 4 пассаж



#927 альвеолярная саркома, 10 пассаж



#782 светлоклеточная саркома,  
14 пассаж



933 веретено- и полиморфноклеточная  
саркома, 13 пассаж

Рисунок 20 (окончание) – Гетерогенность морфологии культур сарком мягких тканей разных гистологических типов.  
Инvertированный микроскоп Cell-IQ,  
фазовый контраст, ув.  $\times 100$

Культуры, полученные из образцов других солидных опухолей, имели исключительно адгезионный тип роста, что было особенно выражено в случае РМП.

При использовании дифференциального окрашивания клеточных органелл и конфокальной микроскопии было обнаружено, что культивируемые клетки МК, СМТ/ОС и ЭО имели хорошо организованный актиновый цитоскелет, при этом часто актин локализовался около мембраны (рис. 21). Характерной особенностью опухолевых клеток было также присутствие значительного количества митохондрий и лизосом, что может указывать на высокую метаболическую активность и активацию механизмов аутофагии.

Как известно, в процессе получения первичных культур клеток путем дезагрегации тканевых фрагментов происходит нарушение естественных связей между клетками, составляющими структуру ткани, что вызывает метаболические изменения, в том числе связанные с митотическим циклом. Адаптация опухолевых клеток к росту *in vitro* во многом зависит от способа дезагрегации, который должен быть выбран в соответствии с гистогенетическим типом опухоли, с учетом объема опухолевой массы, наличия некротических образований, плотности материала [437; 467].

Ранее в наших исследованиях анализ различных способов выделения моноклеточной суспензии из фрагментов опухолевой ткани позволил стандартизировать процесс дезагрегации путем применения метода автоматического механического измельчения ткани и питательной среды, обогащенной СЭКРС, с добавлением инсулина, трансферрина и селена [438; 468]. Использование стандартизованного метода выделения опухолевых клеток показало его достаточную универсальность с хорошим выходом жизнеспособных первичных клеточных культур.

Длительное время результаты исследований условий выделения клеток солидных опухолей демонстрировали значительные трудности, связанные с успешной адаптацией роста злокачественных клеток *in vitro*. В крупномасштабном исследовании, охватывающем 498 попыток создать клеточные линии РП, только 63 имели успех (12%) [469]. Anglard P. и соавт. (1992) сообщили, что смогли получить культуры РП из 75% тканевых фрагментов, однако в дальнейшем большинство субкультур МК и РП удавалось пассировать не более 1–3 раз [470]. Dillman R.O. и соавт. (2000, 2001) в аналогичных исследованиях получили культуры МК в 64% случаев, РП – в 84,6% случаев [471; 472]. Trojaneck V. и соавт. (2000) получили и характеризовали первичные культуры почечно-клеточной карциномы из опухолевых фрагментов только для 26,4% больных [473]. Nareyeck G. и соавт. (2009) сообщили о создании 6 долгосрочных клеточных линий увеальной меланомы из 128 образцов, отметив, что гистопатологические особенности опухолей не имели предиктивной ценности для успешного культивирования [474].

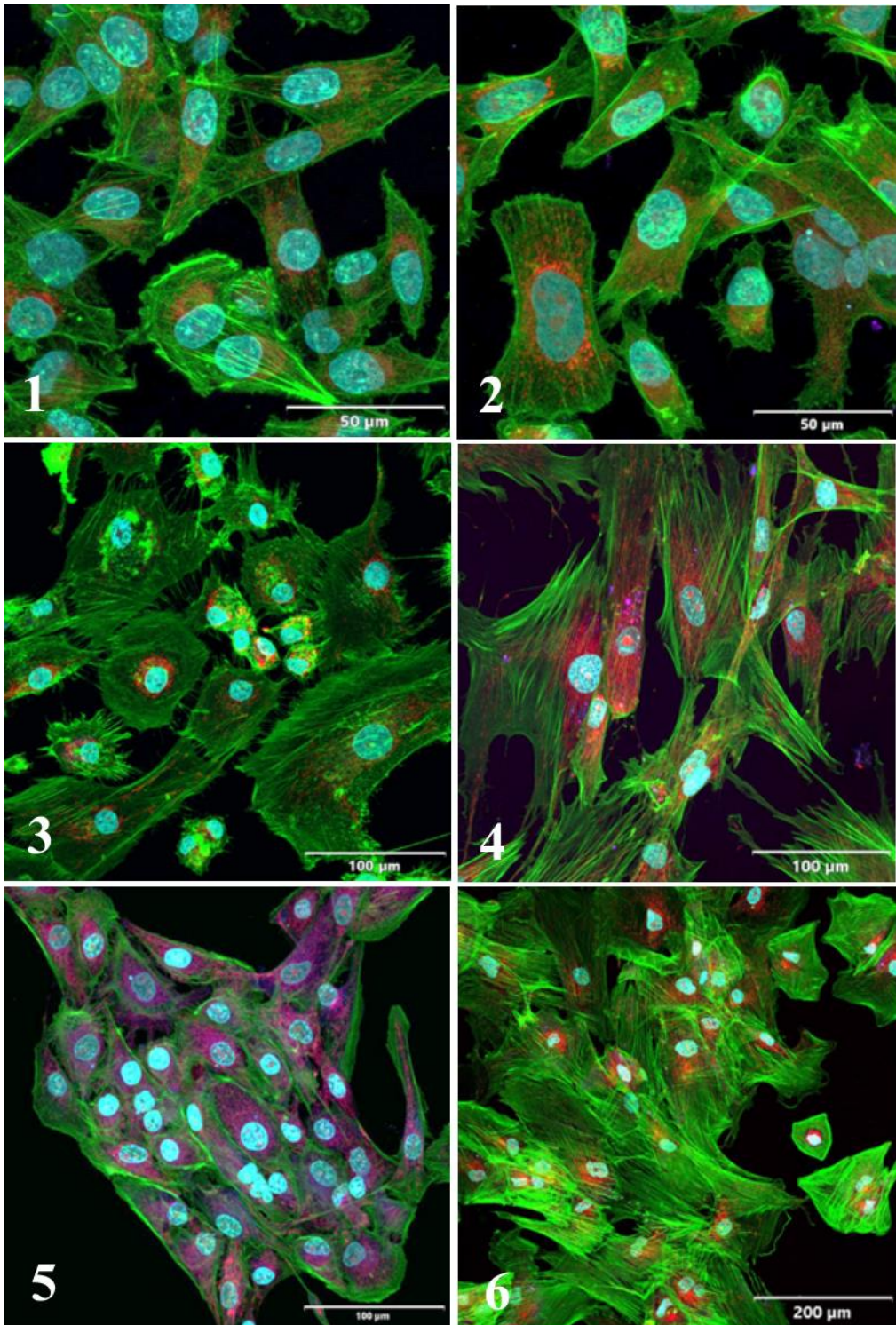


Рисунок 21 (1–6) – Морфология культивируемых клеток солидных опухолей, выявляемая с помощью конфокальной микроскопии: 1 – культура клеток МК #226, 40 пассаж; 2 – культура клеток МК #369, 60 пассаж; 3 – культура клеток миксофибросаркомы #678, 11 пассаж; 4 – культура клеток лейомиосаркомы #699, 16 пассаж; 5 – культура клеток липосаркомы #702, 10 пассаж; 6 – культура клеток альвеолярной саркомы #726, 6 пассаж.

Флуоресцентный конфокальный микроскоп.

■ – ядра (DAPI); ■ – актиновый цитоскелет (Alexa Fluor 488);

■ – митохондрии (Alexa Fluor 555); ■ – лизосомы (Alexa Fluor 647)

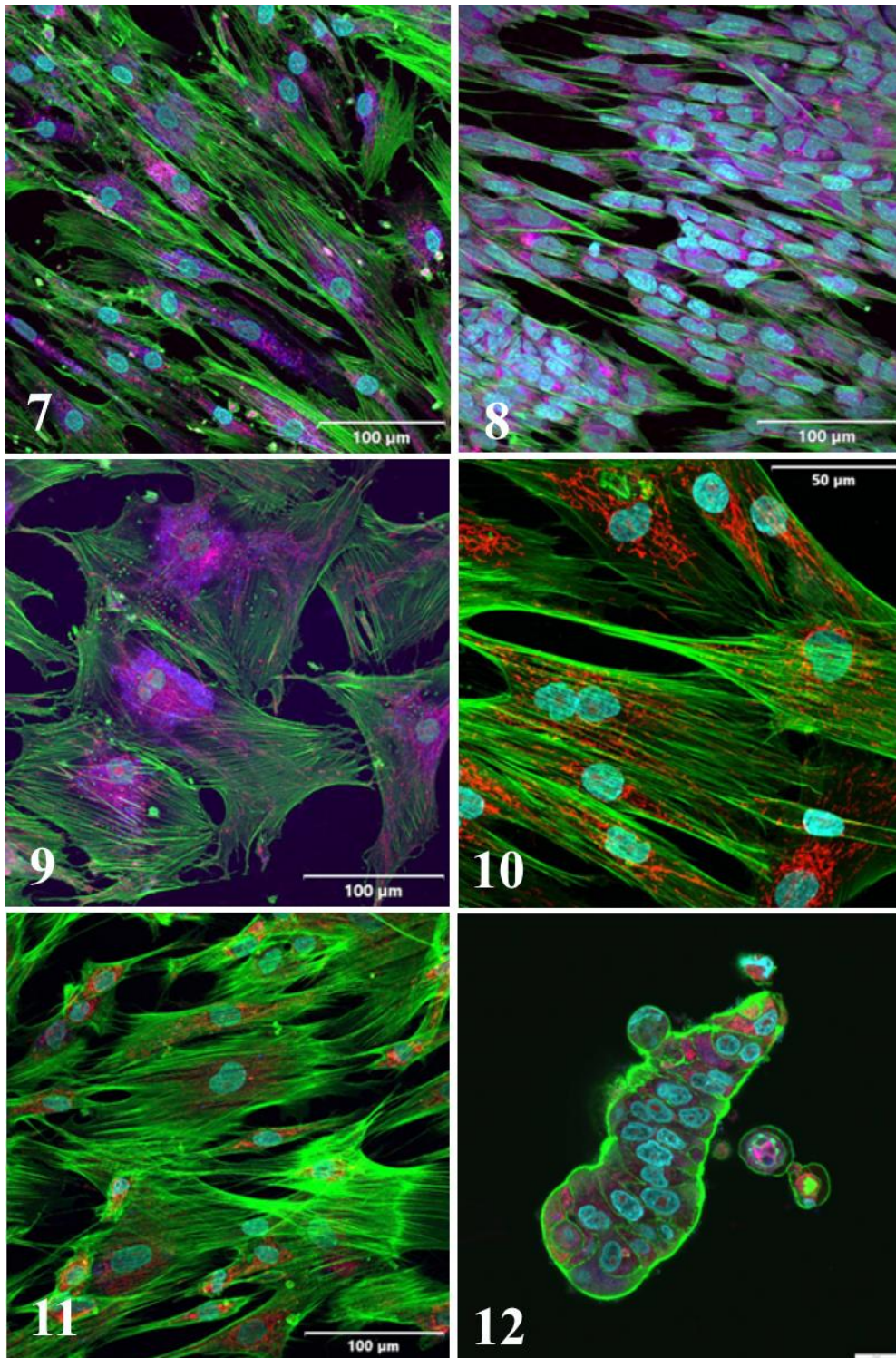


Рисунок 21 (7–12) – Морфология культивируемых клеток солидных опухолей, выявляемая с помощью конфокальной микроскопии: 7 – культура клеток хондросаркомы #739, 5 пассаж; 8 – культура клеток синовиальной саркомы #763, 10 пассаж; 9 – культура клеток остеогенной саркомы #793, 21 пассаж; 10 – культура клеток остеогенной саркомы #1030, 11 пассаж; 11 – культура клеток синовиальной саркомы #859, 6 пассаж; 12 – культура клеток КРР #1098, 15 пассаж.

Флуоресцентный конфокальный микроскоп.

■ – ядра (DAPI); ■ – актиновый цитоскелет (Alexa Fluor 488);  
 ■ – митохондрии (Alexa Fluor 555); ■ – лизосомы (Alexa Fluor 647)



Тан Х. и соавт. (2013) получили две клеточные линии РП, обладающие различным метастатическим потенциалом, и сделали вывод, что образцы метастатической опухоли являются предпочтительными для перевода малигнизированных клеток в культуру [475]. В настоящее время во всем мире получена и используется в качестве клеточных моделей 121 клеточная линия СМТ/ОС, происходящая из интраоперационных опухолевых образцов 21 гистологического подтипа, несмотря на то, что классификация подтипов СМТ/ОС насчитывает более 50 разновидностей [476]. Dai X. и соавт. (2017) анализировали свойства и условия получения 84 клеточных линий РМЖ, созданных, начиная с 1958 года, при этом авторы отмечали значительные трудности в выделении жизнеспособных малигнизированных клеток из стромы опухоли и в длительном пассировании клеточных культур [477].

Публикации последних лет посвящены в основном созданию отдельных клеточных линий солидных опухолей разных локализаций, пригодных для экспериментального клеточного моделирования [478–481].

В нашем исследовании количество культур опухолевых клеток, адаптированных к росту *in vitro* составило 67,41% от общего количества образцов солидных опухолей, подвергнутых автоматической механической дезагрегации. Таким образом, результаты по культивированию клеток солидных опухолей и созданию клеточных моделей сопоставимы с результатами, полученными другими исследователями, и позволяют проводить исследования свойств малигнизированных клеток *in vitro*.

Приготовление клеточных линий солидных опухолей, обладающих стабильными ростовыми характеристиками, значимо для моделирования реальных клинических ситуаций в исследованиях *in vitro* в качестве первого этапа предклинических испытаний. В исследовании Anglard P. и соавт. (1992) стабильно пролиферирующие субкультуры, которые прошли более 5 пассажей и являлись «кандидатами» в клеточные линии, составили 11,3% – для МК и 8,2% – для РП, что совпадает с данными других авторов более ранних работ [469; 470; 482–484]. Совершенствование технологий культивирования малигнизированных клеток способствовало увеличению продуктивности исследований: если в 1973 году сообщалось о создании менее 1% долгосрочных клеточных культур солидных опухолей [482], то в 2016 году Salawu A. и соавт. сообщили о получении 14,8% (47/7) клеточных линий СМТ [485]. Исследование Krbal L. и соавт., опубликованное в 2017 году, посвящено выделению первичных культур КРР, где из 33 образцов первичной опухоли и 20 образцов метастазов в лимфатических узлах было получено в целом 27 культур опухолевых клеток (50,9%) [458]. Yар N.Y. и соавт. (2019) сообщили о создании клеточных линий РП в 21,6% случаев (11 из 51) [486]. Интересно, что некоторые разработки клеточных тест-систем базируются на применении первичных культур опухолевых клеток, в частности, о подобных исследованиях сообщается в работе De Vita A.

и соавт. (2018), которые предложили использовать 14-дневные культуры СМТ для уточнения патоморфологического диагноза и тестирования химиотерапевтических препаратов [487]. Lobo N.C. и соавт. (2016) предложили использовать первичные культуры РП для разработки новых методов лечения и подходов персонализированной медицины для данной категории больных [488]. Однако более детальное изучение полученных первичных культур РП показало, что в большинстве образцов содержались клетки нормального почечного эпителия, что потребовало разработки дополнительных методов обогащения культуры опухолевыми клеточными элементами. Клетки нормальных неизмененных тканей, стромальные клетки, эндотелиоциты, клетки крови и иммунной системы неизбежно присутствуют в клеточной суспензии, полученной в результате дезагрегации тканевых фрагментов злокачественных новообразований, и находятся в первичных культурах опухолевых клеток. В процессе культивирования непролиферирующие и нетрансформированные клетки элиминируются естественным образом, поэтому долгоживущие малигнизированные клеточные культуры предпочтительнее как клеточные модели.

Таким образом, можно полагать, что успешное культивирование и создание линий клеток солидных опухолей было реализовано в нашем исследовании достаточно полно: после дезагрегации опухолевых образцов выход первичных культур составил 807 (90,36%), при дальнейшем культивировании было получено 283 (35,06%) культуры, которые были пассированы не менее 10 раз, и количество клеточных линий, обладающих стабильными пролиферативными характеристиками и прошедших более 40 пассажей, составило 110 (13,63%). Задепонировано в коллекции клеточных культур позвоночных ФГБУН «Институт цитологии РАН» 26 клеточных линий, запатентовано 12 клеточных линий, представляющих интерес в качестве клеточных моделей для последующих экспериментальных и клинических исследований. В результате данного этапа исследований была создана коллекция клеточных культур солидных опухолей, которая позволила изучить свойства клеток злокачественных новообразований *in vitro* в процессе длительного культивирования.

### **3.2. Экспрессия опухолеассоциированных антигенов малигнизированными клетками в процессе опухолевой прогрессии**

#### **3.2.1. Экспрессия опухолеассоциированных антигенов и антигенов HLA I и II класса культивируемыми клетками меланомы кожи, выявляемая методами иммуноцит- и гистохимии**

Меланома, особенно ее метастатические формы, характеризуется гистологическим разнообразием и способностью злокачественных меланоцитов менять уровень экспрессии ОАА [489]. Применение противоопухолевой клеточной иммунотерапии в данном случае

наталкивается на два существенных ограничения: 1) число пациентов, восприимчивых к этому виду лечения, определяется наличием экспрессии ОАА; 2) меланома может приобретать свойства, позволяющие игнорировать иммунную систему путем снижения синтеза молекул, являющихся мишенью для иммунокомпетентных клеток, или антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС) [490].

В настоящее время на клетках МК идентифицировано несколько типов ОАА [491; 492]. Это протеины, вовлеченные в синтез меланина: MART1/Melan A, тирозиназа, TRP1, 2, фактор транскрипции, индуцирующий меланоциты MITF, ассоциированный с множеством других факторов. Вторую группу составляют РГА, экспрессируемые преимущественно в ткани яичка и появляющиеся при злокачественной трансформации [493; 494]. Кроме того, на клетках МК выявляют белок S100, который не является абсолютно специфичным антигеном для МК, так как обнаруживается также в клетках лимфатических узлов, в дендритных клетках, макрофагах, а также в клетках нервных волокон [495]. Злокачественные меланоциты синтезируют также адгезивные молекулы CD63 и CD146, ассоциированные с процессами метастазирования [496], и антиген PMEL17 (gp100), представляющий собой чувствительный к нейроминидазе олигосахарид гликоконъюгатов, присутствующих в незрелых меланосомах [497].

Было показано, что пептиды, выделенные из этих молекул, способны вызывать ответ ЦТЛ, рестриктированный по МНС, причем эффективность иммунных реакций зависела, в том числе от уровня экспрессии МАА и уровня экспрессии молекул МНС I класса [498]. Действительно, клинические исследования различных протоколов вакцинотерапии данного вида злокачественных новообразований демонстрировали у больных, ответивших на лечение, присутствие ЦТЛ, реактивных по отношению к МАА [499]. Обнаружено, что уровень и характер экспрессии специфических антигенов клетками меланом связан со стадией заболевания [93]. Ряд исследователей установили взаимосвязь уровня выживаемости больных МК и степени экспрессии ОАА на опухолевых клетках, выделенных из организма пациентов [500]. В то же время в результате генетической нестабильности в процессе опухолевой прогрессии клеточная популяция приобретает гетерогенность, в том числе и по экспрессии специфических антигенов. Естественная селекция, приводящая к модуляции антигенных свойств, является, скорее всего, еще одним механизмом, который позволяет опухолевым клонам «избегать» воздействия иммунной системы. Подобные изменения свойств развивающейся в организме больного опухоли ставят определенные трудности при создании вакцин и, возможно, является одной из причин недостаточной их эффективности [501]. Для реализации клеточных технологий в онкологии часто используют короткоживущие клеточные культуры [472; 487]. Однако, как правило, при длительном курсе лечения или при необходимости формирования клеточного пула для клеточной иммунотерапии с

использованием аллогенных клеток возможно использование длительно культивируемых опухолевых клеточных линий. Клетки, выделенные из фрагментов опухолевой ткани пациента, вне организма способны менять интенсивность экспрессии антигенов, вплоть до полной ее потери. При этом вполне возможен процесс «дивергенции» свойств клеток МК, культивируемых *in vitro*, и метастатических клеток, развивающихся в организме больного, что может оказать влияние на клиническую эффективность проводимого лечения.

Как известно, антигены МНС I класса экспрессируются всеми ядродержащими клетками организма. Присутствие этих антигенов на опухолевых клетках играет решающую роль в формировании эффективного иммунного ответа и обеспечивает иммунологический контроль опухолевого роста [502]. Уменьшение или отсутствие экспрессии молекул МНС I класса является еще одним способом игнорирования опухоли иммунной системы. МНС II класса в норме присутствуют только у «профессиональных» АПК (дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты). Меланоциты кожи и невусы не имеют этих молекул, которые появляются лишь при их злокачественной трансформации [503]. Присутствие антигенов МНС II класса на опухолевых клетках представляет большой интерес, так как экспериментальные исследования показали, что при кокультивировании клеток меланомных линий человека, несущих эти антигены, с аутологичными CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами происходит распознавание МАО и активация иммунокомпетентных клеток, то есть было продемонстрировано, что клетки солидных опухолей могут самостоятельно действовать как АПК, стимулируя пролиферацию CD4<sup>+</sup>-клеток [504]. При этом также было обнаружено, что опухолевые клетки через МНС II класса в отсутствие костимулирующих сигналов вызывают их анергию по отношению к опухоли [505]. Таким образом, идентификация ОАА и антигенов HLA I и II класса представляется важным этапом в процессе создания биопрепаратов для клеточной иммунотерапии и оценке их иммунологической и клинической эффективности, которая в свою очередь зависит от точности определения возможных мишеней для иммунного ответа на молекулярном уровне и основана на принципе стимуляции иммунной системы против ОАА через цитотоксические антитела и ЦТЛ [506].

В этой связи были проанализированы антигенные изменения в культурах клеток МК, выделенных из опухолей больных с целью приготовления вакцин и длительно пассируемых вне организма (n=364). Из 364 клеточных культур МК 17 образцов были изначально негативны при определении изучаемых меланомо-ассоциированных антигенов, при этом 9 из 17 образцов были положительны при использовании антител, выявляющих фибробласты. На основании полученных результатов данные образцы были исключены из исследования. Тридцать четыре клеточные культуры было получено из образцов первичной опухоли, 14 – из рецидива опухоли и 299 – из метастатических образцов. Сравнение антигенного фенотипа клеток МК, полученных

из этих образцов, на начальных этапах культивирования (1–10 пассаж) показало существенные различия в процентном содержании клеток, экспрессирующих S100, HLA DP/DQ/DR и Ki-67, согласно критерию Краскела–Уоллиса ( $p < 0,05$ ) (табл. 10). Культуры метастатического происхождения характеризовались более выраженной презентацией антигенов HLA DP/DQ/DR, большим количеством клеток, в которых выявлялся антиген Ki-67, и меньшим количеством клеток, несущих антиген S100.

Таблица 10 – Экспрессия Ki-67, S100, HLA DQ/DP/DR клетками МК *in vitro*, полученными из различных образцов опухоли ( $\leq 10$  пассаж)

Источник получения клеточной культуры	Антигены, % окрашенных клеток Медиана (ДИ 95%)		
	Ki-67	S100	HLA DQ/DP/DR
Первичная опухоль	20,0 (14,0–48,0)	65,0 (10,0–100,0)	5,0 (0–8,75)
Рецидив	20,0 (16,25–27,25)	91,0 (77,5–100,0)	17,5 (0–43,75)
Метастаз	45,0 (20,0–67,5)	5,0 (0–50,0)	20,0 (5,0–72,5)
p*	0,043	0,000	0,011

*Примечание:* \* – согласно критерию Краскела–Уоллиса.

Длительное культивирование клеток МК *in vitro* приводило к значительному снижению присутствия исследуемых антигенов. На ранних (1–5) пассажах большинство культур имели антигенный профиль, сходный с определяемым в тканевых образцах.

На всех гистологических образцах МК, независимо от происхождения (первичная опухоль, рецидив или метастаз), выявляли CD63, мембранный белок, гликопротеин семейства тетраспанинов, который традиционно считается маркером неметастазирующей меланомы, так как ассоциирован с ранними стадиями развития этого злокачественного новообразования [507]. В работе Mejia O. и соавт. (2021) подтвердили отсутствие информативности этого маркера при метастатической меланоме [508].

В нашем исследовании анализ гистологических образцов в 28,2% случаев выявил присутствие этого антигена в 70–100% клеток (рис. 22 А). Присутствие CD63 в виде окрашивания поверхности клеток и цитоплазматических гранул обнаруживали в 88,28% культур на ранних пассажах, после 15 пассажа количество культур, где не выявлялся данный антиген, достигло 23,5% и при дальнейшем культивировании увеличилось до 74,1% (см. рис. 22 А). Исследования Luria A. и соавт. (2014) клеточных линий МК, имеющих первичное или метастатическое происхождение, показали, что CD63 выступает как мощный ингибитор процессов мезенхимально-эпителиального перехода, блокируя подвижность и инвазивные способности малигнизированных меланоцитов [509]. В процессе культивирования постепенно снижался процент клеточных линий, синтезирующих белки S100. Эти антигены обнаруживались в 91,6% гистологических образцов МК, к 25–45 пассажу их экспрессировало 48,14% культур (рис. 22 Б).

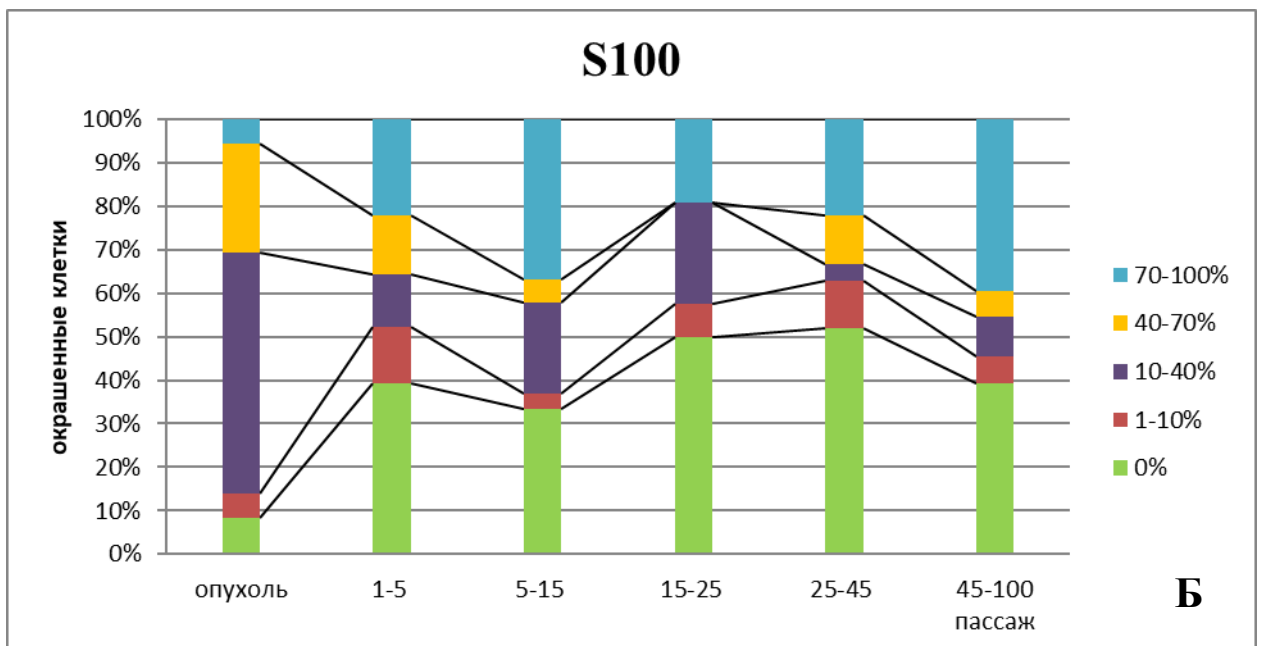
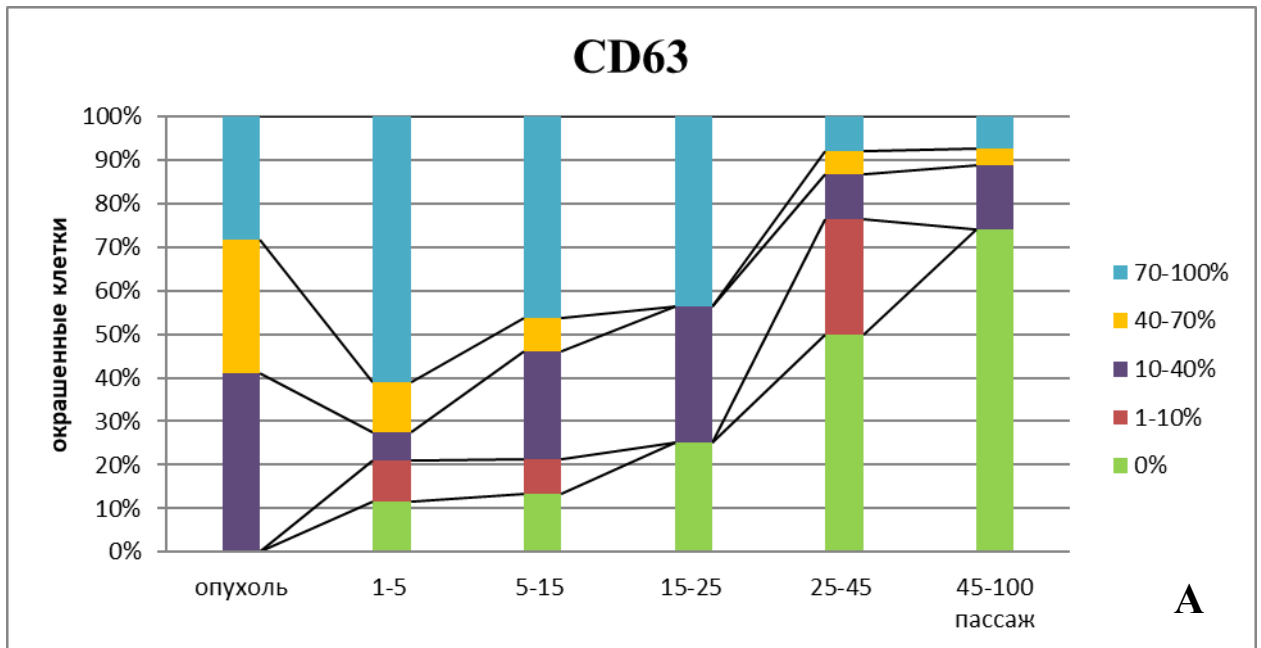


Рисунок 22 А, Б – Динамика изменений экспрессии ОАА, HLA I/II класса, Ki-67 в ткани опухоли и клеточных культурах меланомы кожи в процессе культивирования, отображенная с помощью нормированных гистограмм, указывающих на процентный вклад каждого значения в общую сумму:

**А** – оценка количества окрашенных клеток, экспрессирующих CD63;

**Б** – S100

Однако в ряде случаев, когда злокачественные меланоциты практически полностью теряли способность синтезировать изучаемые специфические антигены, наблюдали присутствие именно CD63 и S100, в отличие от контрольных культур фибробластов легкого эмбриона человека. Согласно современным представлениям, члены семейства белков S100 вовлечены в регуляцию широкого разнообразия клеточных процессов, таких как подвижность, пролиферация, дифференцировка, организация цитоскелета и мембран [510].

Наблюдения за характером экспрессии ОАА позволяют отметить, что в процессе пассирования клеточных линий степень выявления меланомных маркеров по числу окрашенных клеток и интенсивность окрашивания имели скорее не однонаправленный, а пульсирующий характер, что, скорее всего, нельзя объяснить простым доминированием наиболее «агрессивных» клонов. Данное явление особенно четко было продемонстрировано при изучении окрашивания клеток МК антителами к антигену MAGE1. В ткани опухоли он выявлялся только у 65,7% пациентов, из них в 39,5% случаев обнаружили в образцах не более 10% клеток с окрашенными ядрами (рис. 22 В).

На ранних пассажах в культурах, выделенных из опухолей, интенсивно продуцирующих антигены семейства MAGE1, можно было наблюдать сначала единичные окрашенные клетки, а затем увеличение их числа, причем морфология клеток, синтезирующих и не синтезирующих исследуемый антиген, была различна (рис. 23). К 15–25 пассажу количество культур, где выявляли MAGE1, возросло до 80% и сохранялось до 100 пассажа, но продолжало увеличиваться количество образцов, где данный антиген выявляли в 70–100% клеток (26,6% и 59,09% соответственно). По мнению Gajjar N.A. и соавт. (2004), данный маркер не может использоваться как надежный предиктор агрессивного поведения МК, так как эти авторы не обнаружили постоянную экспрессию этого эпитопа в большинстве изученных гистологических образцов меланом [511].

Была обнаружена частичная или полная потеря способности продуцировать выделенными клетками МК на первых пассажах такие специфические молекулы, как Melan A, тирозиназа, тирозиназоподобный белок 1 (TRP-1) по сравнению с гистологическими образцами, где процент негативной экспрессии был очень мал (16,6, 7,6 и 12,1% соответственно). В ряде случаев при дальнейшем пассировании экспрессия этих антигенов восстанавливалась, тем не менее в целом в большинстве наблюдений длительное культивирование злокачественных меланоцитов сопровождалось прекращением синтеза указанных молекул (рис. 22 Г, Д, Е).

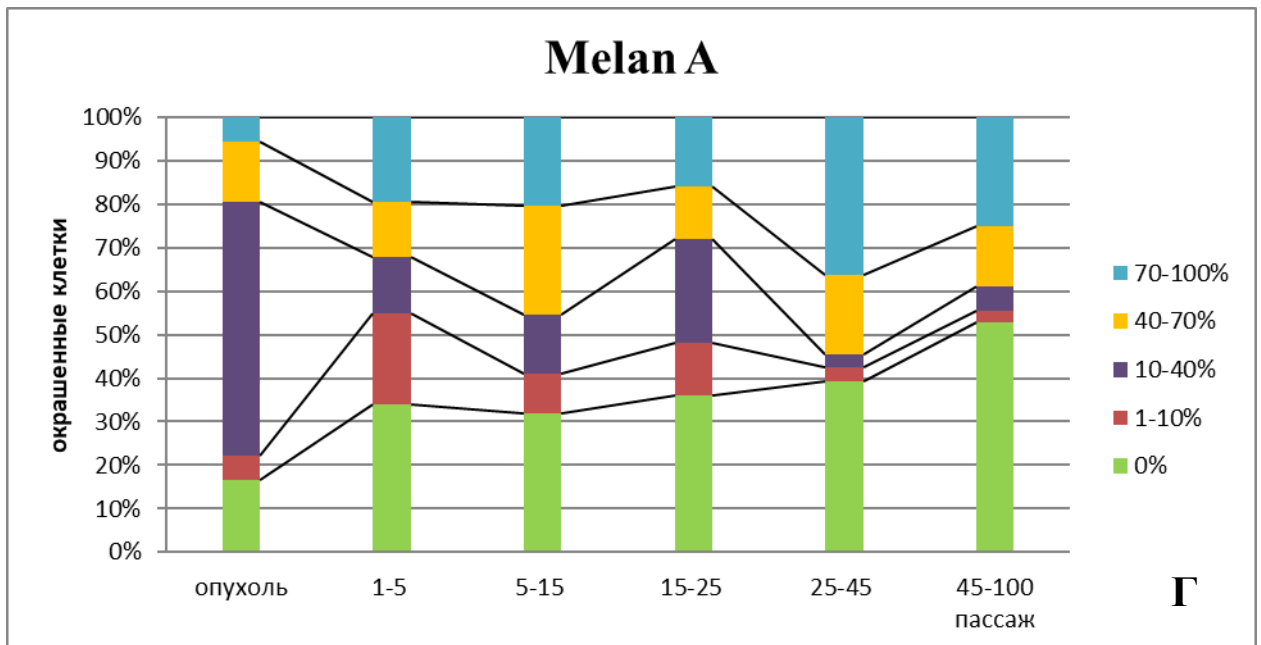
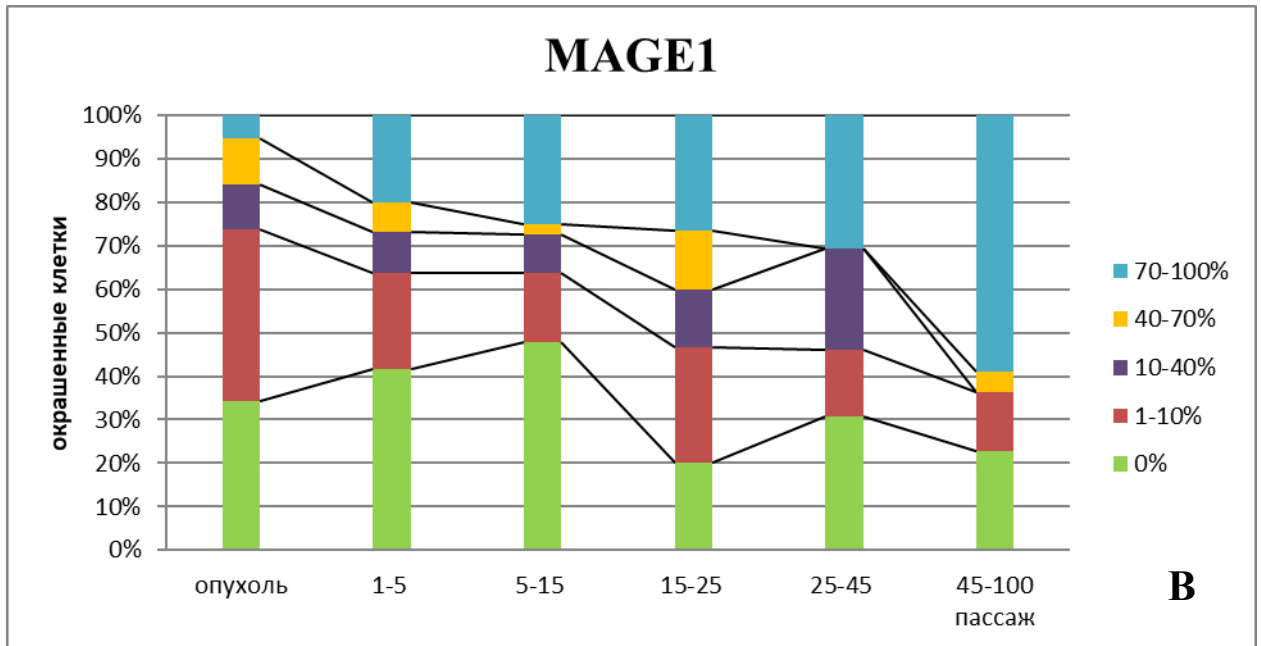


Рисунок 22 В, Г – Динамика изменений экспрессии ОАА, HLA I/II класса, Ki-67 в ткани опухоли и клеточных культурах меланомы кожи в процессе культивирования, отображенная с помощью нормированных гистограмм, указывающих на процентный вклад каждого значения в общую сумму:  
**В** – оценка количества окрашенных клеток, экспрессирующих MAGE1;  
**Г** – Melan A



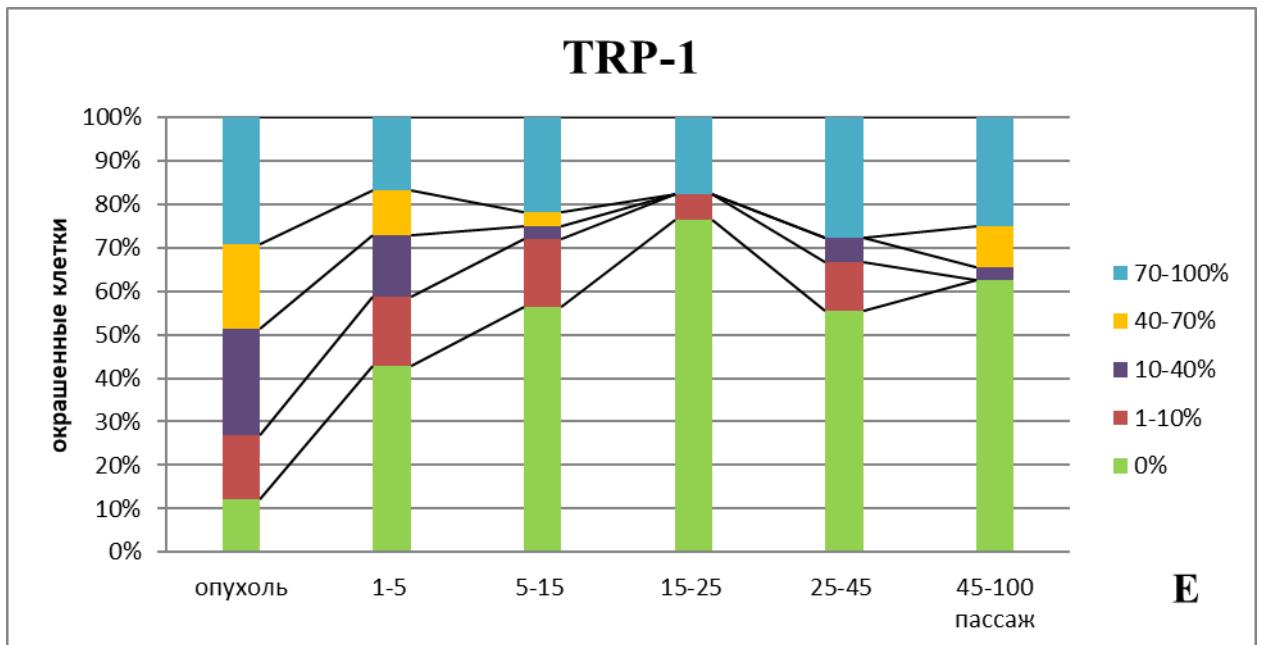
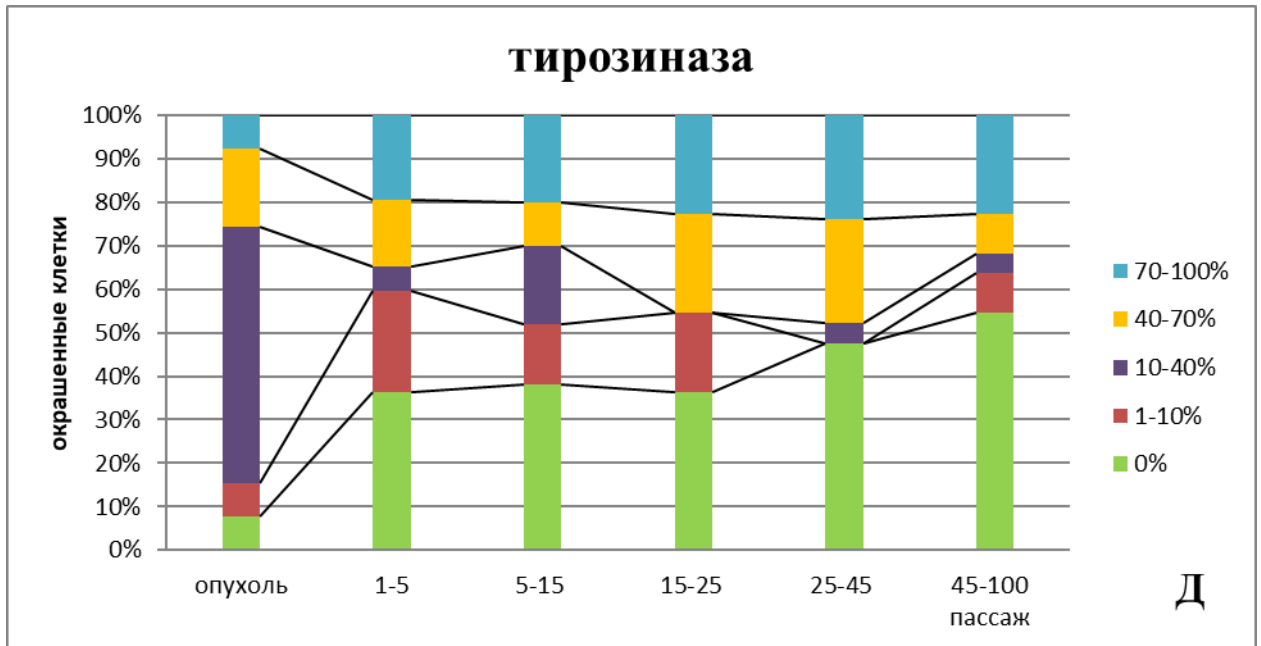


Рисунок 22 Д, Е – Динамика изменений экспрессии ОАА, HLA I/II класса, Ki-67 в ткани опухоли и клеточных культурах меланомы кожи в процессе культивирования, отображенная с помощью нормированных гистограмм, указывающих на процентный вклад каждого значения в общую сумму:

Д – оценка количества окрашенных клеток, экспрессирующих тирозиназу;

Е – TRP-1

После 25 пассажа мы не наблюдали окрашенных клеток в 39,4, 47,6 и 55,5% образцов клеточных культур, после 45 пассажа – в 52,7, 54,5 и 64,5% случаев соответственно. Данные

антигены являются строго специфичными для клеток МК, так как их присутствие ассоциировано с процессами меланогенеза, и обнаруживаются в 85–97% первичных и в 57–92% метастатических меланом при иммуногистохимическом исследовании [510].

На поздних этапах культивирования исследованные клеточные культуры МК синтезировали антиген gp100 (PMEL17), который выявлялся в 46,4% случаев в 10–100% клеток (рис. 22 Ж). Белок PMEL17 играет важную роль в структурной организации меланосом, способствуя их созреванию [512]. Suriano R. и соавт. (2013) высказали предположение, что процессы меланогенеза связаны с процессами злокачественной трансформации меланоцитов, основываясь на экспериментах, которые продемонстрировали зависимость успешной имплантации клеток культивируемых меланом бестимусным мышам от уровня экспрессии антигенов, участвующих в синтезе меланина [513].

На поздних пассажах также увеличивалось количество клеточных линий, в ядрах 70–100% клеток которых выявлялся меланоцитарный транскрипционный фактор MITF по сравнению с исходными тканевыми образцами опухоли (36,4% и 26,3% соответственно) (рис. 22 З). MITF играет важную роль в процессах дифференциации многих типов клеток: меланоцитов, тучных клеток, остеокластов, пигментного эпителия сетчатки [514]. Было обнаружено 10 изоформ этого фактора с различными тканеспецифическими паттернами, в том числе изоформа MITF-M, специфическая для меланоцитов, участвующая в процессах регуляции транскрипции генов, ответственных за меланогенез, дифференциацию и выживаемость клеток [515]. В экспериментах с использованием моделей на животных было обнаружено, что функционирование MITF связано с метастатическим ростом *in vivo* [516]. Изучение экспрессии *MITF* в метастазах МК, локализующихся в лимфатических узлах, показало наличие экспрессии этого фактора в 92% случаев, в отличие от его транскрипционных мишеней, таких как меластатин (MLSN1/TRPM1), фактор пигментного эпителия (SERPINF1/PEDF), SILV/PMEL17/gp100 и антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1/Melan A) [517].

В настоящее время известно, что *MITF* координирует широкий спектр клеточных процессов. Генетические повреждения, которые вызывают инициацию и прогрессирование МК, а также измененное опухолевое микроокружение индуцируют нарушение регуляции экспрессии, посттрансляционной модификации и функции MITF, в результате чего его способность координировать широкий спектр биологических процессов нарушается [518]. Sánchez-Del-Campo L. и соавт. (2021) продемонстрировали, что MITF регулирует экспрессию ADAM10, ключевой шеддазы, обеспечивающей потерю опухолевыми клетками лигандов MICA/B, которые в свободном состоянии способны блокировать активационные рецепторы NK-клеток [519].

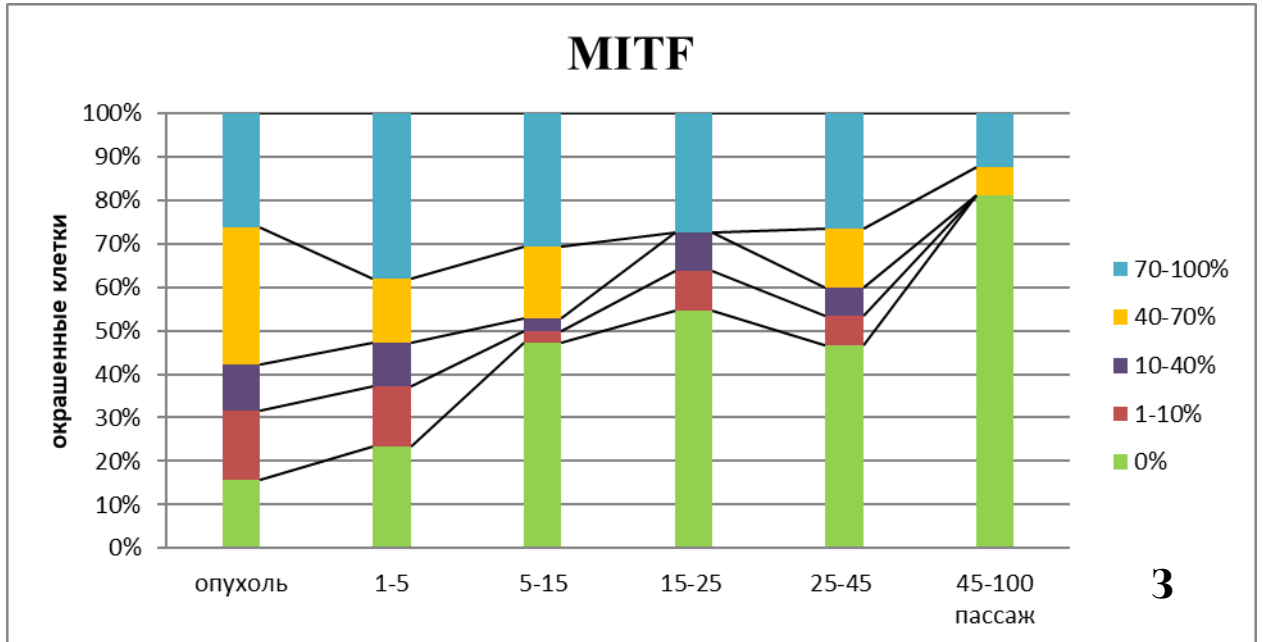
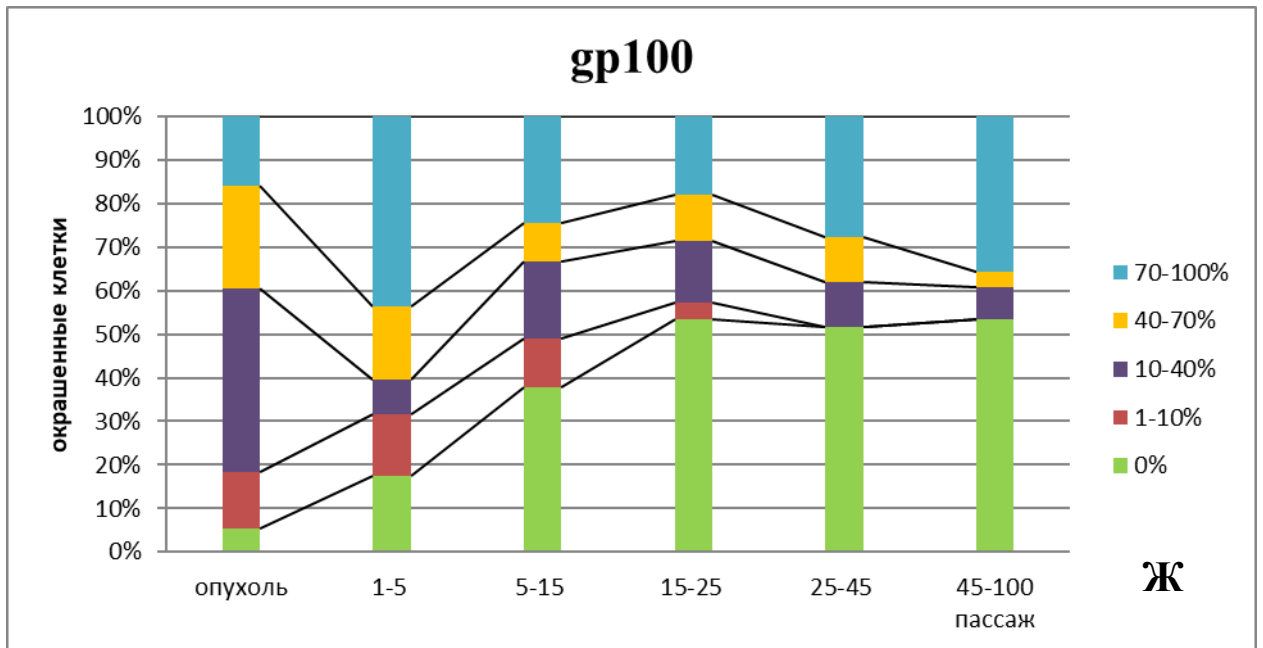


Рисунок 22 Ж, З – Динамика изменений экспрессии ОАА, HLA I/II класса, Ki-67 в ткани опухоли и клеточных культурах меланомы кожи в процессе культивирования, отображенная с помощью нормированных гистограмм, указывающих на процентный вклад каждого значения в общую сумму:

**Ж** – оценка количества окрашенных клеток, экспрессирующих gp100;

**З** – MITF

Исследование антигена CD146, маркера метастазирующей меланомы, указывает на усиление метастатического потенциала культивируемых клеток МК, так как количество образцов, где присутствует эта молекула в 70–100% клеток, увеличивается в процессе пассирования (рис. 22 И). Так, на первых пассажах CD146 выявляется в этом количестве у 25% культур, а к 45 пассажу – у 65% культур. Этот белок часто чрезмерно экспрессируется на поверхности инвазивных и метастатических клеток МК; однако его экспрессия редко встречается в клетках доброкачественных невусов [520].

Интересно, что в ряде культур МК обнаруживали одновременное присутствие CD63 и CD146. В последние годы помимо МК выявлено присутствие этого маркера в других опухолях, в частности, в карциномах, и функциональная связь этих молекул с процессами опухолевого роста, ангиогенеза и опухолевой диссеминации для РПЖ, РП, РМЖ, рака желудка, легкого и др. [521].

Анализ иммуноцитохимической идентификации антигенов HLA I и II класса позволил установить, что в процессе культивирования клеток меланом происходит потеря HLA A/B/C на их поверхности: на ранних пассажах окрашенные клетки выявили в 82,4% культур, а к 45 пассажу их наблюдали только в 38,4% случаев (рис. 22 К). В то же время выявление молекул HLA DQ/DP/DR показало обратную зависимость. При длительном культивировании увеличивается презентация антигенов MHC II класса: на 1–5 пассаже выявили этот антиген в 57,3% культур МК, к 45 пассажу практически все анализируемые клеточные линии синтезировали эти молекулы (90,5%) (рис. 22 Л).

Кроме того, при пассировании клеток МК усиление гетерогенности выявляемых специфических антигенов и обеднение антигенного профиля сочетается с увеличением количества клеток в митотическом цикле, в ядрах которых обнаруживается маркер пролиферации Ki-67: на 1–5 пассажах идентифицировали 70–100% митотически активных клеток в 26,7% случаев, на 45–100 пассажах – 88,9% (рис. 22 М).

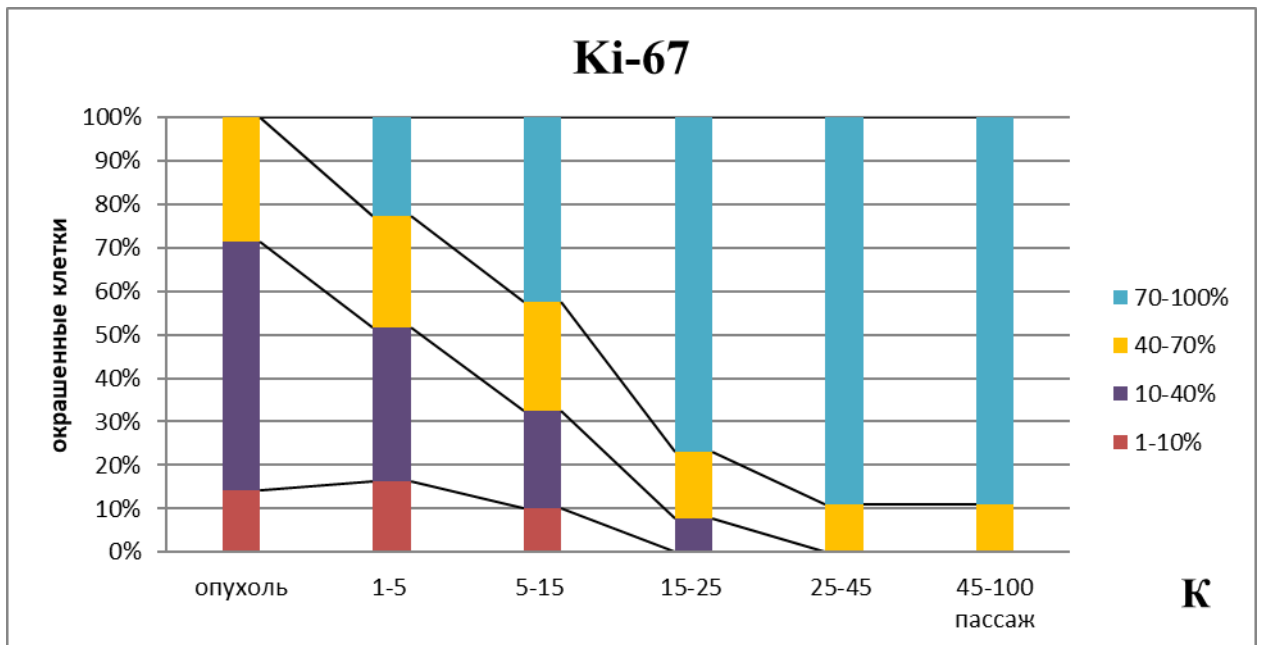
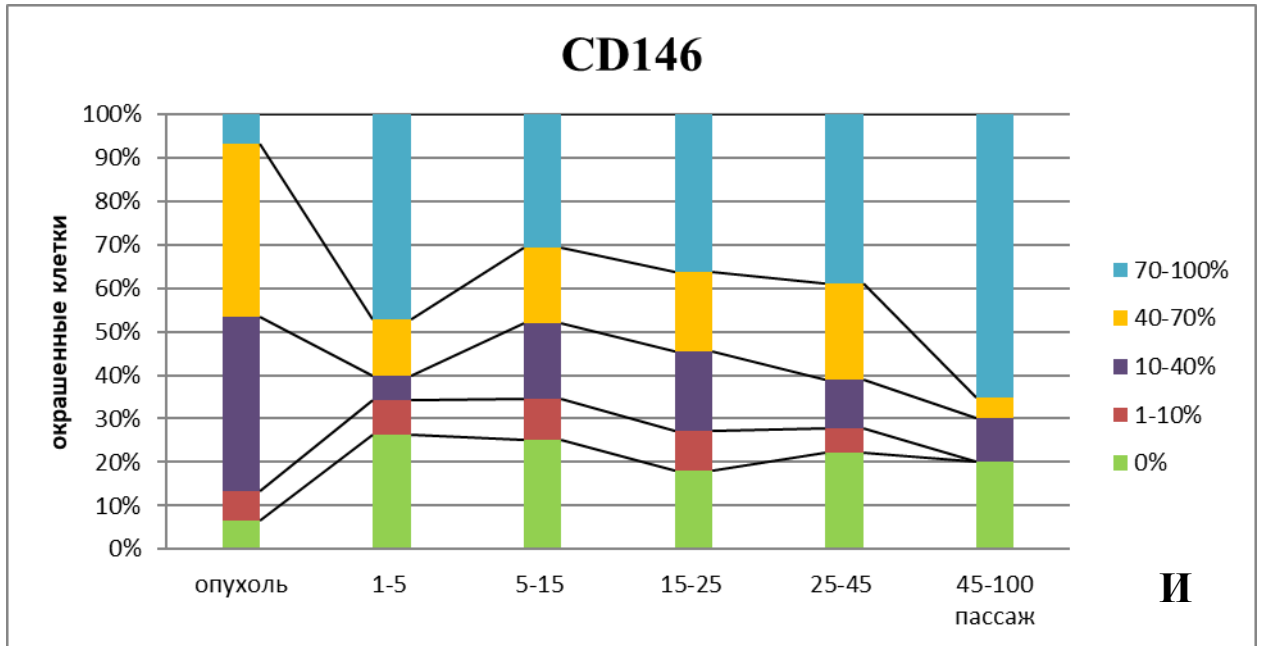


Рисунок 22 И, К – Динамика изменений экспрессии ОАА, HLA I/II класса, Ki-67 в ткани опухоли и клеточных культурах меланомы кожи в процессе культивирования, отображенная с помощью нормированных гистограмм, указывающих на процентный вклад каждого значения в общую сумму:

**И** – оценка количества окрашенных клеток, экспрессирующих CD146;

**К** – Ki-67

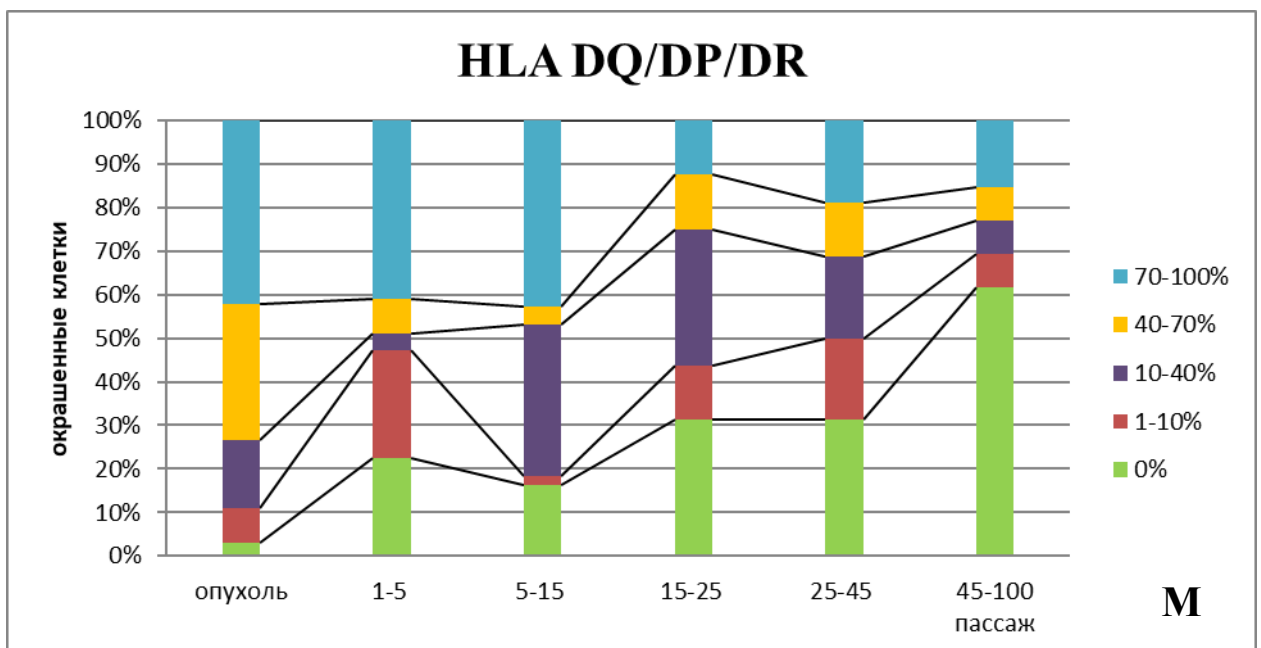
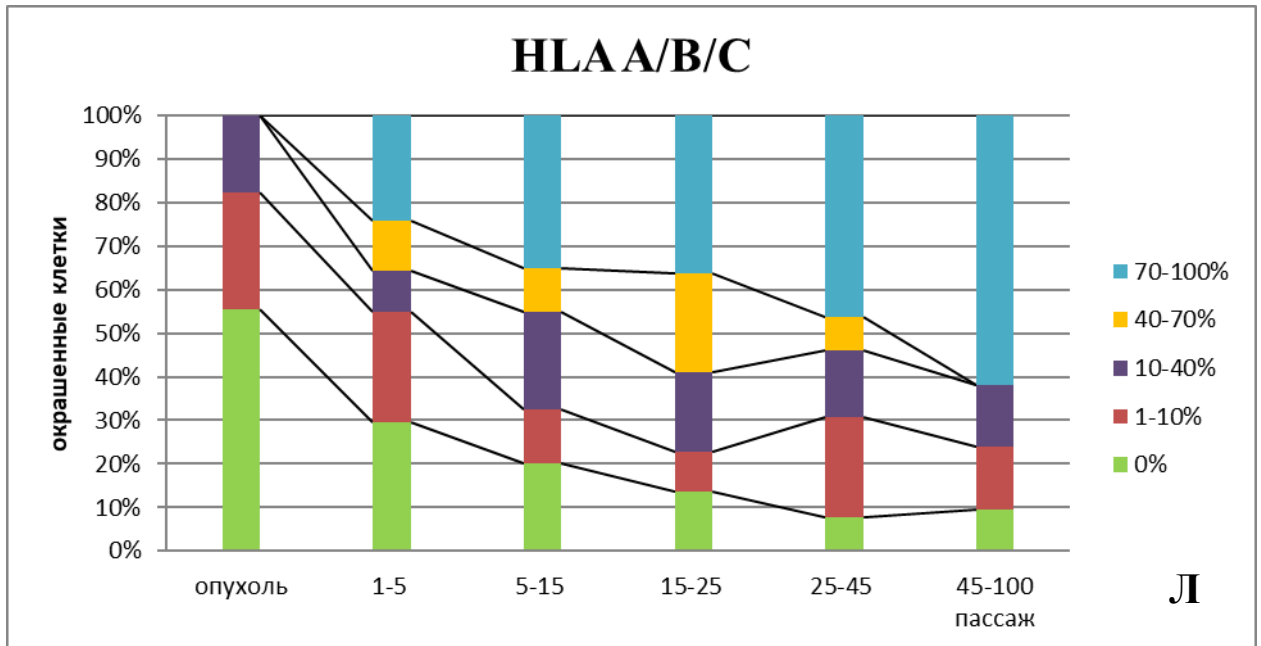
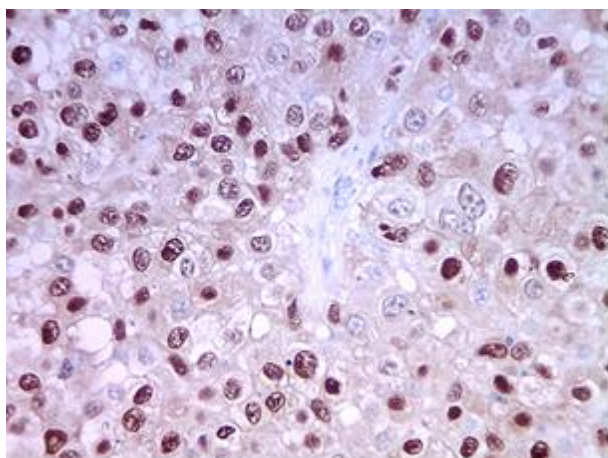


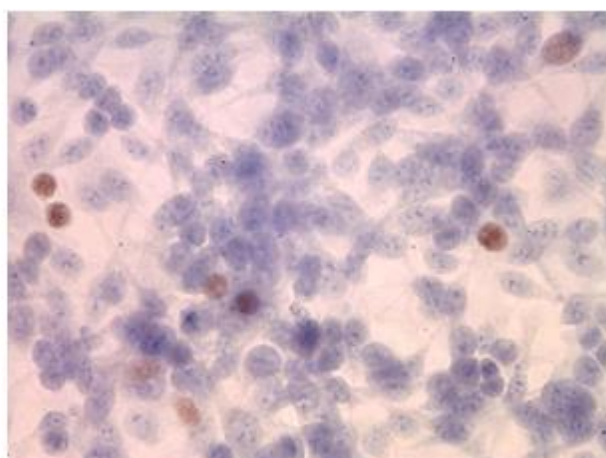
Рисунок 22 Л, М – Динамика изменений экспрессии ОАА, HLA I/II класса, Ki-67 в ткани опухоли и клеточных культурах меланомы кожи в процессе культивирования, отображенная с помощью нормированных гистограмм, указывающих на процентный вклад каждого значения в общую сумму:

**Л** – оценка количества окрашенных клеток, экспрессирующих HLA A/B/C;

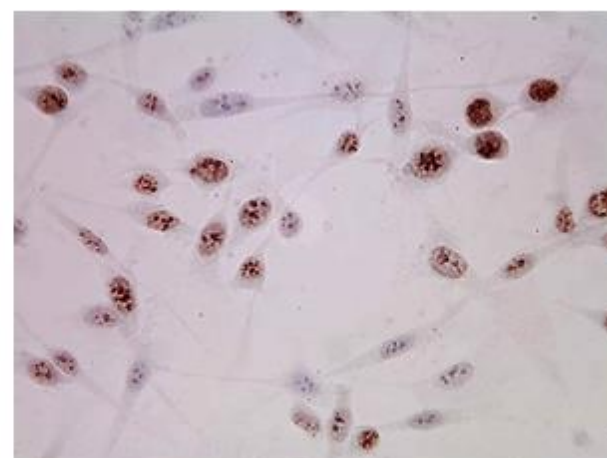
**М** – HLA DQ/DP/DR



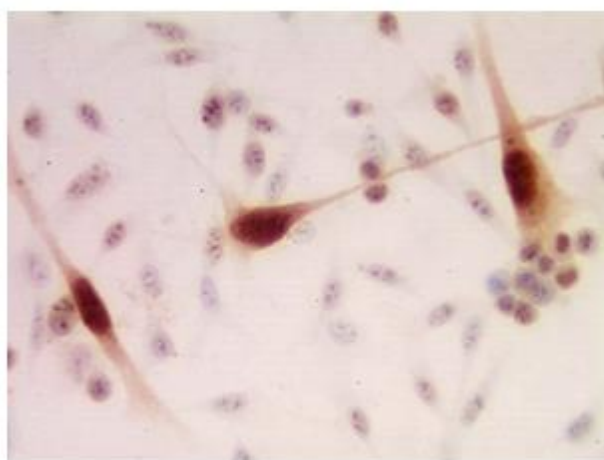
Гистологический препарат



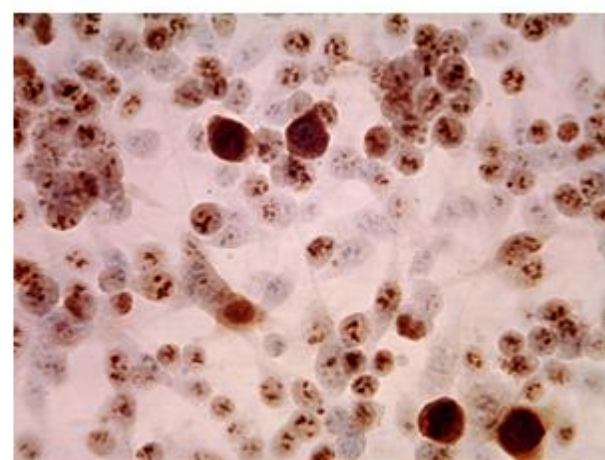
10 пассаж



25 пассаж



40 пассаж



65 пассаж

Рисунок 23 – Выявление экспрессии антигенов MAGE1 в гистологических образцах и культуре меланомы кожи пациента ШАА., 61 г. (#283) в процессе пассирования. Метод иммуногисто- и цитохимии с применением МКАТ, специфичных к антигенам MAGE1.

Докрашивание гемалауном Майера. Увеличение: гистологический препарат –  $\times 400$ , цитологические препараты –  $\times 200$

В результате культивирования к 100 пассажиру только 16 клеточных линий МК не потеряли экспрессию девяти исследуемых МАА (4,61%), и 11 – молекул HLA I класса (3,17%) (рис. 24).



Рисунок 24 – Сохранение презентации ОАА в процессе длительного культивирования *in vitro* клеток меланомы кожи

Постепенная потеря антигенной презентации культивируемыми клетками МК проиллюстрирована примером клеточной линии МК #263 на рис. 25.

Нами также были проанализированы индивидуальные данные по непрерывному культивированию (0–100 пассаж) культур клеток МК (n=100), при этом в анализе экспрессии отдельных антигенов мы условно выделили две группы образцов по количеству окрашенных клеток:  $\geq 50\%$  и  $< 50\%$  (рис. 26).

Динамика экспрессии CD63, Melan A, Tyros, TRP1, gp100, S100, HLA I во времени показала, что для большинства антигенов происходил процесс их потери при длительном культивировании, который не зависел от интенсивности выявления этих антигенов в начальной точке анализа.

Экспрессия антигенов CD146, MAGE1, HLA II нарастала с увеличением пассажа. Среднее значение количества клеток МК, экспрессирующих MITF, в процессе пассирования оставалось на одном уровне, но в группе образцов со стартовым количеством окрашенных клеток  $\geq 50\%$  экспрессия MITF падала, в группе  $< 50\%$  – увеличивалась.



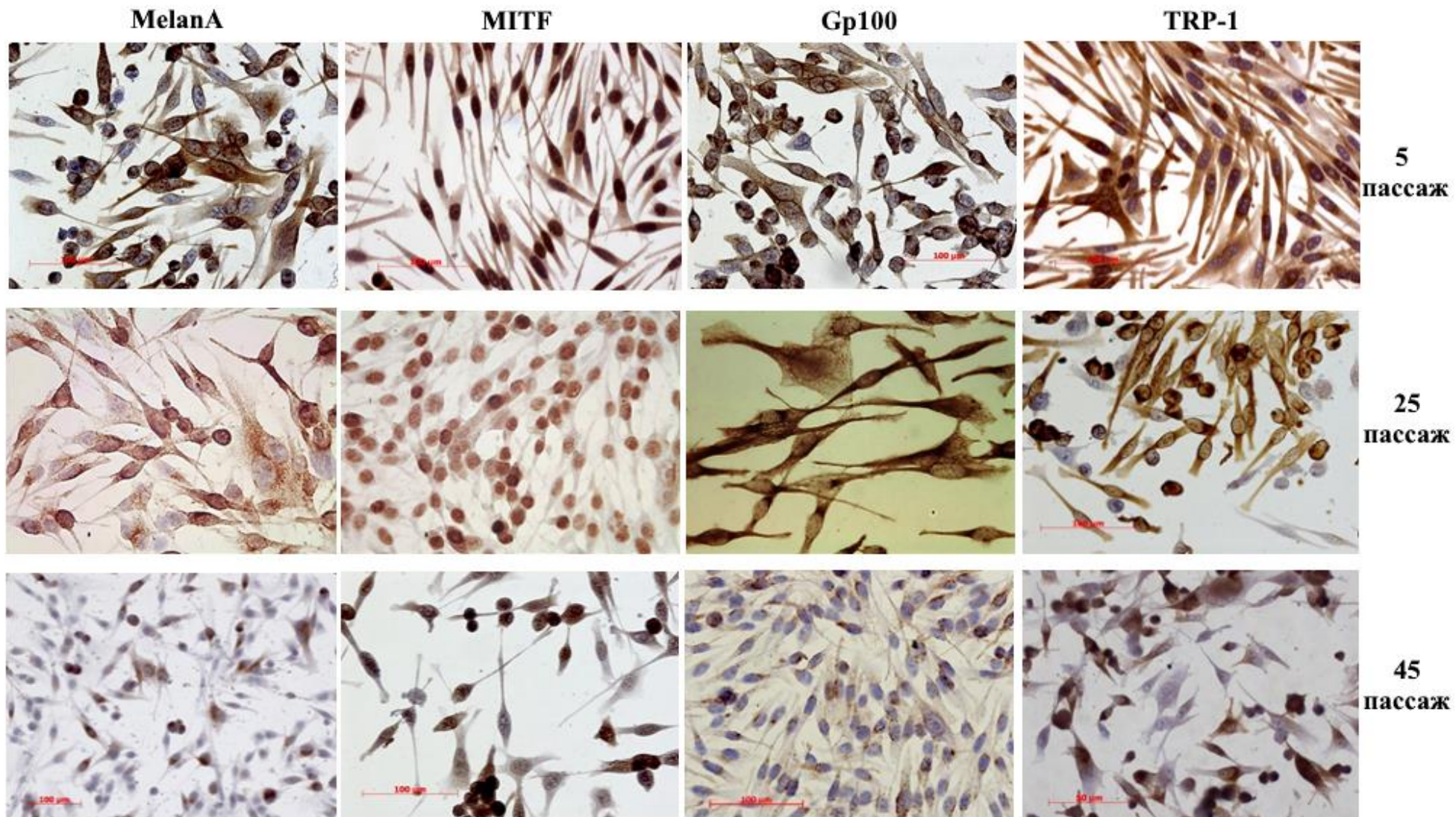


Рисунок 25 (начало) – Потеря экспрессии Melan A, MITF, gp100, TRP-1 в процессе длительного культивирования клеток МК. Культура пациента МВВ., 53 г. (#263), метод иммуноцитохимии с применением МКАТ, специфичных к антигенам МК. Докрашивание гемалауном Майера

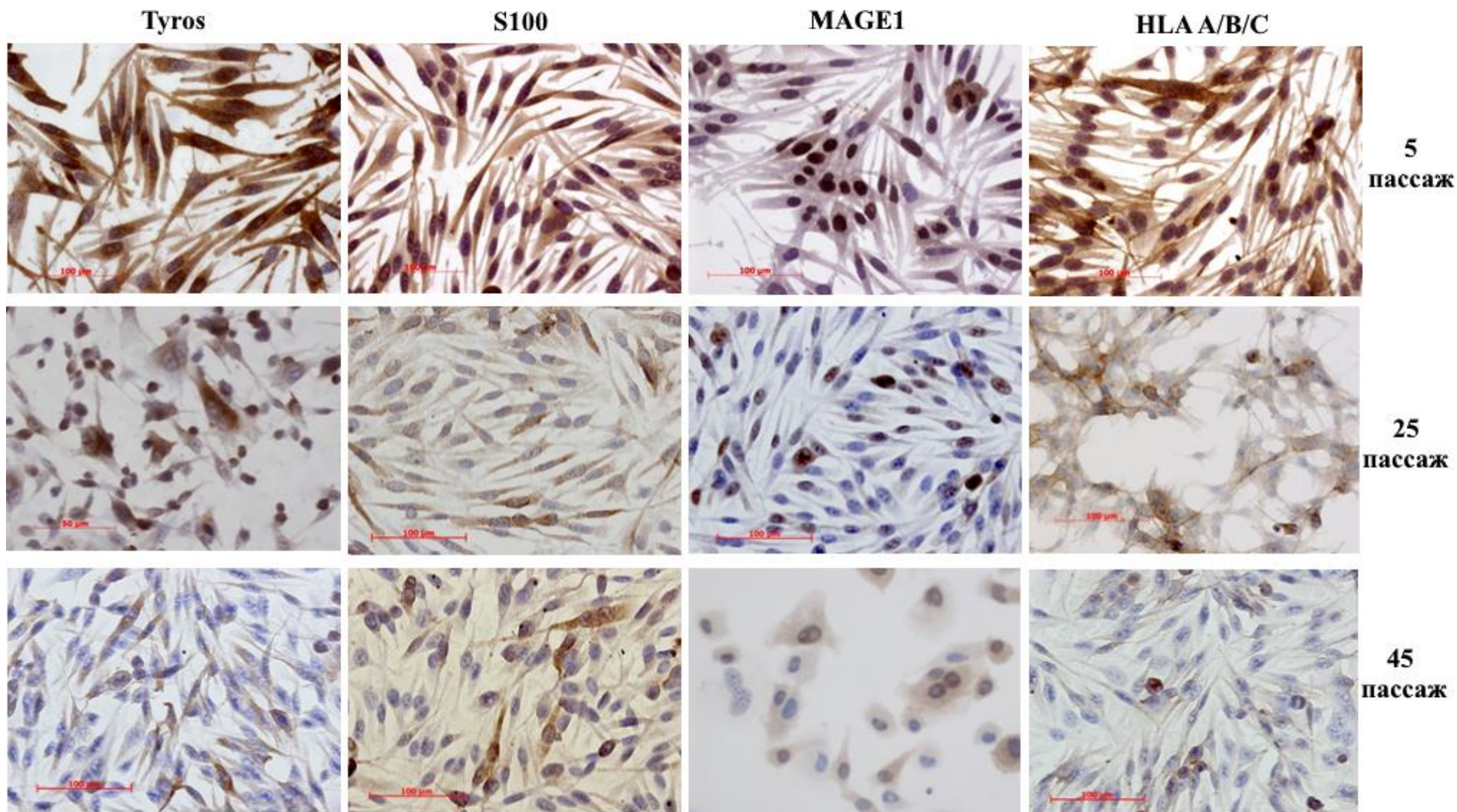


Рисунок 25 (окончание) – Потеря экспрессии Tyros, S100, MAGE1, HLA A/B/C в процессе длительного культивирования клеток МК. Культура пациента МВВ., 53 г. (#263), метод иммуноцитохимии с применением МКАТ, специфичных к антигенам МК. Докрашивание гемалауном Майера

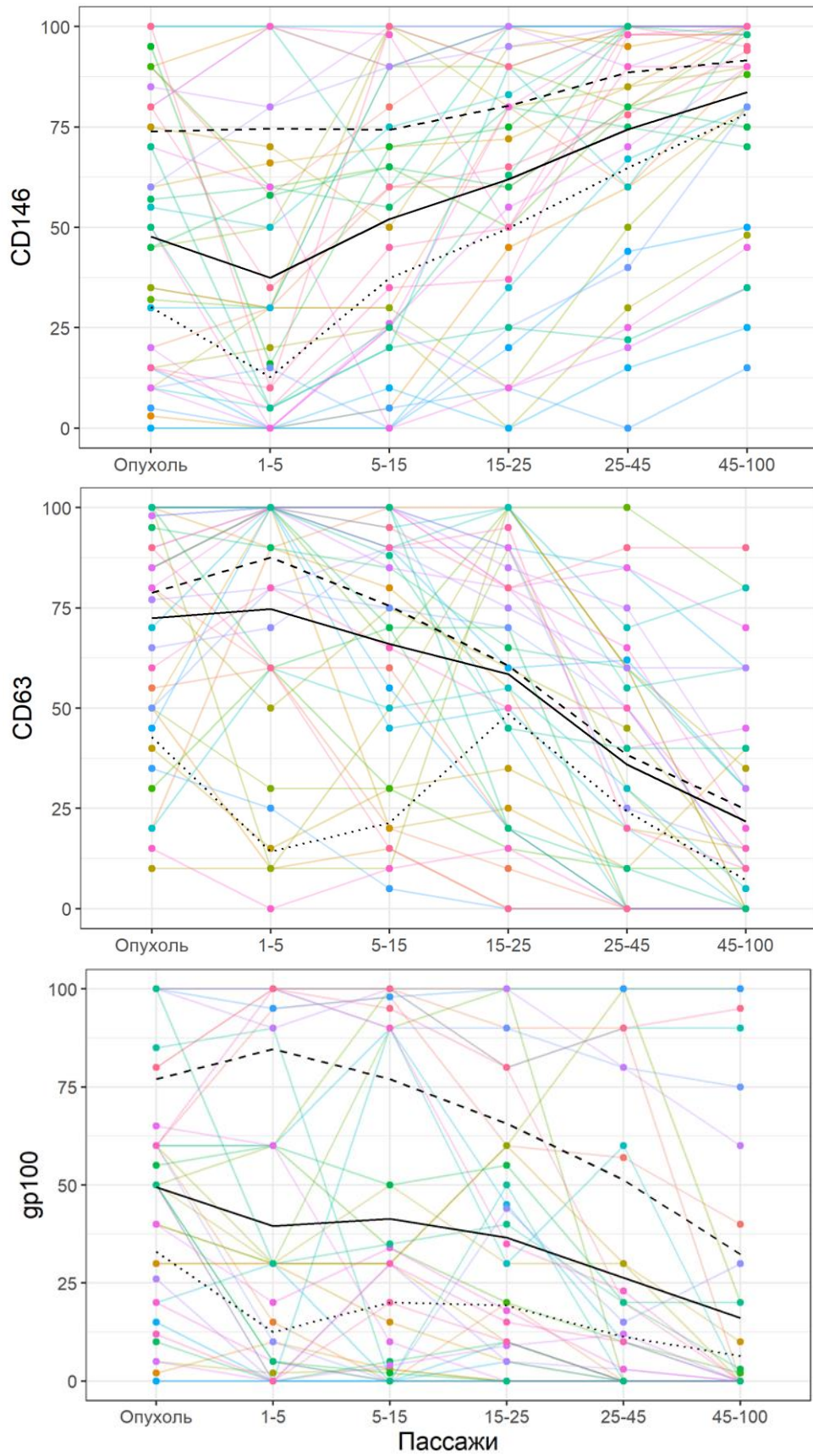


Рисунок 26 (начало) – Динамика экспрессии ОАА культурами клеток МК при непрерывном культивировании (0–100 пассаж). Антигены CD146, CD63, gp100

Примечание: ---- – группа образцов с  $\geq 50\%$  окрашенных клеток; ..... – группа образцов с  $< 50\%$  окрашенных клеток; — – среднее значение количества окрашенных клеток.

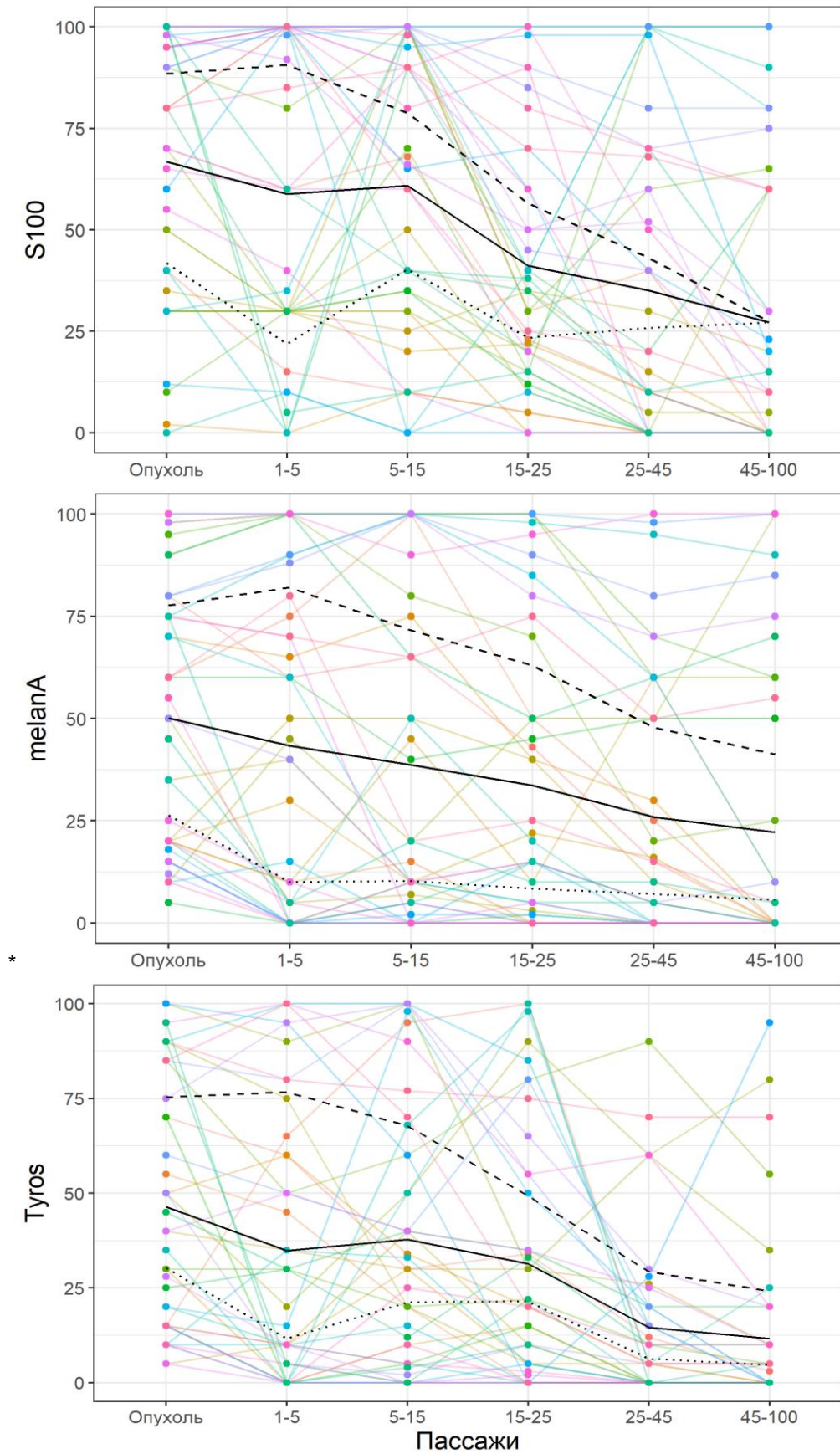


Рисунок 26 (продолжение) – Динамика экспрессии ОАА культурами клеток МК при непрерывном культивировании (0–100 пассаж). Антигены S100, Melan A, Tyros  
 Примечание: ---- – группа образцов с  $\geq 50\%$  окрашенных клеток; ..... – группа образцов с  $< 50\%$  окрашенных клеток; — – среднее значение количества окрашенных клеток.

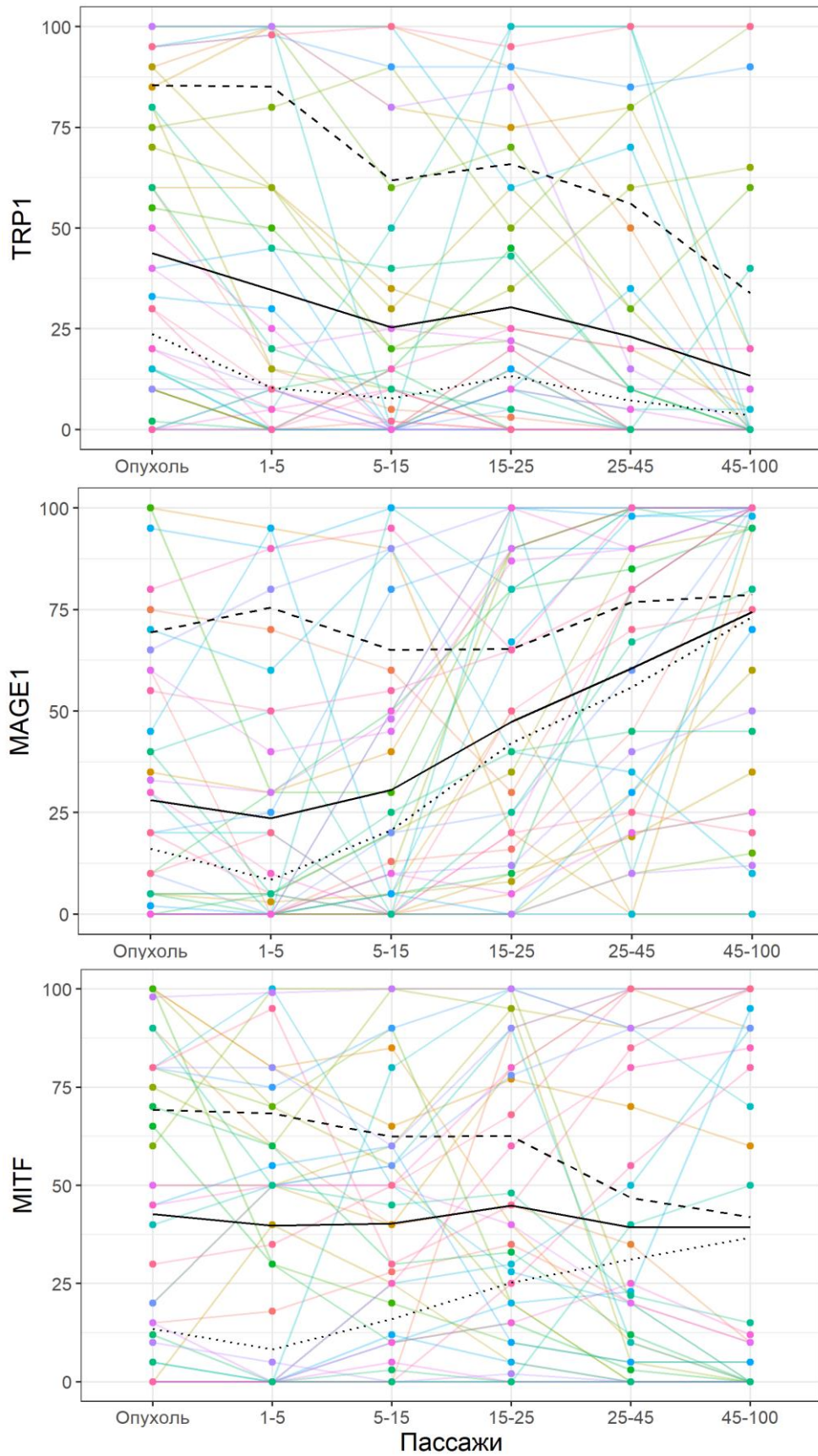


Рисунок 26 (продолжение) – Динамика экспрессии ОАА культурами клеток МК при непрерывном культивировании (0–100 пассаж). Антигены TRP-1, MAGE1, MITF  
 Примечание: ---- – группа образцов с  $\geq 50\%$  окрашенных клеток; ..... – группа образцов с  $< 50\%$  окрашенных клеток; — – среднее значение количества окрашенных клеток.

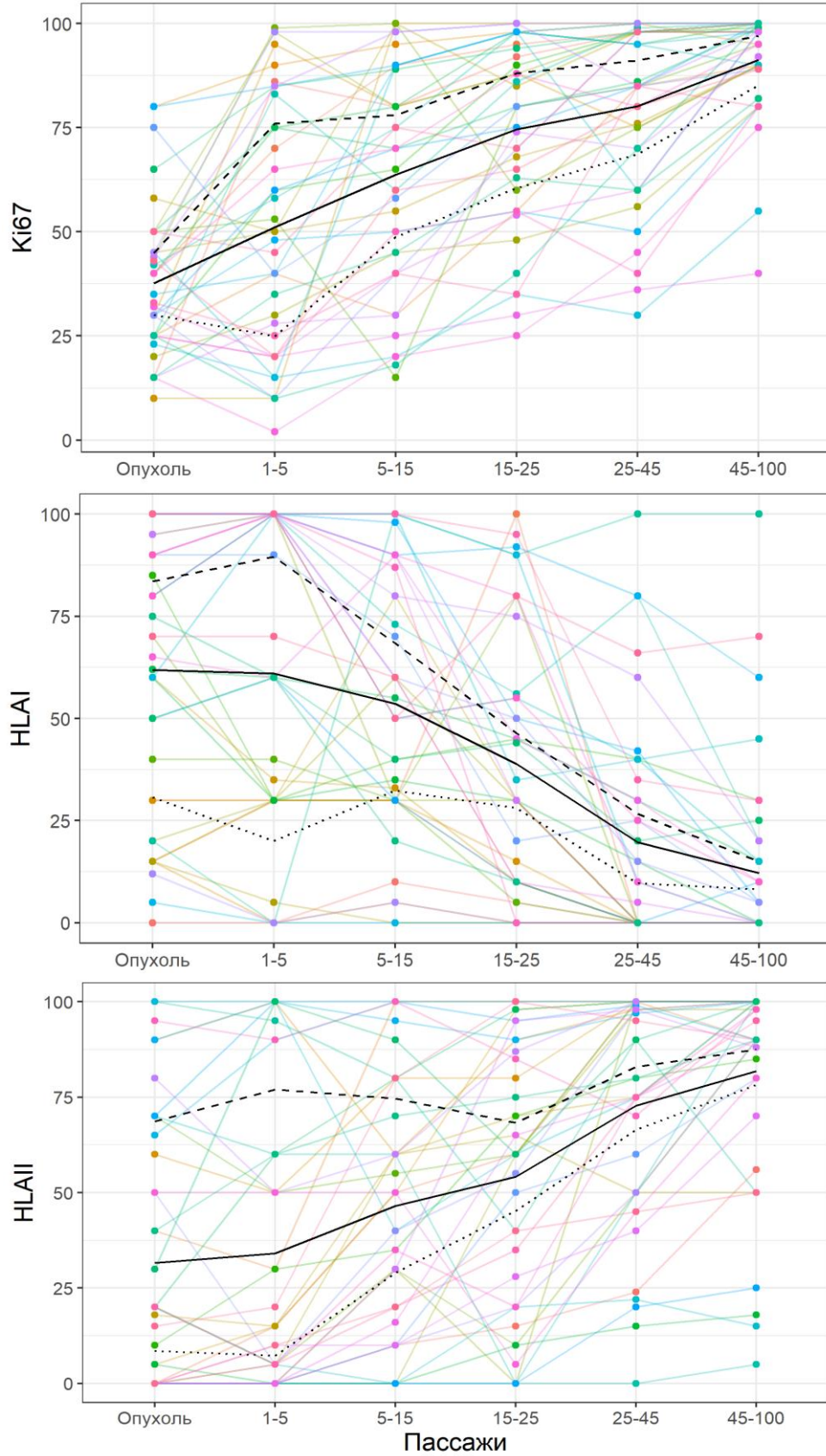


Рисунок 26 (окончание) – Динамика экспрессии ОАА культурами клеток МК при непрерывном культивировании (0–100 пассаж). Антигены Ki-67, HLA I и II класса

Примечание: ---- – группа образцов с  $\geq 50\%$  окрашенных клеток; ..... – группа образцов с  $< 50\%$  окрашенных клеток; — – среднее значение количества окрашенных клеток.

Ряд клеточных образцов был выделен из опухолевой ткани 11 пациентов в процессе прогрессии злокачественного новообразования для сравнительного изучения изменения экспрессии ОАА *in vitro* и *in vivo*. У одной больной клетки МК были получены из первичной опухоли и рецидива заболевания, у остальных пациентов – из метастатических образований разной локализации. Для каждого пациента был проведен индивидуальный анализ антигенного профиля культивируемых клеток МК, выделенных из опухолевых очагов разной локализации. Во всех случаях наблюдали клональную дивергенцию антигенных свойств опухоли, заключающуюся в различной интенсивности экспрессии ОАА злокачественными клетками, выделенными из новообразований одного и того же больного.

Пример № 1. Больная СЛВ, 43 г. Диагноз: меланома кожи левой голени pT4N0M0/ПС. В июне 2001 года произведено иссечение первичной опухоли. В апреле 2003 года выявлено прогрессирование заболевания. 03.04.2003 произведена операция Дюкена, pT4N2M0/ПС. 03.03.2005 произведена операция по удалению рецидива в мягких тканях, pT4N2M1a/IV.

В первичной опухоли методом иммуногистохимии были выявлены все изучаемые ОАА (рис. 27). Культура клеток МК #242, выделенная из ткани опухоли, имела антигенный профиль, сходный с таковым в опухолевой ткани. Культура клеток МК #242/2, полученная из рецидива заболевания, слабо экспрессировала в двух (CD63, gp100) из 9 изучаемых ОАА. Кроме того, культивируемые клетки МК практически полностью потеряли экспрессию антигенов HLA I класса, в то же время антигены HLA II класса выявлялись в 98% клеток.

Пример № 2. Больная СНМ, 27 л. Диагноз: меланома кожи левого предплечья с метастазами в периферических лимфоузлах, мягких тканях, внутригрудных и абдоминальных лимфоузлах, органах малого таза. Состояние после комплексного лечения на фоне иммунотерапии.

В процессе прогрессии злокачественного новообразования забирали трижды материал для получения культур и изучения антигенного профиля культивируемых опухолевых клеток после оперативного вмешательства: неполной/субоптимальной циторедукции от 26.11.2007, 17.09.2008 и 27.02.2009. Результаты представлены на рисунке 28.

Все изученные образцы практически не экспрессировали TRP-1 и слабо экспрессировали тирозиназу, gp100. В процессе опухолевой прогрессии уменьшилась экспрессия Melan A, S100, HLA A/B/C. Сохранялась экспрессия CD63, CD146, VEGF, MAGE1, MITF и HLA DP/DQ/DR. Возросло количество пролиферирующих клеток, в которых выявлялся антиген Ki-67. Клетки всех метастатических образцов слабо экспрессировали E-кадгерин, в то время как увеличивался пул малигнизированных клеток, несущих молекулы N-кадгерина. Также мы обнаружили, что все культивируемые клетки МК данного пациента, независимо от источника их происхождения, продуцировали антиген CD44.

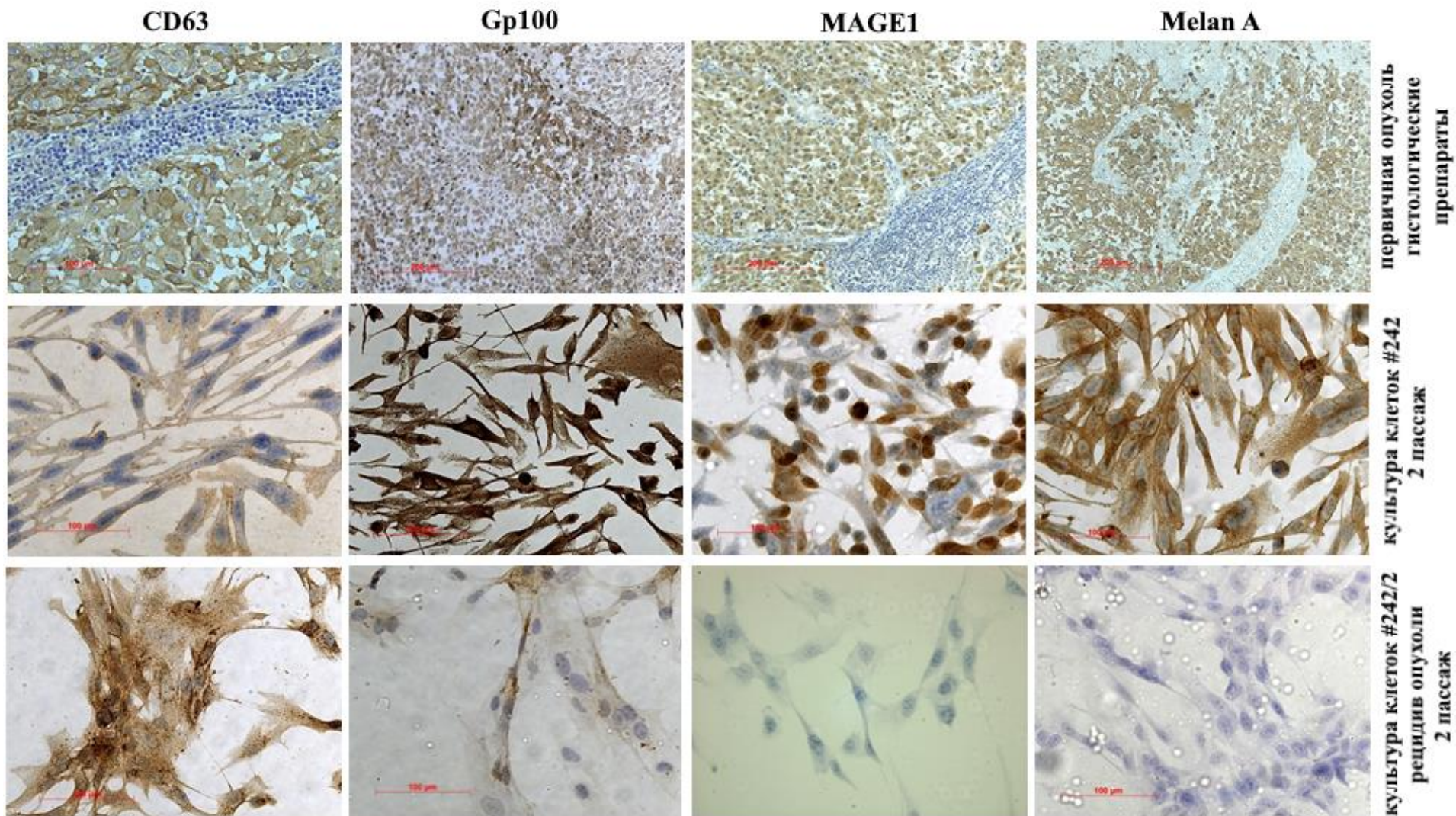


Рисунок 27 (начало) – Потеря экспрессии ОАА при прогрессии МК. Гистологический материал первичной опухоли, препараты культуры клеток #242, выделенных из первичной опухоли, и препараты культуры клеток #242/2, выделенных из рецидива опухоли больной СЛВ, 43 г. Метод иммуногистохимии, докрасивание гемалауном Майера



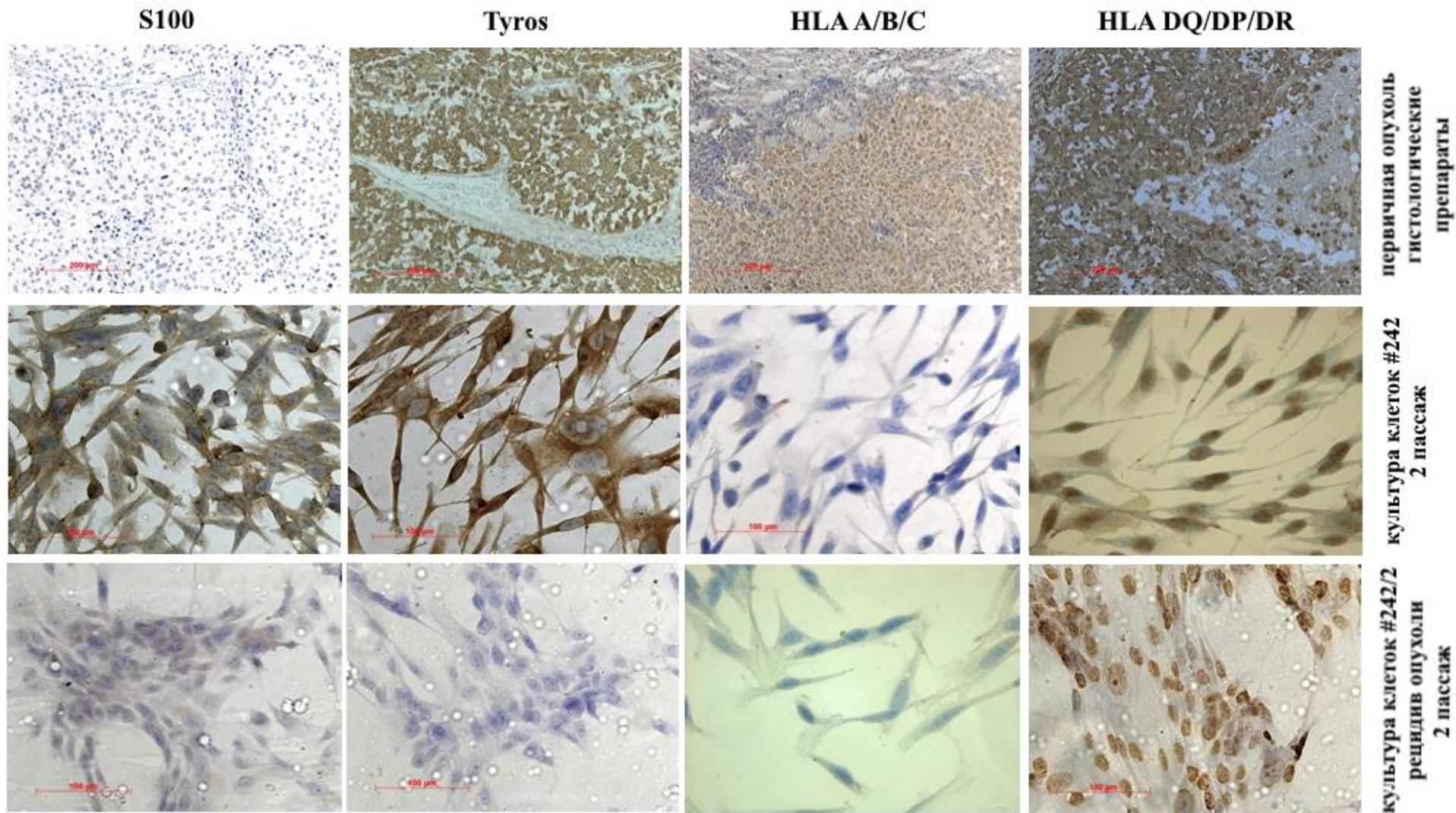


Рисунок 27 (окончание) – Потеря экспрессии OAA, антигенов HLA A/B/C и появление антигенов HLA DP/DQ/DR при прогрессии МК. Гистологический материал первичной опухоли, препараты культуры клеток #242, выделенных из первичной опухоли, и препараты культуры клеток #242/2, выделенных из рецидива опухоли большой СЛВ, 43 г. Метод иммуногистохимии, докрасивание гемалауном Майера

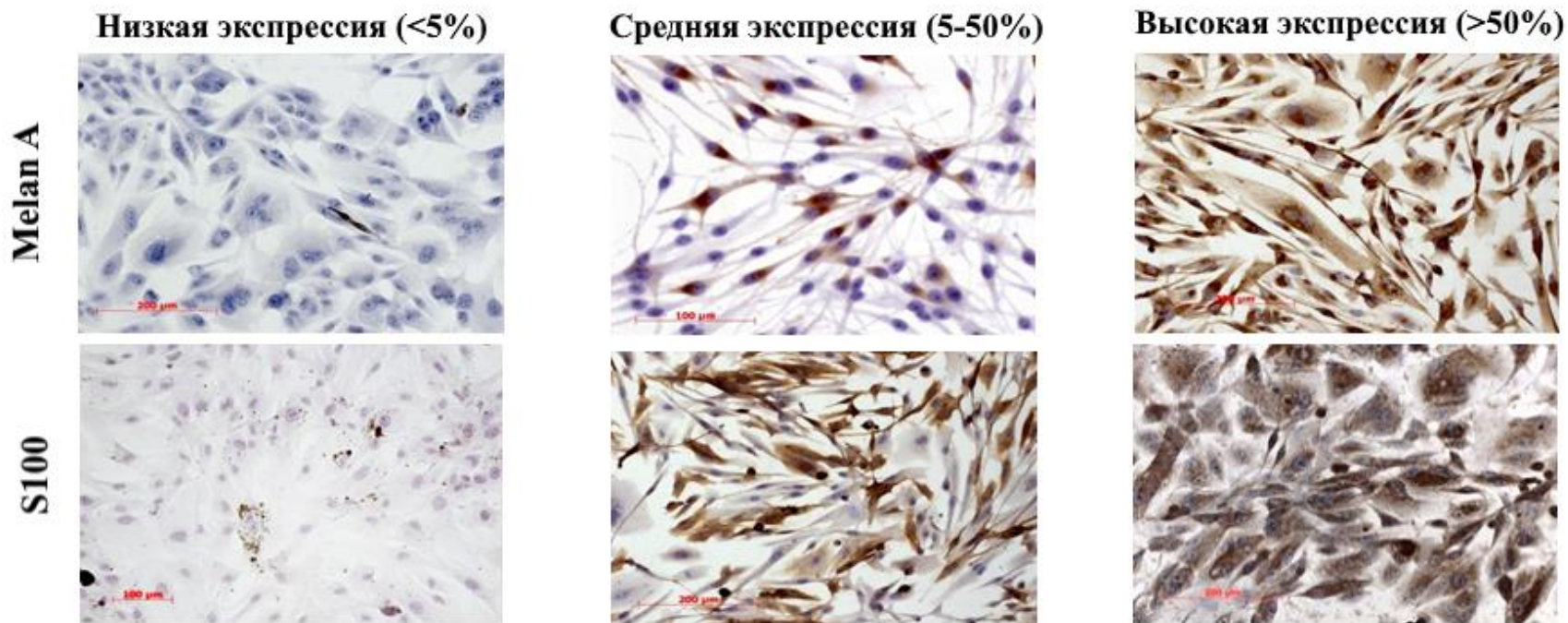
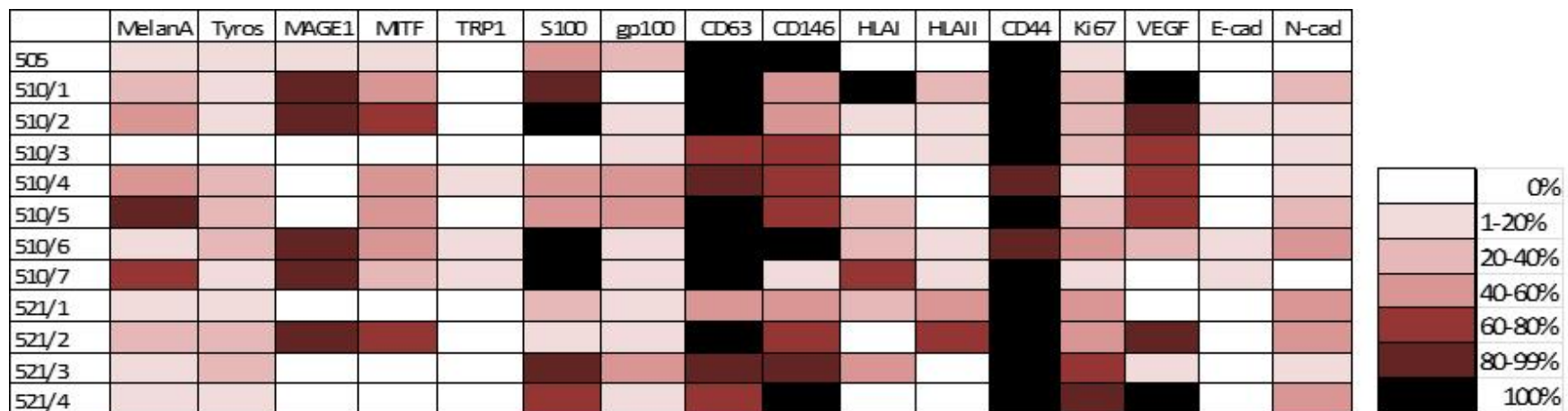


Рисунок 28 (начало) – Гетерогенность экспрессии ОАА в культивируемых клетках МК, выделенных из разных метастатических очагов в процессе опухолевой прогрессии у больной СНМ, 27 л.

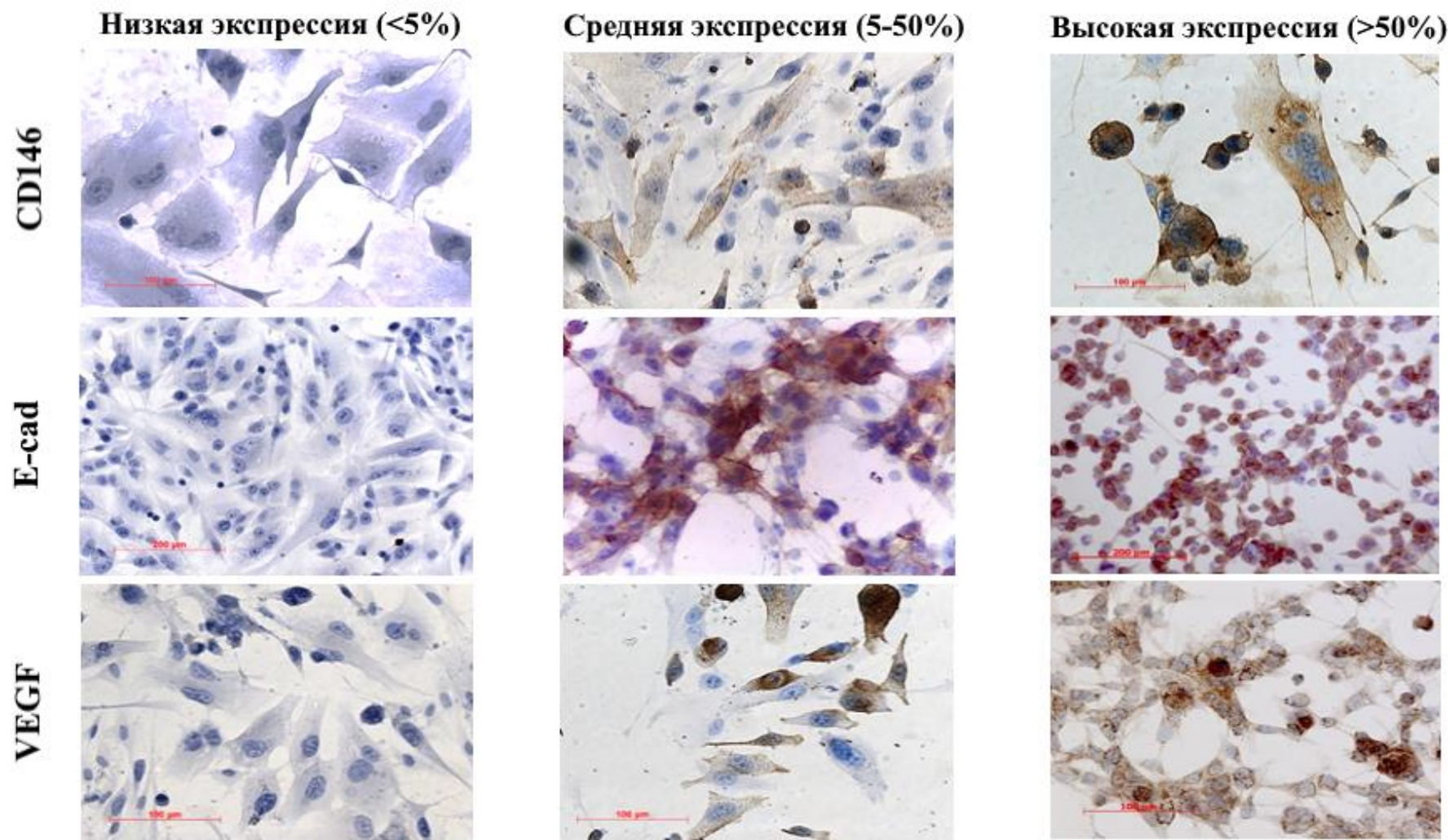


Рисунок 28 (окончание) – Гетерогенность экспрессии ОАА в культивируемых клетках МК, выделенных из разных метастатических очагов в процессе опухолевой прогрессии у больной СНМ, 27 л.

Lade-Keller J. и соавт. (2013) сообщили, что пониженная экспрессия E-кадгерина коррелировала с толщиной опухоли по Breslow и высокой экспрессией N-кадгерина при изучении гистологических образцов МК [522].

«Переключение» синтетического профиля кадгерина явилось неблагоприятным прогностическим признаком при оценке общей выживаемости больных МК ( $p=0,04$ ) и времени безрецидивной выживаемости ( $p=0,02$ ). Основным последствием подавления E-кадгерина является потеря стабильных адгезивных межклеточных контактов, что способствует высвобождению опухолевых клеток из первичного опухолевого очага [523]. N-кадгерин наделяет опухолевые клетки повышенной миграционной и инвазивной способностью, независимо от экспрессии E-кадгерина [524].

Таким образом, приобретение N-кадгерина, по-видимому, является критическим этапом в метастазировании злокачественных новообразований и прогрессировании заболевания.

Интегральный трансмембранный гликопротеин CD44, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции, является рецептором гиалуроновой кислоты, компонента внеклеточного матрикса, который экспрессируется стромальными и опухолевыми клетками, а также, возможно, некоторых других лигандов, таких как остеопонтин, коллаген и металлопротеиназы матрикса [525]. CD44 обнаруживается во многих типах стволовых клеток, и предполагается, что малигнизированные клетки, которые подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу, приобретают свойства, подобные свойствам стволовых клеток, и демонстрируют увеличение экспрессии CD44.

Более того, опухолевые клетки с подобным фенотипом проявляют повышенную инвазивность и более устойчивы к химиотерапии [526]. Выявление CD44 в 80–100% клеток во всех полученных культурах МК может рассматриваться как признак адаптации злокачественных клеток к росту *in vitro*, когда клетки оказываются в условиях отсутствия интегральных стимулов, присущих тканевым структурам.

При исследовании антигенных свойств клеток МК, полученных из различных метастатических очагов других пациентов, были обнаружены также различия в интенсивности экспрессии большей части изучаемых антигенов (табл. 11).

Таблица 11 – Иммуноцитохимическое изучение презентации ОАА клетками меланомы кожи, выделенными в процессе опухолевой прогрессии (5–10 пассаж)

Пациент/образец	АНТИГЕНЫ, % клеток											
	Melan A	Tyros	TRP-1	MITF	MAGE1	S100	gp100	CD63	CD146	HLA I	HLA II	Ki-67
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
СЛВ, 43 г. мтс паховый л/у рецидив м/тк	99 0	90 0	95 0	0 50	90 0	99 0	95 5	90 82	0 40	100 0	50 100	53 98
ГАА, 26 л. мтс подмышечный л/у мтс паховый л/у	54 86	35 45	100 10	80 60	20 0	0 90	100 50	10 10	10 100	80 40	55 82	80 99
ЖНВ, 35 л. мтс подмышечный л/у мтс паховый л/у	10 5	5 0	10 22	0 10	15 35	60 88	90 35	100 100	5 2	90 75	100 60	35 15
ТАВ, 31 г. мтс подмышечный л/у мтс паховый л/у	55 45	85 70	65 0	20 80	85 40	10 25	90 0	10 15	75 85	20 25	85 95	20 45
МAB, 52 г. мтс подмышечный л/у мтс паховый л/у	60 12	25 35	60 5	0 100	0 98	0 100	0 95	95 98	0 50	0 100	50 0	10 15
ССА, 38 г. мтс подмышечный л/у мтс паховый л/у	28 65	45 15	75 20	90 93	0 66	55 25	60 50	60 35	90 30	0 0	100 98	47 25
НЛИ, 68 л. мтс мягкие ткани мтс подчелюстной л/у	55 35	10 15	10 0	40 60	15 20	100 90	90 70	20 10	10 60	15 0	15 45	42 50

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
КГА, 68 л.												
мтс шейный л/у	25	10	0	95	70	100	100	80	95	98	80	80
мтс дмышечный л/у	40	25	10	95	100	100	40	20	90	0	100	90
СНМ, 27 л.												
мтс мягкие ткани	5	5	0	1	1	50	20	100	100	0	0	10
мтс мягкие ткани	20	5	0	50	95	85	0	100	50	100	20	65
мтс мягкие ткани	50	15	0	70	98	100	10	100	55	20	2	30
мтс мягкие ткани	0	0	0	0	0	0	3	70	80	0	10	25
мтс мягкие ткани	45	20	0,5	40	0	45	50	88	75	0	0	15
мтс мягкие ткани	90	30	0	50	0	40	50	100	70	20	0	20
мтс мягкие ткани	5	25	5	50	90	100	5	100	100	30	0,5	52
мтс мягкие ткани	60	10	0,5	35	80	100	10	100	10	76	0,5	15
мтс мягкие ткани	5	0,5	0	0	0	90	0,5	100	100	0	0	90
мтс мягкие ткани	60	33	0	75	90	15	10	100	75	0	68	49
мтс мягкие ткани	10	35	0	0	0	95	54	90	83	40	0	68
мтс мягкие ткани	0,5	0,5	0	0	0	25	5	60	50	30	55	52
ПВИ, 53 л.												
мтс мягкие ткани	80	60	10	50	20	5	100	10	100	40	75	35
мтс мягкие ткани	70	80	75	20	5	50	65	90	20	10	80	10
АНН, 66 л.												
мтс мягкие ткани	90	40	25	100	60	5	60	20	75	10	60	90
мтс легкое	15	5	0	50	90	25	75	0	85	0	80	40

Примечание: мтс – метастаз; л/у – лимфатический узел; м/тк – мягкие ткани.

Дивергенция антигенного фенотипа клеток МК, выделенных из метастатических очагов, локализующихся в подмышечных и паховых лимфатических узлах, проиллюстрирована на примере материала, полученного у пациента ЖНВ, 35 л. (рис. 29). Анализ присутствия ОАА в гистологических образцах метастазов данного больного продемонстрировал различия в экспрессии изучаемых антигенов, которые сохранялись на первых пассажах в культурах злокачественных клеток. Дальнейшее пассирование приводило к потере антигенной презентации, которая имела также различный характер, что видно на примере анализа образцов пациента ГАА, 26 л. (рис. 30).

В этой связи интересной представляется работа Bartlett E.K. и соавт. (2014), которые изучили более 3000 гистологических образцов метастатических меланом человека на предмет экспрессии дифференцировочных антигенов (gp100, MART-1 и тирозиназа), а также антигенов МНС I и II класса. Они обнаружили, что имеется не стохастическая, а филогенетически обусловленная закономерность в экспрессии антигенов в метастатической меланоме, выражающаяся в различии экспрессии в зависимости от анатомического расположения метастаза. Самая высокая экспрессия меланомо-ассоциированных антигенов была выявлена в метастазах головного мозга, экспрессия средней степени – в мягких тканях/лимфатических узлах, и самой низкой экспрессией характеризовались висцеральные метастазы. Таким образом, обнаруженная сайт-специфическая антигенная гетерогенность МК может иметь большое значение для оценки чувствительности к антиген-специфической иммунотерапии и разработки новых стратегий в этой области.

В настоящее время накапливаются данные, подтверждающие, что эффективность активной специфической иммунотерапии МК, наряду с системными факторами, определяющими функционирование иммунной системы, зависит от биологии злокачественных клеток, в том числе от степени экспрессии специфических антигенов и антигенов МНС I и II класса.

Опубликованы работы, позволяющие связать наличие ОАА на клетках МК с благоприятным прогнозом и увеличением продолжительности жизни больных, в частности, это касается повышенного уровня экспрессии тирозиназы и тирозиназоподобного белка TRP-2 [527], gp100, HLA A/B/C, HLA DQ/DP/DR [528]. De Vries T.J. и соавт. (2001) получены результаты при изучении присутствия ОАА в гистологических образцах первичных опухолей, регионарных, висцеральных метастазов, метастатических поражений лимфатических узлов при диссеминации процесса у 80 пациентов, указывающие, что экспрессия Melan A, gp100 и тирозиназы существенно не менялась в ходе прогрессии опухоли, что, по мнению исследователей, очень важно для развития такого подхода как вакциноterapia [529].

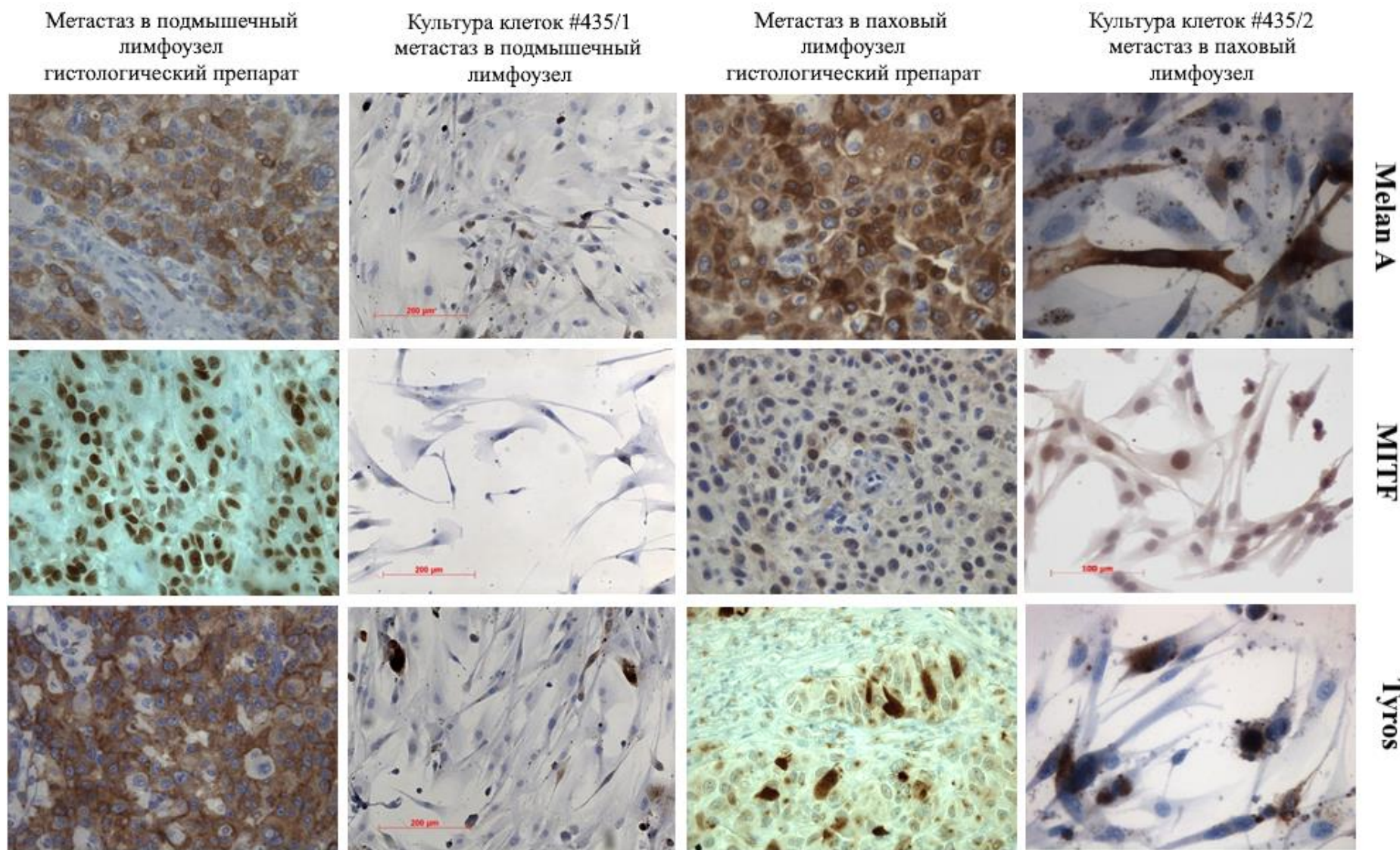


Рисунок 29 (начало) – Гетерогенная экспрессия ОАА, выявляемая в культивируемых клетках МК больного ЖНВ, 35 л., выделенных из образцов метастатической опухоли в подмышечных и паховых лимфатических узлах, и в гистологических образцах.

Гистологические препараты – ув. ×400, цитологические препараты – масшт. линейка 100 и 200 мкм.

Метод иммуноцитохимии, докрашивание гемалауном Майера

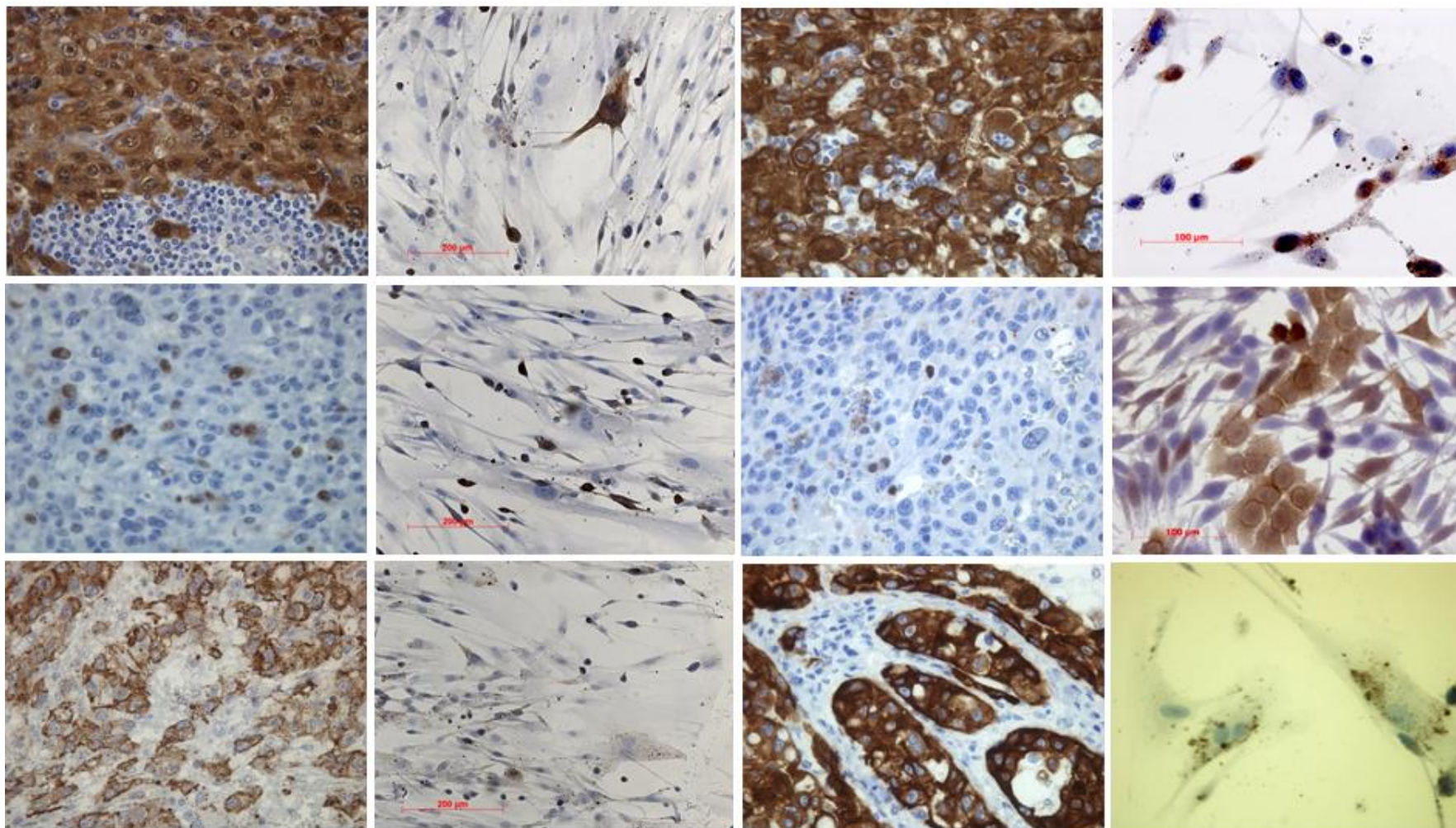


Метастаз в подмышечный  
лимфоузел  
гистологический препарат

Культура клеток #435/1  
метастаз в подмышечный  
лимфоузел

Метастаз в паховый  
лимфоузел  
гистологический препарат

Культура клеток #435/2  
метастаз в паховый  
лимфоузел



S100

MAGG1

Grp100

Рисунок 29 (продолжение) – Гетерогенная экспрессия ОАА, выявляемая в культивируемых клетках МК больного ЖНВ, 35 л., выделенных из образцов метастатической опухоли в подмышечных и паховых лимфатических узлах, и в гистологических образцах. Гистологические препараты – ув.  $\times 400$ , цитологические препараты – масштабная линейка 100 и 200 мкм.

Метод иммуноцитохимии, докрасивание гемалауном Майера

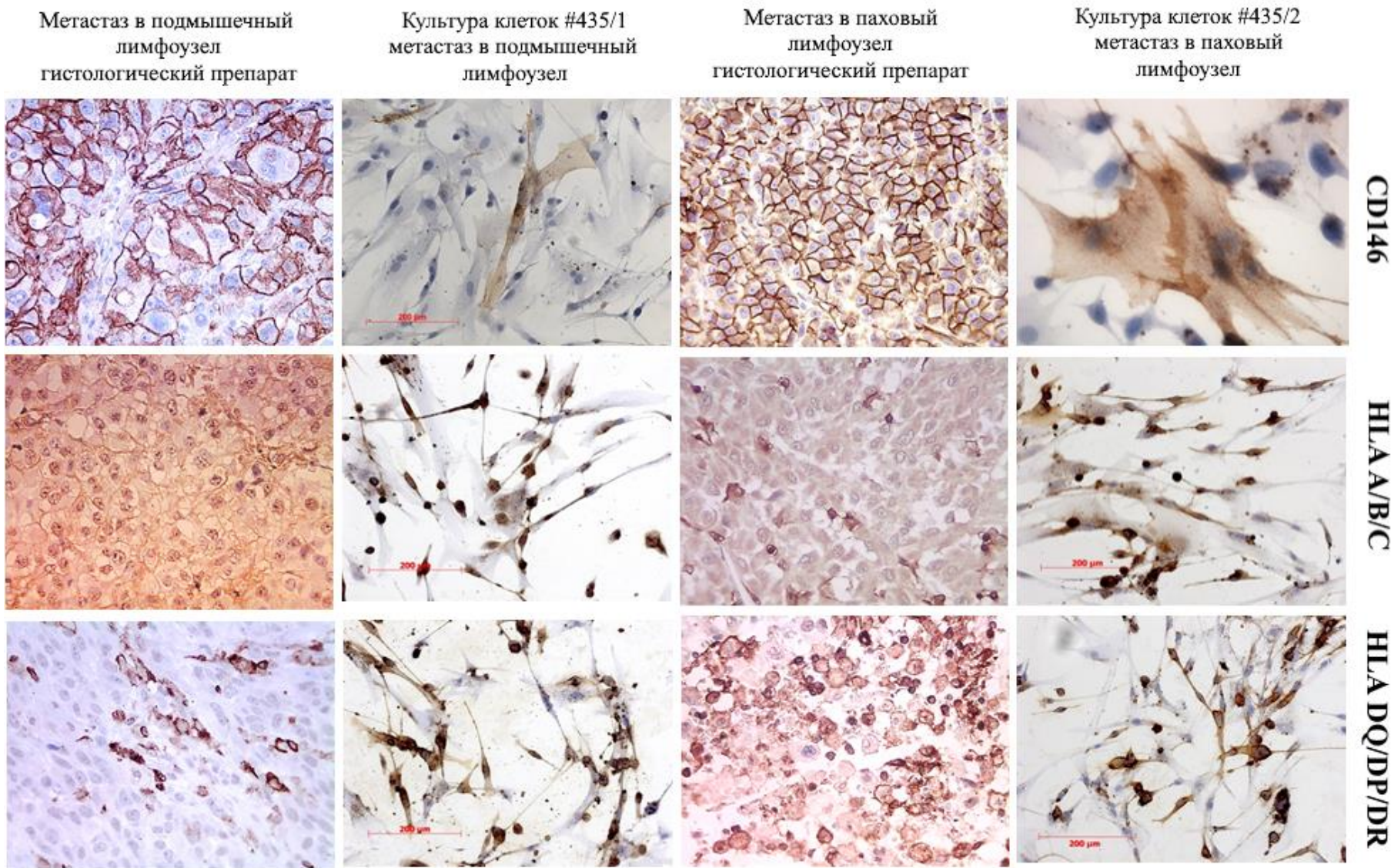


Рисунок 29 (окончание) – Гетерогенная экспрессия ОАА и антигенов МНС I и II класса, выявляемая в культивируемых клетках МК больного ЖНВ, 35 л., выделенных из образцов метастатической опухоли в подмышечных и паховых лимфатических узлах, и в гистологических образцах. Гистологические препараты – ув.  $\times 400$ , цитологические препараты – масшт. линейка 100 и 200 мкм.

Метод иммуноцитохимии, докрашивание гемалауном Майера

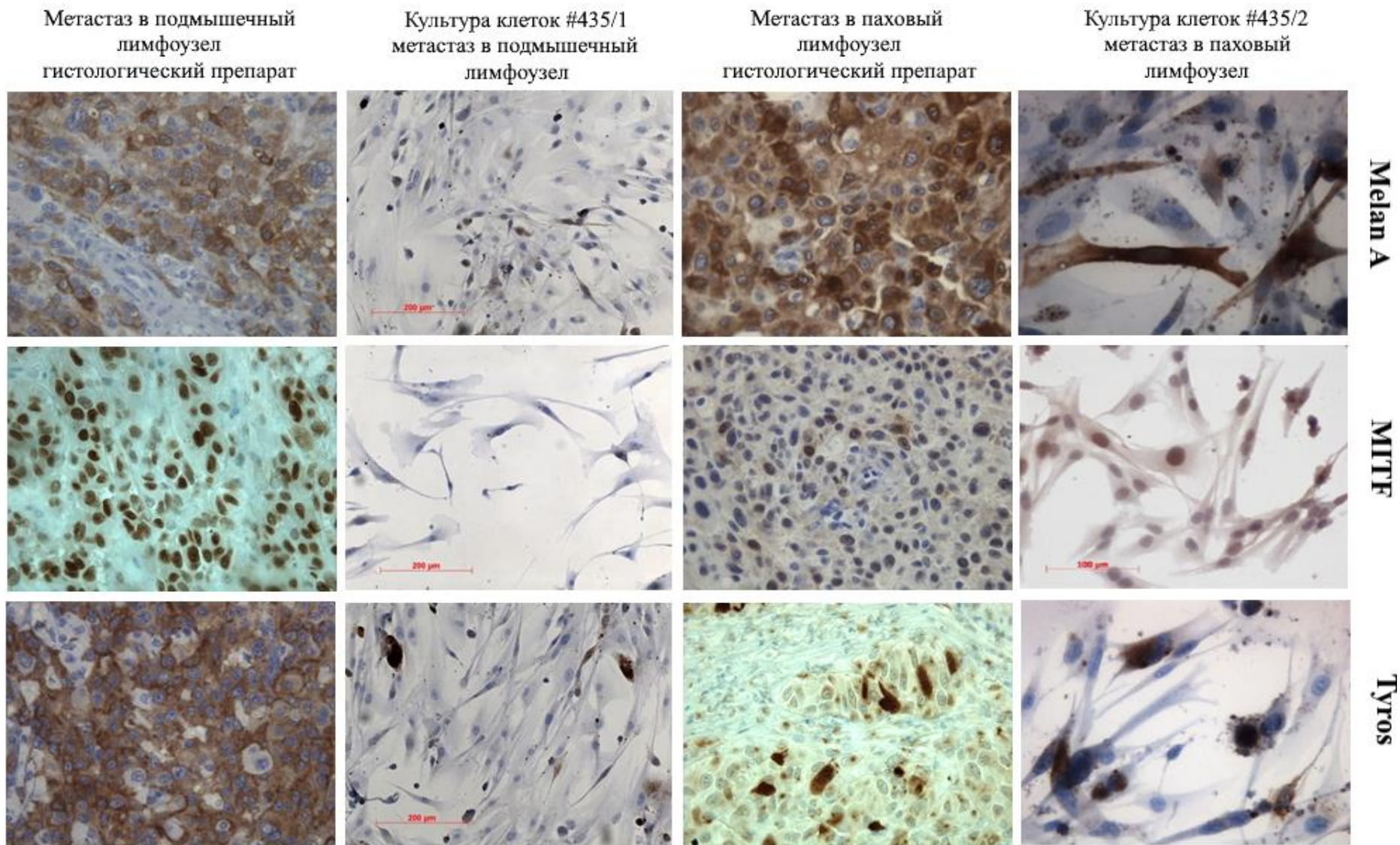


Рисунок 30 (начало) – Гетерогенная экспрессия ОАА, выявляемая в культивируемых клетках МК больного ГАА, 26 л., выделенных из образцов метастатической опухоли в подмышечных и паховых лимфатических узлах. Масштабная линейка 100 и 200 мкм. Метод иммуноцитохимии, докрасивание гемалауном Майера

Культура МК #335/1, полученная из подмышечного лимфоузла  
5 пассаж

43 пассаж

Культура МК #335/2, полученная из пахового лимфоузла  
5 пассаж

45 пассаж

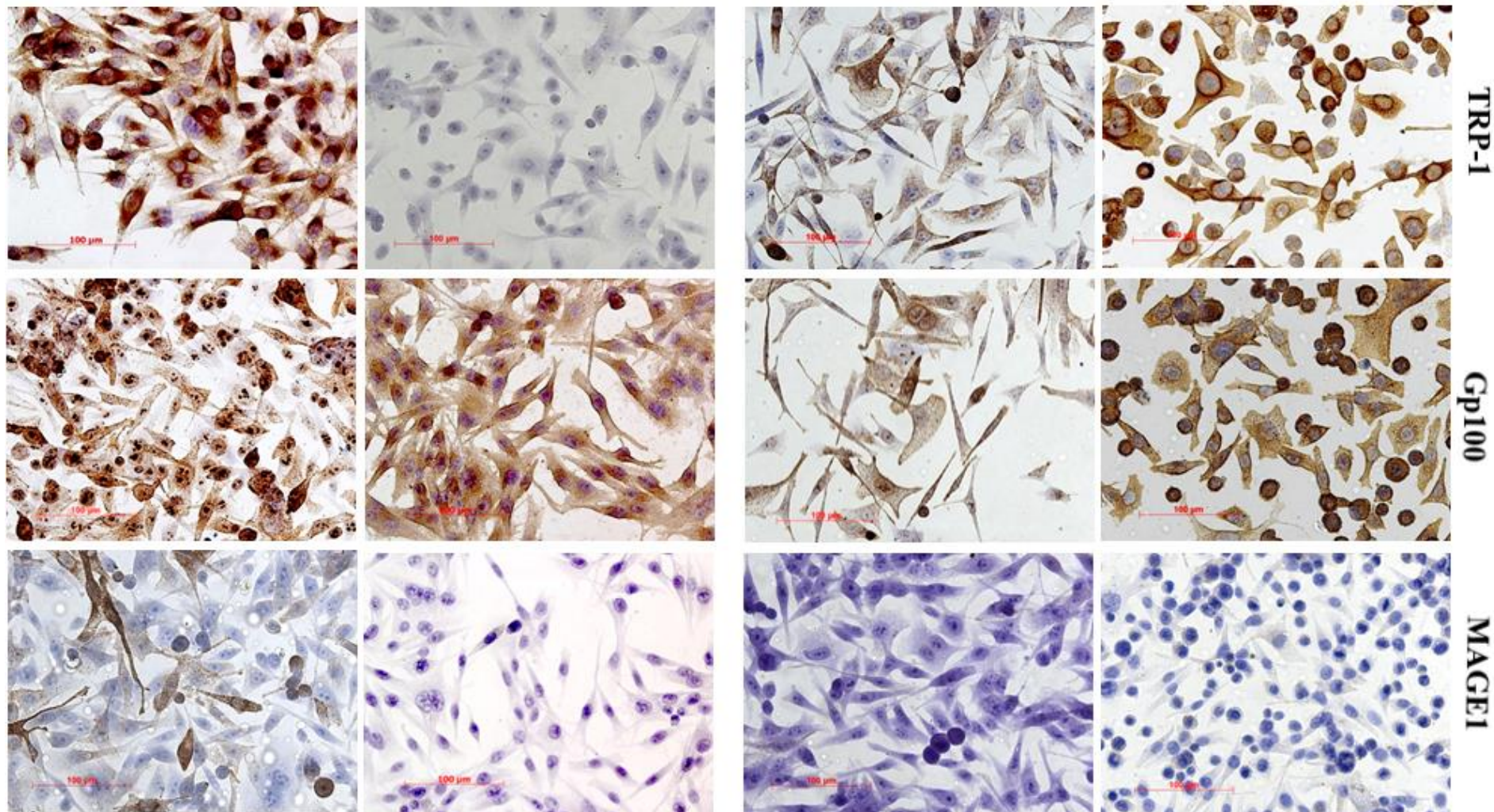


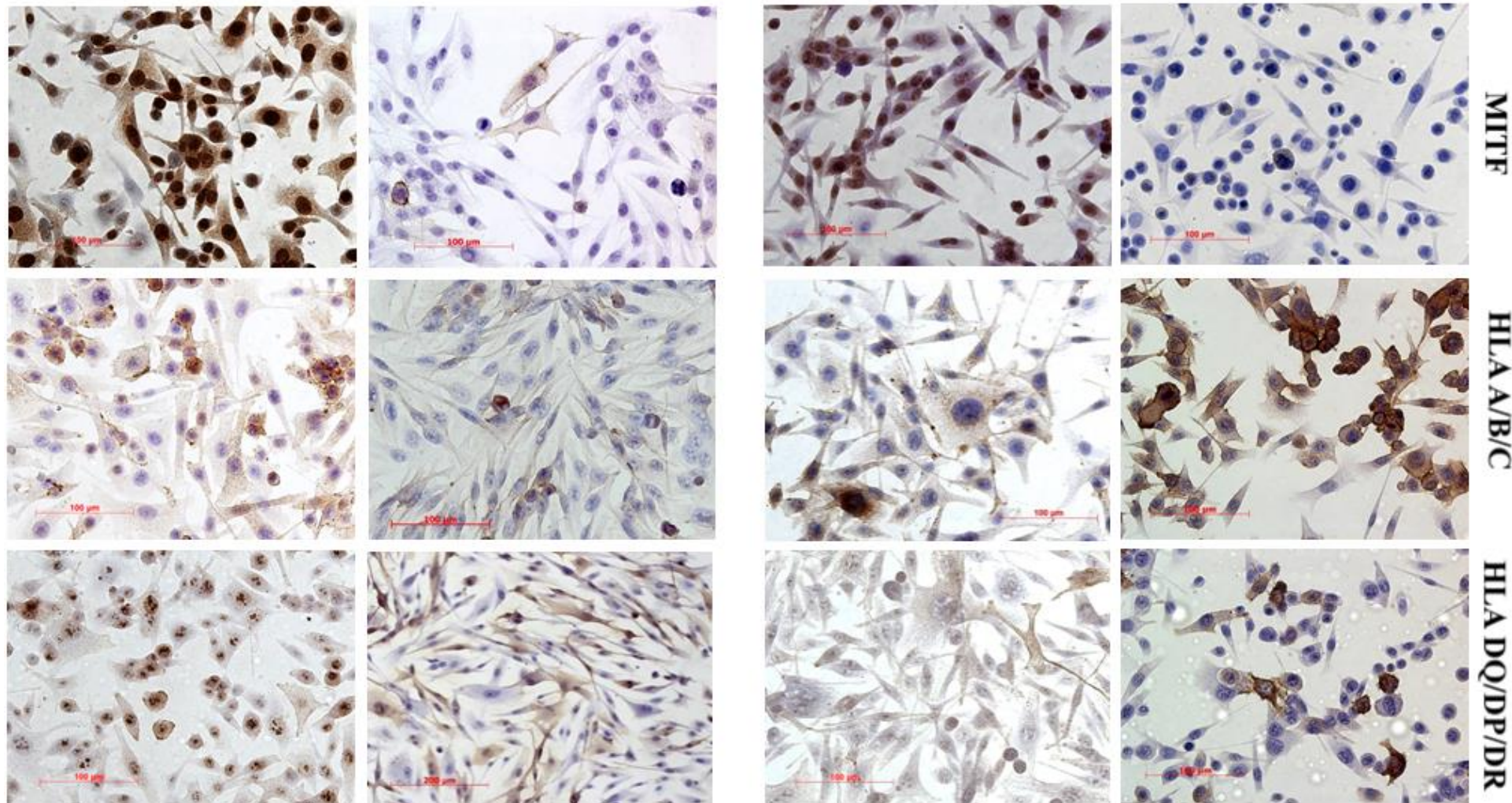
Рисунок 30 (продолжение) – Гетерогенная экспрессия ОАА, выявляемая в культивируемых клетках МК больного ГАА, 26 л., выделенных из образцов метастатической опухоли в подмышечных и паховых лимфатических узлах. Масштабная линейка 100 и 200 мкм. Метод иммуноцитохимии, докрасивание гемалауном Майера

Культура МК #335/1, полученная из подмышечного лимфоузла  
5 пассаж

43 пассаж

Культура МК #335/2, полученная из пахового лимфоузла  
5 пассаж

45 пассаж



MTF

HLA A/B/C

HLA DQ/DR/DP

Рисунок 30 (окончание) – Гетерогенная экспрессия ОАА и антигенов МНС I и II класса, выявляемая в культивируемых клетках МК больного ГАА, 26 л., выделенных из образцов метастатической опухоли в подмышечных и паховых лимфатических узлах. Масштабная линейка 100 и 200 мкм. Метод иммуноцитохимии, докрасивание гемалауном Майера

По нашим данным, *in vitro* биологические свойства клеток МК эволюционируют достаточно быстро: накапливаются изменения, благоприятствующие усилению метастатических и инвазивных способностей, такие как потеря ОАА и антигенов МНС I класса, появление или усиление экспрессии антигенов МНС II класса, усиление экспрессии ряда адгезивных молекул (CD146), обеспечивающих подвижность и взаимодействие с другими клетками, например, эндотелием, интенсификация процессов пролиферации (увеличение количества клеток, экспрессирующих антиген Ki-67). Вероятно, наблюдаемые явления могут быть объяснены отсутствием сложных коррелятивных стимулов, присутствующих в организме и осуществляющих регуляцию процессов злокачественной прогрессии.

Как известно, именно накопление генетических изменений ассоциировано с появлением инвазивных и метастатических способностей клеток опухоли, то есть с эволюцией их биологических свойств [530]. Усиление гетерогенности антигенных особенностей культивируемых клеток МК в процессе длительного пассирования сопровождается возникновением новых многочисленных дивергентных клеточных клонов с различными цитогенетическими характеристиками, о чем можно судить, в частности, по данным анализа хромосомного дисбаланса в клетках.

В нашем исследовании большинство клеточных линий на поздних пассажах (>35) полностью теряли способность экспрессировать ОАА, такие как Melan A, Tyros, TRP-1, S100. Значительно уменьшалось количество клеток, продуцирующих антигены gp100, MITF, и увеличивалось число  $MAGE1^+$ -клеток, при этом можно было наблюдать окрашивание не только ядра, но и цитоплазмы и цитоплазматической мембраны. Как правило, сохранялся или уменьшался синтез поверхностных молекул, таких как CD63, и возрастало присутствие CD146. В результате длительного культивирования только 16 клеточных линий МК на 100 пассаже продолжали экспрессировать в значимом количестве (более 60% клеток в поле зрения) все исследуемые антигены. В то же время на поздних пассажах полное отсутствие окрашивания на все исследуемые антигены наблюдали в 24 случаях. В большинстве культур всегда присутствовало небольшое количество клеток (1–5%), которые продолжали синтезировать изучаемые молекулы, что можно объяснить существованием феномена, когда, наряду с новыми клонами, сохраняются клетки с генотипом первичной опухоли. Schmidt-Kittler O. и соавт. (2003) провели цитогенетические исследования культур МК, выделенных от разных пациентов, и установили, что специфический набор хромосомных маркеров, идентифицированный у каждой индивидуальной клеточной линии МК, сохраняется в процессе пассирования [531].

Были также получены интересные результаты, которые продемонстрировали, что антигены МК (Melan A и тирозиназа) полностью отсутствуют в клетках, экспрессирующих CD271, рецептор фактора роста нервов, в то время как присутствуют на более

дифференцированной популяции CD271<sup>+</sup>-клеток МК [532]. При этом экспрессия CD271 в высокой степени коррелирует с присутствием плазматического трансмембранного белка ABCB5, и было показано, что клетки МК, подобные стволовым, положительные по экспрессии ABCB5, продуцируют значительно более низкие уровни антигенов MART-1, ML-IAP, NY-ESO-1 и MAGE-A, чем их более дифференцированное «потомство» [533; 534]. Эти исследования однозначно демонстрируют, что гетерогенность МК, обусловленная присутствием клеток, иницирующих опухоль, и их потомства, экспрессирующие другой репертуар антигенов, должна приниматься во внимание при разработке протоколов клеточной иммунотерапии.

Большинство исследований экспрессии ОАА клетками МК сосредоточено на изучении гистологических образцов, однако специалисты, работающие в области культивирования клеток, сообщают, что клетки МК в культуре теряют способность синтезировать Melan A, gp100, тирозиназу [535]. Наблюдается высокая индивидуальная вариабельность присутствия исследуемых антигенов и в то же время – значительная гетерогенность в пределах культур злокачественных меланоцитов, когда из клеток опухоли одного пациента выделяют два-три субклона с различными антигенными характеристиками [536]. Haridas P. и соавт. (2016) изучали экспрессию трех маркеров меланомы – S100, HMB-45 и Melan A в клеточных линиях МК и обнаружили, что данные антигены полностью отсутствуют в некоторых клеточных линиях и не могут служить надежным диагностическим инструментом в подобных случаях [537].

В контексте противоопухолевой клеточной иммунотерапии большое значение имеет экспрессия антигенов HLA I класса, так как присутствие этих антигенов обеспечивают эффективное распознавание опухолевых клеток ЦТЛ. Иммуногистохимическое изучение таковой Kageshita T. и соавт. (1999) в тканях первичных меланом и метастатических поражений показало, что отсутствие или низкий уровень антигенов HLA I класса характерен для 58% образцов первичных опухолей и 52% – для метастазов, при этом имела место корреляция со стадией заболевания, продолжительностью времени до прогрессирования и выживаемостью пациентов [538].

В нашей работе при определении антигенов HLA A/B/C с помощью моноклональных антител на культивируемых клетках МК практически сразу же после их выделения из ткани опухоли 41,1% культур не синтезировали данные молекулы. При дальнейшем пассировании наблюдали в культурах, где была зафиксирована экспрессия HLA A/B/C, тенденцию к уменьшению или прекращению продукции этих антигенов. Известно, что нарушения экспрессии антигенов HLA I класса представляют собой дополнительный признак агрессивности злокачественных клеток. Отсутствие этих антигенов облегчает «уклонение»

опухолевых клеток от распознавания и уничтожения, опосредованного ЦТЛ [539]. Garrido F. и соавт. (2019) предположили, что подавление или потеря опухолью антигенов МНС I класса можно классифицировать как «мягкие» и «жесткие» изменения, в зависимости от того, является ли потеря экспрессии МНС I обратимой (например, подавление транскрипции) или нет (например, потеря обеих копий такого гена, как *B2M*) [82]. В зависимости от типа таких изменений можно предложить два типа иммунотерапевтических воздействий: 1) восстановление экспрессии антигенов HLA I класса на поверхности злокачественных клеток и реактивности CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и 2) «перенаправление» иммунного распознавания [540].

Кроме того, может рассматриваться «неиммунная» функция антигенов HLA класса I [541]. В частности, достаточно давно обнаружено, что антигены HLA I класса у людей и их аналоги у мышей играют роль в популяционной организации клеток, регулируя контактное ингибирование их движения [542]. Кроме того, предполагается потенциальная роль этих антигенов в метаболизме клеток, так как выявлен феномен взаимодействия с рецептором инсулина, эпидермальным фактором роста и IL-2. Peppicelli S. и соавт. (2019) продемонстрировали *in vitro*, что под влиянием антител, специфичных к HLA/B/C, происходило метаболическое перепрограммирование, заключающееся в блокаде процессов гликолиза и усилении митохондриального дыхания в культивируемых злокачественных меланоцитах, что было ассоциировано с ингибированием их амебоидной подвижности [543].

Иммуноцитохимическое исследование HLA DP/DQ/DR в культурах клеток МК при длительном культивировании демонстрирует появление экспрессии этих антигенов в 94% образцов. В литературе сообщают о взаимосвязи выявления антигенов HLA II класса и дальнейшего прогрессирования заболевания. В частности, обнаружена корреляция между присутствием HLA-DR и толщиной опухоли по Breslow (>1,5 мм) [544]. Исследования 35 образцов первичных опухолей меланомы глаза показали отсутствие экспрессии HLA II класса в 100% случаев, однако в метастатических образованиях, локализующихся в печени, антиген выявили в 40% случаев [545]. Кроме того, ряд исследователей связывают присутствие этих антигенов на клетках меланом с плохим прогнозом [546]. Однако более поздние исследования показали, что экспрессия антигенов МНС II класса положительно коррелировала с присутствием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, наличием регресса поражения, а также с увеличением времени до прогрессирования и временем жизни пациентов [547]. В то же время при сходном изучении костимулирующих молекул B7.1 и B7.2 подобной корреляции выявлено не было, поэтому предполагается, что экспрессия клетками меланомы МНС II класса может служить маркером биологических свойств опухоли, но точные иммунопатологические механизмы этих процессов еще предстоит установить. С другой стороны, уже идентифицированы среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов CD4<sup>+</sup>-клетки,



способные распознавать клетки меланомы, несущие белки TRP-1, TRP-2 в контексте с HLA-DR, также присутствующими на их поверхности, что расширяет возможности иммунотерапии [548]. Интересно, что в настоящее время МК, так же как карциномы легких, рассматриваются как опухоли с высокой мутационной нагрузкой, которые имеют в том числе мутации антигенов HLA I и II класса, которые выступают в качестве мишеней для разработки иммунотерапии на основе Т-лимфоцитов [549]. Один из механизмов, с помощью которого опухоли уклоняются от распознавания Т-клеток, заключается в нарушении процессинга антигена HLA I, что приводит к подавлению регуляции этих молекул на поверхности малигнизированных клеток и тем самым создает «невидимый» фенотип опухоли. Предполагается, что Т-клетки, направленные против мутантного антигенного репертуара, будут ценным инструментом для нацеливания на иммуно-редактируемые опухоли, которые приобрели устойчивость к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

### **3.2.2. Экспрессия опухолеассоциированных антигенов культивируемыми клетками эпителиальных опухолей, сарком мягких тканей и остеогенных сарком, выявляемая методами иммуноцит- и гистохимии**

Клетки опухолей эпителиального происхождения (РП, РПЖ, КРР, РМЖ, РЯ), выделенные из фрагментов злокачественных новообразований больных, были изучены на присутствие цитокератинов, которые являются специфическими компонентами цитоскелета нормальных и злокачественных эпителиальных клеток [550]. Цитокератины хорошо зарекомендовали себя как маркеры в диагностической патоморфологии для выявления и классификации опухолей эпителиального происхождения (карцином), которые составляют примерно 90% всех онкологических заболеваний во всем мире [90; 551]. Однако цитокератины представляют интерес не только как «биологические маркеры», имеющие диагностическую ценность, но и вследствие их биологической роли в процессах диссеминации и метастазирования опухолевых клеток [551].

В нашем исследовании для анализа клеток всех нозологических форм опухолей был использован коктейль антител МСК, который проявляет широкую реактивность с двумя семействами цитокератинов и пригоден для идентификации семейства кислых цитокератинов (тип I) с молекулярной массой 56,5, 50, 50, 48 и 40 кДа, а также основных цитокератинов (тип II) с 65 по 67, 64, 59, 58, 56 и 52 кДа. Этот способ идентификации цитокератинов применялся на ранних этапах культивирования для подтверждения гистотипической принадлежности выделенных клеток и затем – в процессе длительного культивирования – для изучения динамики экспрессии цитокератинов опухолевыми клеточными культурами эпителиального происхождения. Кроме того, исследовали присутствие отдельных цитокератинов I типа (СК18, СК19, СК20), II типа (СК7, СК8), имеющих диагностическую

ценность. Изучали также присутствие эпителиального мембранного антигена (ЕМА), принадлежащего к гетерогенному семейству высокогликозилированных трансмембранных белков, который выявляется во многих видах аденокарцином.

Было установлено, что во всех культурах опухолевых клеток ЭО на ранних пассажах (<10), независимо от нозологии, выявляются цитокератины, что совпадает с количественной идентификацией антигенов МСК в исходных тканях злокачественных новообразований (рис. 31). На начальных этапах культивирования в большом проценте случаев диагностическим маркером для подтверждения гистотипической принадлежности служил также антиген ЕМА (рис. 32). После адаптации к условиям *in vitro* большинство культур клеток КРР, РЯ продолжали экспрессировать специфические ОАА, такие как антигены CDX2 и СА-125 (рис. 33). Было проанализировано 72 культуры РП на ранних пассажах на предмет выявления семейств цитокератинов (МСК) – цитокератинов СК18, СК19, ЕМА, виментина, раково-тестикулярных антигенов семейства MAGE1, специфического антигена RCC, гликопротеина с молекулярным весом 200 кД, локализующегося в клетках проксимального отдела почечных канальцев, маркера пролиферации Ki-67 и антигенов HLA A/B/C, HLA DQ/DP/DR (рис. 34). Все культуры РП на начальном этапе культивирования экспрессировали цитокератины МСК и виментин, что совпадало с результатами, полученными при иммуногистохимическом анализе ткани опухоли.

При этом продукция СК18 и СК19 несколько снижалась при переводе клеток в культуру: данные цитокератины выявляли в среднем в 40,4% и 16,6% клеток в культуре, в 45,02% и 18,9% – в ткани опухоли, соответственно. Практически все исследованные культуры РП были получены из светлоклеточного почечно-клеточного рака, для которого характерно присутствие СК8 и СК18 с незначительной экспрессией СК19 [552]. Ряд исследователей указывают, что иммуногистохимически неопластические клетки светлоклеточного почечно-клеточного рака демонстрируют присутствие антигенов ЕМА, RCC, отсутствие экспрессии СК7, высокомолекулярных цитокератинов, Е-кадгерина [553]. В то же время есть данные, что для этого типа опухолей коэкспрессия СК7 и СК19 связана с отсутствием цитогенетических изменений и благоприятным клиническим прогнозом заболевания, тогда как обнаружение СК8/18-позитивных циркулирующих опухолевых клеток коррелирует с метастатическим процессом и низкой общей выживаемостью при РП [554; 555].

Считается, что маркер RCC достаточно специфичен для светлоклеточного почечно-клеточного рака, однако ряд исследований продемонстрировал присутствие этого гликопротеина в клетках других опухолей, таких как злокачественные новообразования коры надпочечников, толстой кишки, молочной железы, предстательной железы, яичников, легких, меланомы и злокачественная мезотелиома [556].

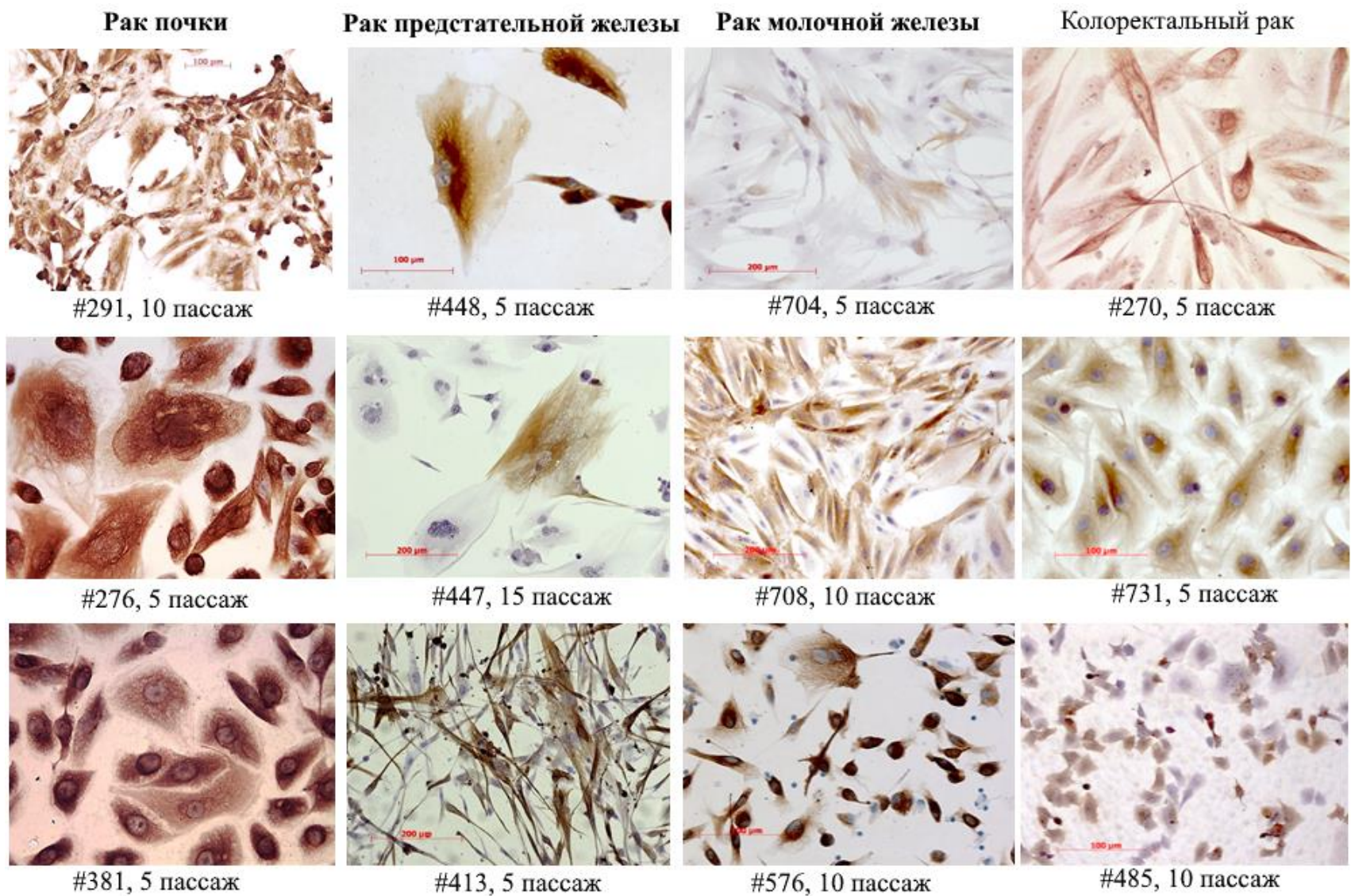


Рисунок 31 – Иммуноцитохимическое выявление экспрессии цитокератинов МСК культивируемыми клетками опухолей эпителиального происхождения. Масштабная линейка 100 и 200 мкм. Докрашивание гемалауном Майера

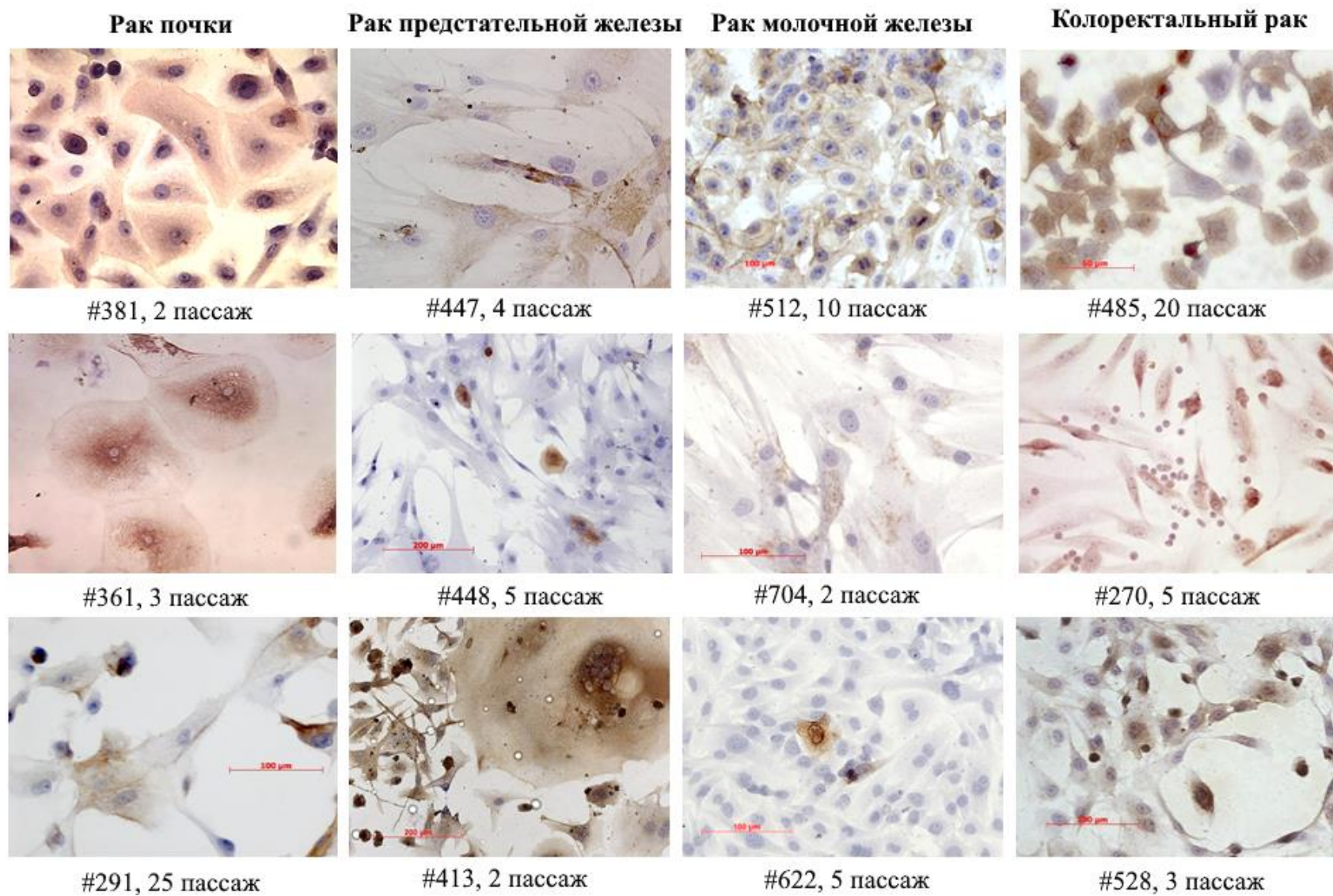


Рисунок 32 – Иммуноцитохимическое выявление экспрессии антигена ЕМА культивируемыми клетками опухолей эпителиального происхождения. Масштабная линейка 50, 100 и 200 мкм. Докрашивание гемалауном Майера

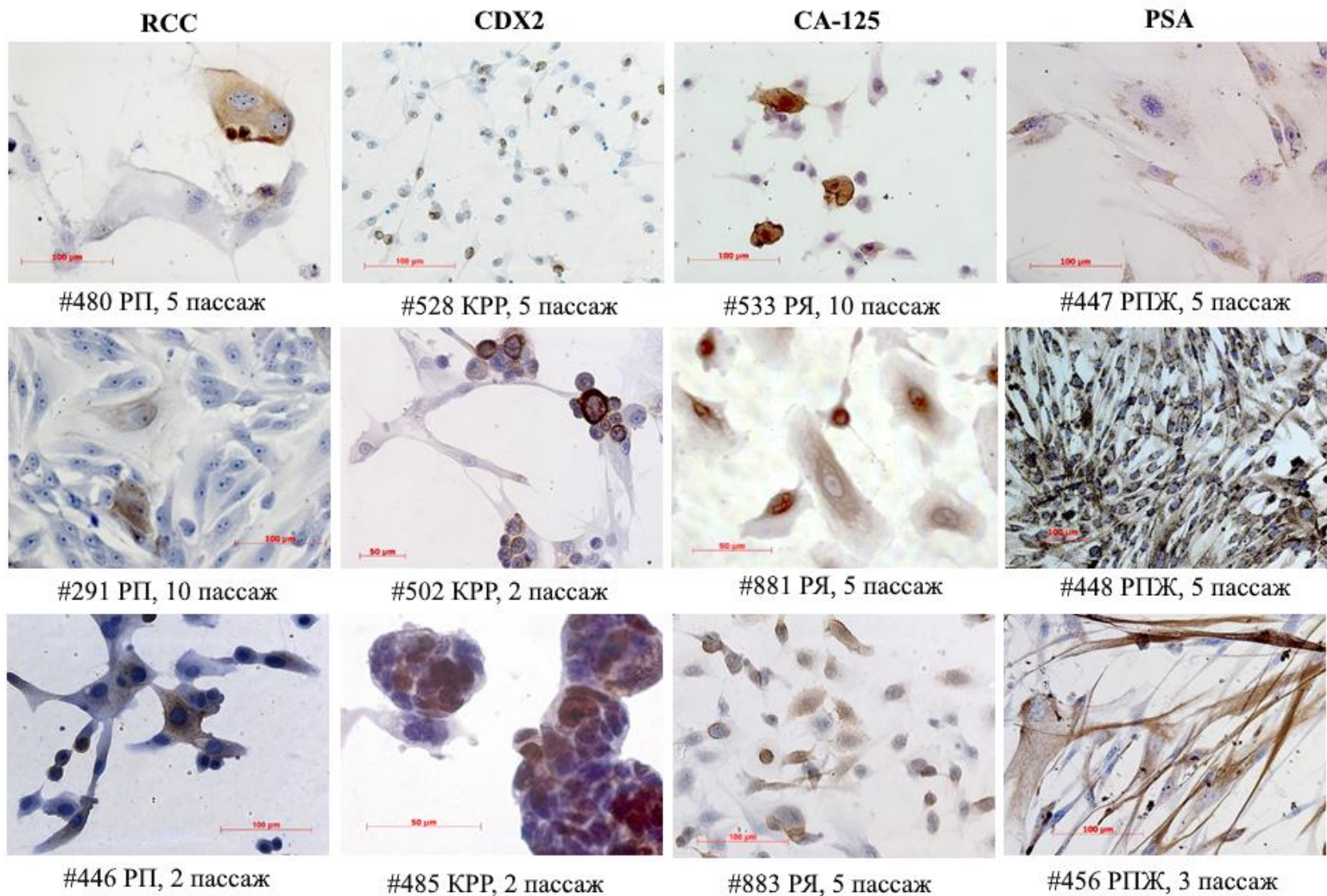
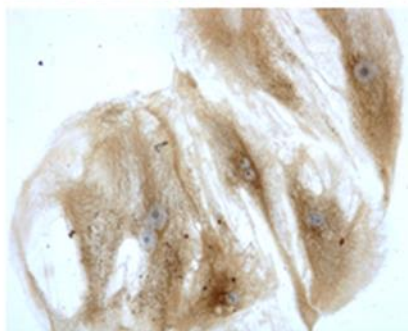
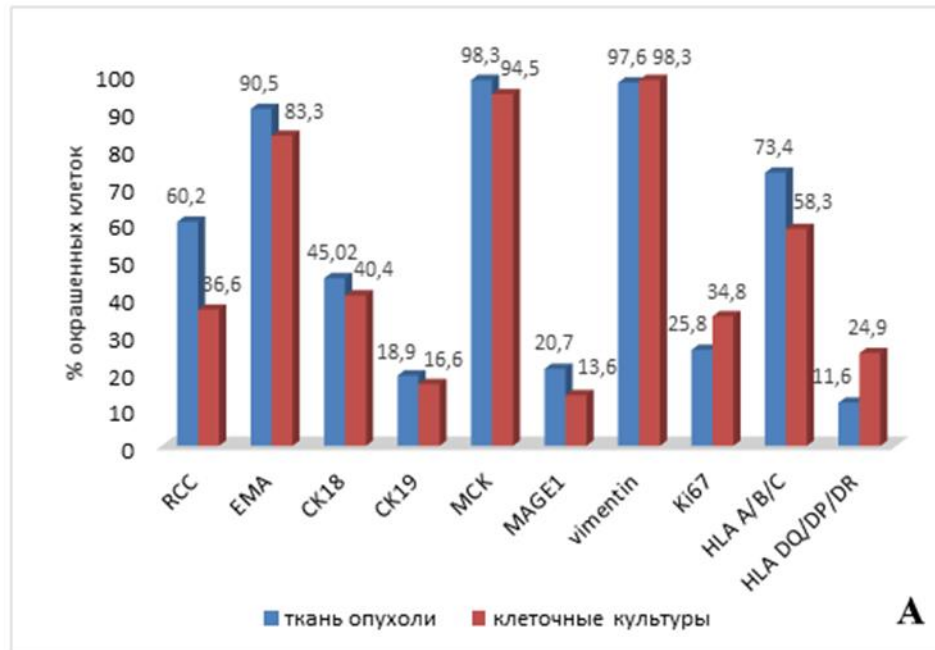
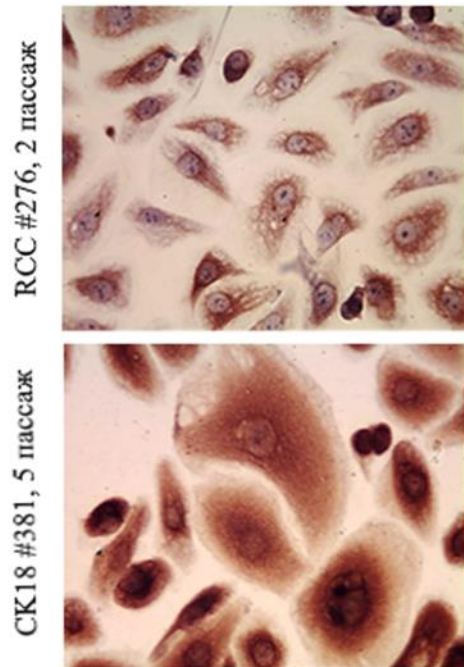
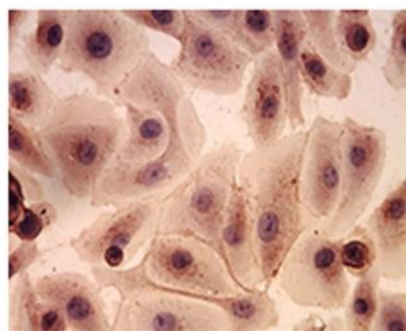


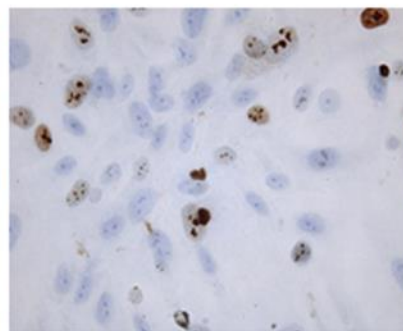
Рисунок 33 – Иммуноцитохимическое выявление тканеспецифических маркеров солидных опухолей эпителиального происхождения. Масштабная линейка 50 и 100 мкм. Докрашивание гемалауном Майера



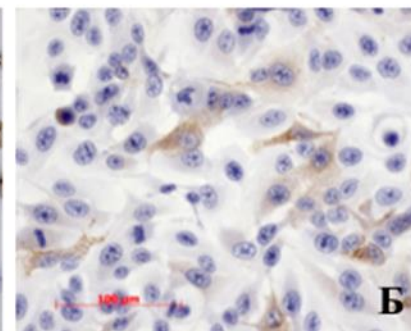
виментин #284, 5 пассаж



HLA A/B/C #281, 2 пассаж



Ki67 #276, 5 пассаж



HLA DQ/DP/DR #291, 7 пассаж

Рисунок 34 – Выявление презентации ОАА в ткани опухоли и на первых пассажах культивирования клеток рака почки (<10 пассаж):  
 А – графическое отображение процентного соотношения случаев (n=72); Б – визуализация выявления антигенов.

Световая микроскопия, масштабная линейка 100 мкм

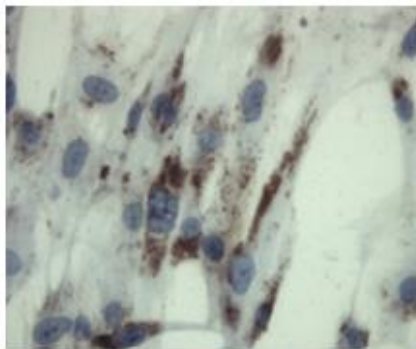
В нашем исследовании этот маркер был выявлен в 60,5% опухолевых образцов, и при переводе в культуру большая часть клеток не экспрессировала данные молекулы, на ранних пассажах RCC был обнаружен только в 36,6% клеточных культур РП.

Мы наблюдали высокую встречаемость мембранного эпителиального антигена в культивируемых клетках РП в 83,3% случаев. Антигены семейства MAGE1 детектировали в 13,6% культур РП. В среднем пролиферативная активность, выявляемая по присутствию культивируемых клеток, экспрессирующих антиген Ki-67, составила 34,8%, что было почти в 1,5 раза больше, чем в ткани опухоли. При переводе в культуру снижалось количество клеток, несущих антигены HLA A/B/C (73,4% и 58,3% соответственно), и увеличивалось количество клеток, экспрессирующих антигены главного комплекса гистосовместимости II класса (11,6% и 24,9% соответственно). Однако по исследованным маркерам в культивируемых клетках РП на ранних пассажах и в образцах опухоли, из которых эти клетки были получены, не было выявлено статистически достоверных различий, что позволяет сделать вывод о том, что культивируемые клетки РП до 10 пассажа сохраняют гистотипические признаки исходной ткани и могут служить клеточной моделью РП *in vitro*.

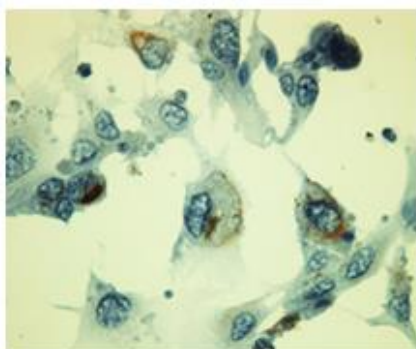
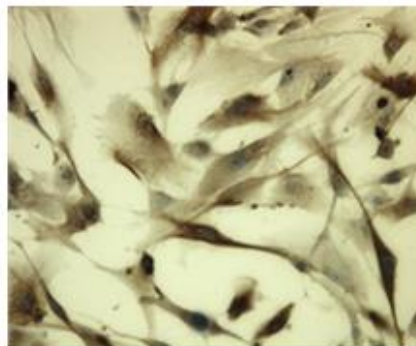
Аналогичное исследование было проведено для 12 образцов культивируемых клеток РПЖ (рис. 35). Было исследовано присутствие специфических антигенов: простатспецифического антигена (PSA), простатспецифического мембранного антигена (PSMA), фермента рацемазы (АМАКР), простатической кислой фосфатазы (РАР), простатического ингибирующего пептида (РІР), простатического сверхэкспрессируемого пептида-1 (РТОВ1), а также семейств цитокератинов МСК, маркера пролиферации Ki-67 и антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса. Во всех образцах опухоли, из которых были выделены клетки, обнаруживались МСК и РАР, однако «ранние» культуры РПЖ демонстрировали меньшее количество клеток, экспрессирующих цитокератины: в среднем 97,7% и 60,5% соответственно. При переводе в культуру клетки РПЖ теряли экспрессию HLA A/B/C (68,12% и 31,06% соответственно), увеличивался пул Ki-67<sup>+</sup>-клеток с 22,4% в опухоли до 45,2% в культуре. Остальные специфические антигены РПЖ синтезировались в сравнимом количестве в опухоли и в культурах малигнизированных клеток до 10 пассажа. Длительное культивирование опухолевых клеток ЭО сопровождалось изменениями экспрессии цитокератинов, детектируемых с помощью антител к МСК; СК7, СК8, СК20. Происходило уменьшение экспрессии ЕМА, специфических ОАА Индивидуальный анализ клеточных культур РП, КРР, РМЖ, РЯ указывает, что в процессе пассирования в культурах увеличивалось количество клеток, позитивных по Ki-67 (рис. 36).

В большинстве случаев на поздних этапах культивирования (45–100 пассаж) наблюдали сильно уменьшенную презентацию молекул HLA A/B/C и увеличение количества клеток, синтезирующих молекулы HLA DQ/DP/DR.

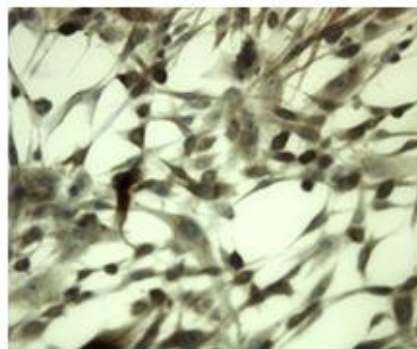
PSA #448, 5 пассаж



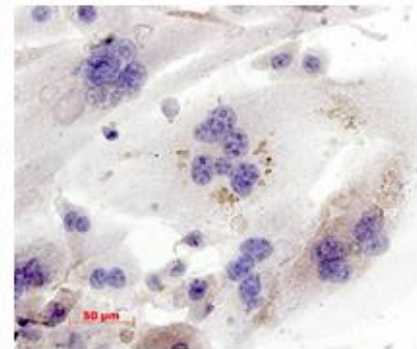
PAP #456, 3 пассаж



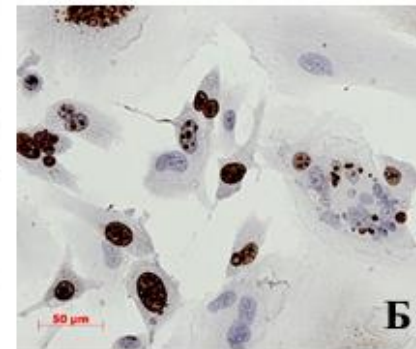
PIP #447, 5 пассаж



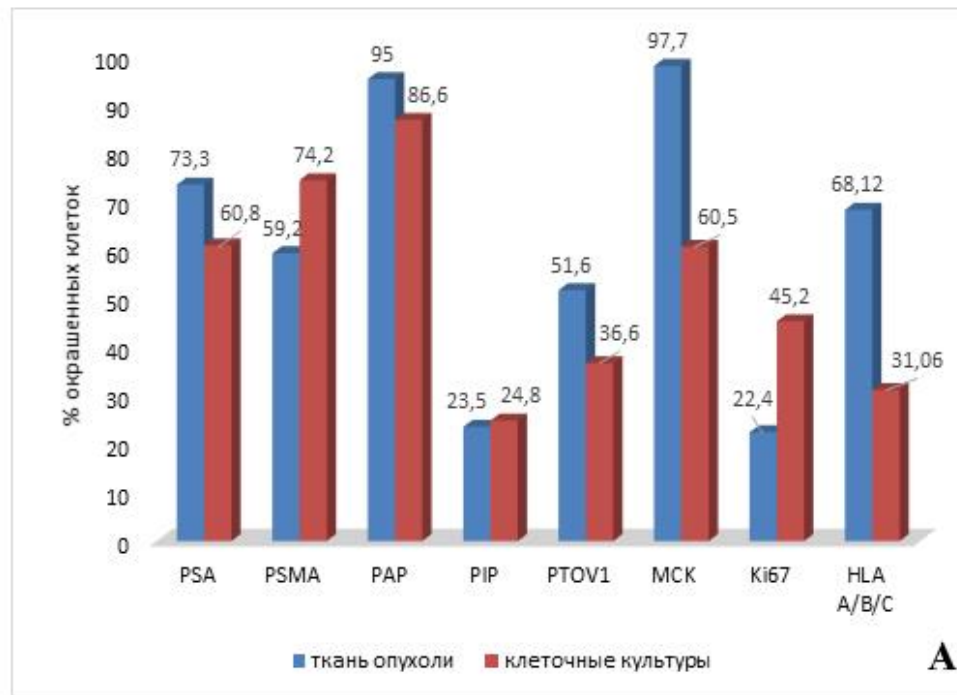
PSMA #413, 2 пассаж



PTOV1 #423, 7 пассаж



Ki67 #447, 5 пассаж



**A**

Рисунок 35 – Выявление презентации ОАА в тканях опухоли и на первых пассажах культивирования клеток рака предстательной железы (<10 пассаж): **A** – графическое отображение процентного соотношения случаев (n=12); **B** – визуализация выявления антигенов.

Световая микроскопия, ув. ×200



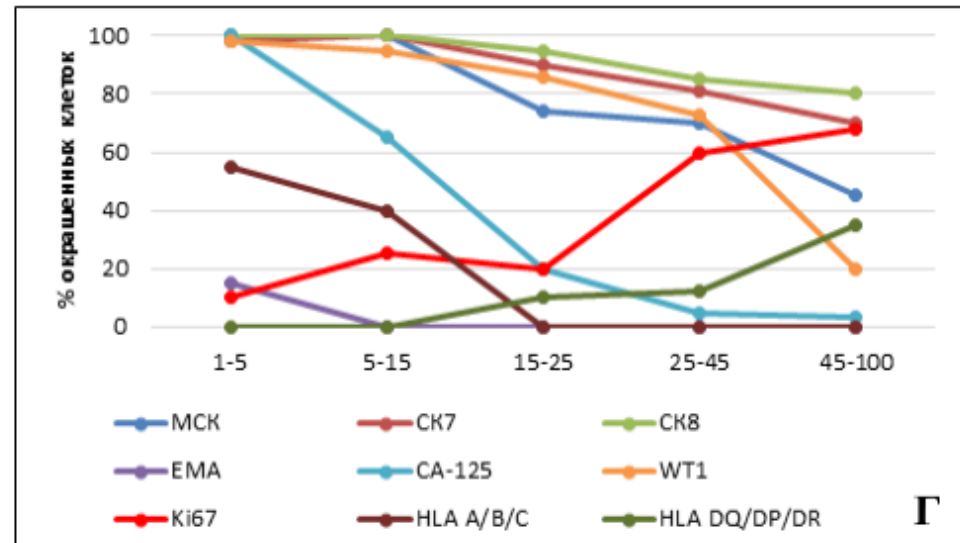
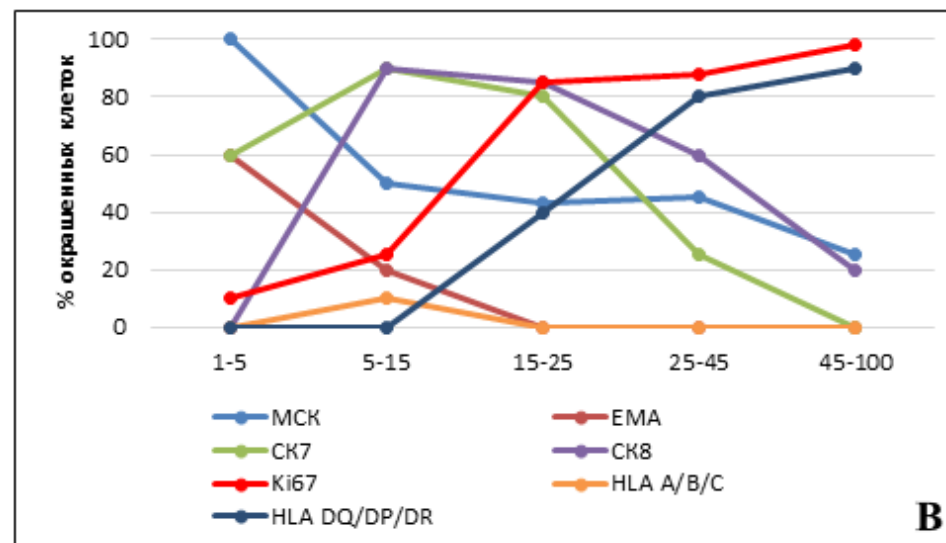
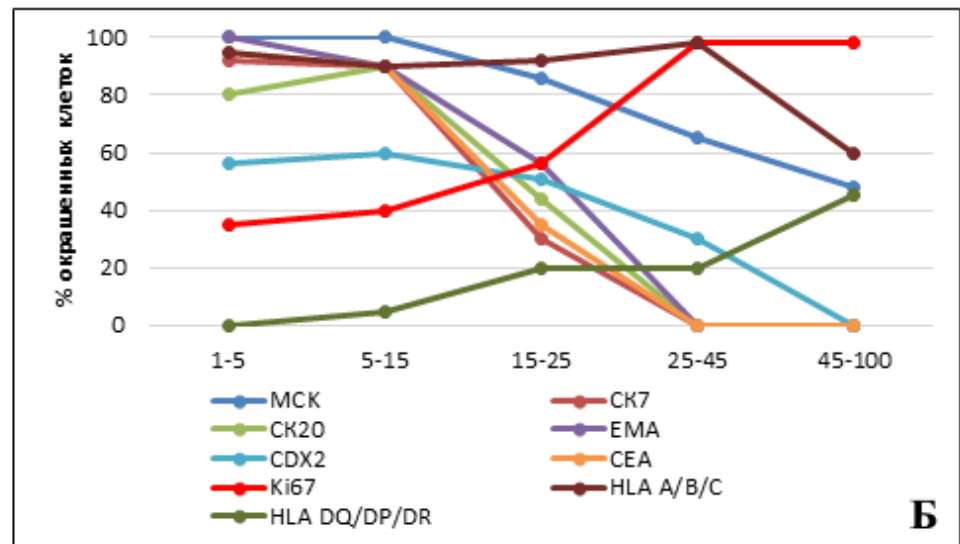
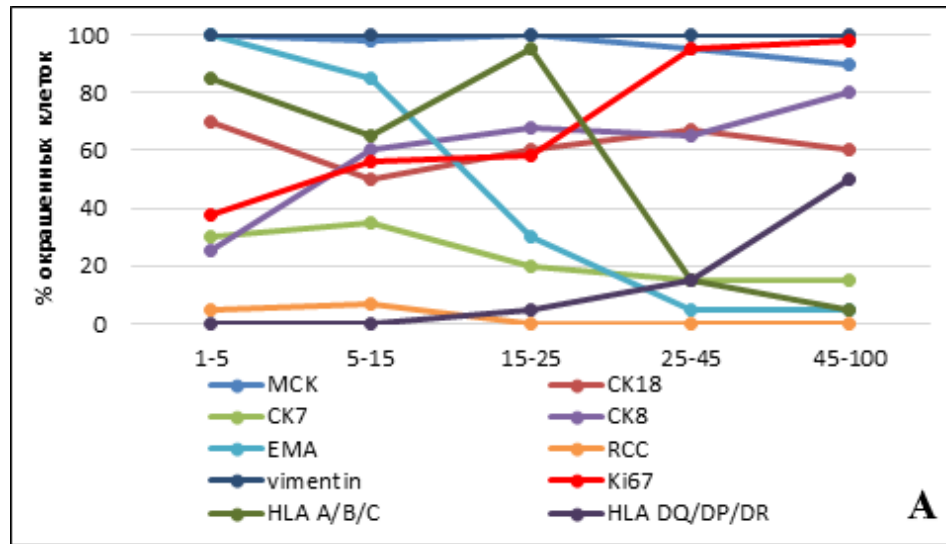


Рисунок 36 – Графическое изображение динамики экспрессии ОАА, определяемых методом иммуноцитохимии, в процессе длительного культивирования клеток опухолей эпителиального происхождения: **А** – #291, РП; **Б** – #485, КРР; **В** – #512, РМЖ; **Г** – #533, РЯ.  
 По оси абсцисс отображены временные промежутки культивирования (пассажи)

Как известно, в состав цитоскелета эукариотической клетки входят различные белки, в том числе протеины микрофиламентов, которые являются основными структурными компонентами цитоскелета, обеспечивая механическую стабильность [551]. В эпителиях промежуточные филаменты состоят из специфических комбинаций кератинов I и II типа, например, гетеродимеры K5/K14, K8/K18 или K8/K19 [295]. Их посттрансляционные модификации обеспечивают быстрые динамические изменения конфигурации кератинов, которые жестко регулируются в клетках, обеспечивая функциональную стабильность [557]. Считается, что во время опухолевой прогрессии метастатические клетки карцином обычно сохраняют специфическую структуру экспрессии цитокератинов, что позволяет идентифицировать одни и те же цитокератины в первичных опухолях и их метастазах [551].

В диагностических целях широко используют определенные комбинации кератинов, экспрессирующихся достаточно стабильно, но отмечают в то же время наличие абберантно экспрессируемых кератинов, уменьшение или усиление экспрессии которых связано с канцерогенезом [551]. В частности, колоректальная аденокарцинома, подобно нормальному желудочно-кишечному эпителию, почти всегда СК20-позитивна, но СК7-негативна или имеет более низкую экспрессию СК7 по сравнению с СК20. Между тем есть данные, что коэкспрессия СК20 и СК7 характерна для более поздних стадий колоректального рака, пониженная экспрессия СК20 ассоциирована с низкой степенью дифференцированности опухоли и эпителиально-мезенхимальным переходом [558]. Все исследованные нами клеточные линии КРР (n=7) имели метастатическое происхождение и коэкспрессировали СК7 и СК20. Длительное культивирование приводило почти к полному исчезновению экспрессии данных цитокератинов (см. рис. 36 Б). Снижение экспрессии СК7 наблюдали при длительном культивировании клеток РЯ и РМЖ (см. рис. 36 В, Г). В то же время культуры РП, КРР, РМЖ и РЯ сохраняли антигены, выявляемые коктейлем антител МСК и СК8, экспрессия которых снижалась, но не исчезала полностью.

В литературе опубликованы многочисленные данные, указывающие на функциональную роль в эпителиальном онкогенезе СК8. В частности, трансфекция СК8 и СК18 фибробластов мыши, экспрессирующих виментин, приводит к образованию кератиновых филаментов, а также к изменению способностей к деформации клетки, что связано с увеличением миграционных и инвазивных свойств, то есть кератины могут влиять на форму и миграцию клеток посредством взаимодействий с внеклеточной средой [559]. Аналогично, было обнаружено, что экспериментальная коэкспрессия виментина и СК8/СК18 увеличивает инвазию и миграцию клеток меланомы и рака молочной железы человека *in vitro* [560].

Нами была проведена иммуноцитохимическая оценка выделенных культур клеток СМТ на ранних этапах культивирования. Морфологическая диагностика СМТ представляет

большую сложность вследствие значительной гетерогенности опухолей, даже внутри одного гистологического подтипа. Данное биологическое разнообразие опухолей мягких тканей и костей усложняет диагностику этой группы злокачественных новообразований. В настоящее время выделяется более 100 гистологических подтипов СМТ, требующих кардинально отличающихся подходов к лечению. Крайне важную роль в дифференциальной диагностике СМТ играет иммуногистохимический метод, который должен выполняться во всех случаях, когда заподозрена мезенхимальная опухоль. При проведении дифференциальной диагностики СМТ используется приблизительно 30 иммуногистохимических маркеров и продолжается поиск новых [561], однако наиболее значимыми из них считаются 10 иммуногистохимических маркеров, оценка которых является базовой для дифференциального диагноза [562]. Ряд исследователей отмечают, что в новообразованиях мягких тканей опухолевые клетки не всегда сохраняют иммунофенотип, присущий нормальному клеточному аналогу, и могут экспрессировать маркерные молекулы, не связанные с предполагаемым направлением дифференцировки новообразования [563]. Трудности диагностики СМТ связаны также с отсутствием специфических антигенов, присущих данным типам опухолей.

В нашем исследовании при выполнении иммуноцитохимического анализа выделенных клеток сарком на ранних этапах культивирования мы ориентировались на гистологический диагноз и иммуногистохимическое исследование образцов опухолевой ткани, полученных интраоперационно. Практически все полученные культуры СМТ на ранних пассажах экспрессировали антигены установленной дифференцировки (табл. 12). Все исследованные культуры (n=21) синтезировали виментин. Антигены HLA A/B/C были представлены в клетках всех культур, за исключением клеток двух синовиальных сарком, антигены HLA DQ/DP/DR отсутствовали в 8 культурах (38,09%). В четырех из 5 культур синовиальных сарком и одной культуре миксофибросаркомы была обнаружена экспрессия кальпонины. Коэкспрессия кальпонины и кальдесмона сохранялась в клетках лейомиосарком и рабдомиосарком (рис. 37).

Кальпонин и кальдесмон относятся к семействам актин-связывающих белков, расположены на актиновых филаментах, взаимодействуют с тропомиозином и  $Ca^{2+}$ -связывающими белками и способны  $Ca^{2+}$ -зависимым образом регулировать взаимодействие миозина с актином [564]. Кроме того, сократительные пучки актомиозина, стрессовые волокна важны для морфогенеза, миграции и механосенсинга немышечных клеток [565]. Кальпонин существует в нескольких изоформах и представлен в гладкомышечных клетках и в клетках немышечной дифференцировки, таких как фибробласты, макрофаги, нейтрофилы, моноциты, эпителиоциты [566].

Таблица 12 – Иммуноцитохимический анализ культивируемых клеток сарком мягких тканей на ранних пассажах

№ культуры	Пассаж	Гистотип саркомы	Антигены, % окрашенных клеток											
			МСК	ЕМА	DESM	VIM	SMA	MSA	S100	Calponin	Caldesmon	HLA I	HLA II	Ki-67
678	3	Миксо- фибросаркома	0	0	0	92	0	0	0	–	–	40	0	20
690	5		0	20	0	88	70	–	0	0	10	75	10	45
924	2		0	0	0	98	10	–	0	–	–	95	0	25
710	15	Синовиальная саркома	0	0	0	95	–	–	0	2	0	90	0	18
716	10		0	0	0	96	–	–	0	100	0	0	0	30
763	15		0	0	0	99	–	–	0	50	0	0	0	65
814	17		98	0	0	90	0	0	0	10	0	75	20	20
859	8		68	15	0	98	0	0	0	0	0	90	5	25
705	2	Дермато- фибросаркома	0	0	0	92	0	0	0	–	–	100	15	20
702	2	Плеоморфная липосаркома	80	0	0	90	0	–	20	–	–	98	5	15
854	2	Миксоидная липосаркома	3	0	0	95	–	–	100	3	–	100	90	20
941	5		10	0	0	86	0	0	80	2	–	65	20	35
699	4	Лейомиосаркома	10	0	0	95	10	2	0	20	3	50	20	50
735	5		0	5	10	90	25	10	10	25	40	100	10	25
868	6		3	0	50	60	0	0	60	4	0	80	0	15
862	11	Эмбриональная рабдомиосаркома	0	0	30	80	0	0	100	100	20	100	10	20
919	5	Веретеночлечная рабдомиосаркома	0	0	45	80	0	15	60	60	10	80	0	40
726	10	Альвеолярная саркома	0	0	75	98	0	–	0	0	0	60	35	35
739	5	Скелетная хондросаркома	0	0	0	86	–	–	55	–	–	50	5	25
776	2		90	0	0	85	–	–	3	–	–	100	0	50
931	5	Внескелетная миксоидная хондросаркома	5	0	0	93	–	–	15	–	–	10	30	20

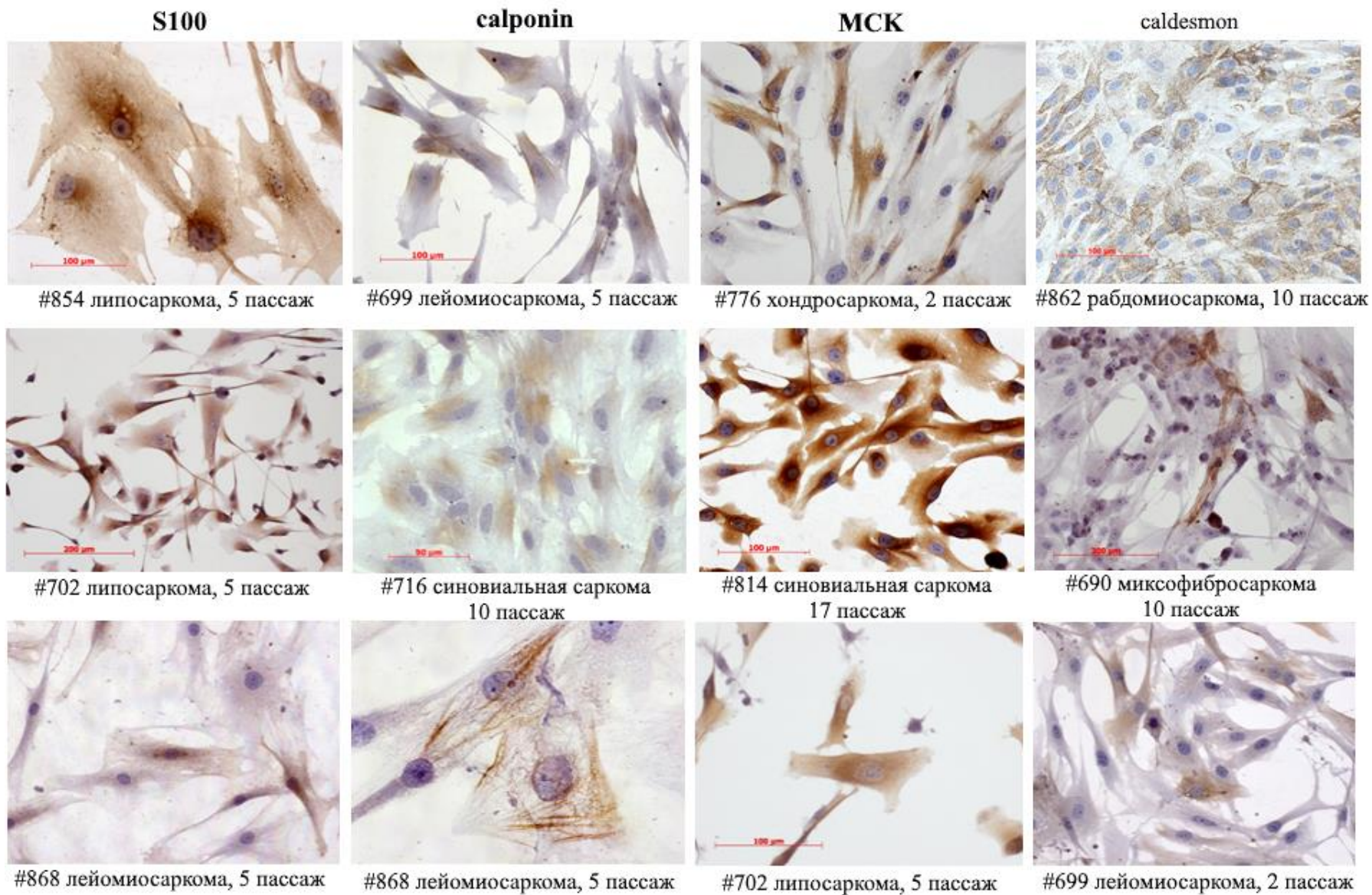


Рисунок 37 – Иммуноцитохимическое выявление ОАА в культивируемых клетках СМТ.  
Масштабная линейка 50, 100 и 200 мкм. Докрашивание гемалауном Майера

Кальпонин выявляется в доброкачественных и злокачественных новообразованиях, в частности, в лейомиомах, лейомиосаркомах и иногда при опухолях стромы желудочно-кишечного тракта [567]. Кальдесмон имеет аналогичный диапазон экспрессии, но редко бывает положительным в миофибробластах [568]. Обнаружена коэкспрессия этих белков в синовиальных саркомах [564]. В нашем исследовании кальпонин и кальдесмон выявлялись в цитоплазме клеток в виде продольных фибрилл, концентрирующихся вокруг клеточного ядра, и присутствовали как в единичных клетках (синовиальные саркомы, миксоидные липосаркомы, лейомиосаркомы), так и практически в 100% клеток в поле зрения (синовиальные саркомы, эмбриональная рабдомиосаркома) (см. табл. 12).

Две из трех изученных культур лейомиосарком экспрессировали десмин, который выявляли также в культурах рабдомиосарком и в культуре альвеолярной саркомы. В культурах липосарком клетки синтезировали цитокератины и S100, который был представлен также в клетках хондросарком, лейомиосарком и рабдомиосарком. Среди выявляемых антигенов экспрессия цитокератинов, по сравнению с опухолевыми образцами, была наиболее вариабельна и могла исчезать при переводе клеток в культуру. Пролиферативная активность культивируемых клеток сарком на ранних пассажах, оцениваемая по экспрессии маркера Ki-67, была несколько выше, чем в опухолевых образцах, и, согласно критерию Манна–Уитни, не зависела от источника происхождения культуры (первичная опухоль или метастаз) ( $p=0,227$ ).

Интересным моментом является экспрессия виментина клетками злокачественных новообразований. В нашем исследовании виментин был выявлен во всех изученных культурах клеток РП и СМТ. Гиперэкспрессия виментина также была обнаружена при многих типах злокачественных новообразований: опухолях желудочно-кишечного тракта, молочной железы, легких, почек, при раке шейки матки, эндометрия, папиллярном раке щитовидной железы, меланоме кожи [569]. И очевидно, что виментин не только служит диагностическим инструментом для выявления опухолей, но также играет ключевую роль в онкогенезе и прогрессировании неопластического процесса.

Установлено, что экспрессия виментина играет большую роль в эпителиально-мезенхимальном переходе, но в равной степени возможно предполагать, что онкогенные события, такие как миграция и инвазия малигнизированных клеток, являются следствием чрезмерной экспрессии виментина в этих клетках, так как большинство исследований показали положительную связь инвазивного фенотипа с виментином [570; 571]. Кроме того, феномен избыточной экспрессии виментина во время метастазирования указывает на его роль как промотора метастазирования [572]. При создании монослойных клеточных линий злокачественных новообразований необходимо учитывать, что диссоциация опухолевой ткани уничтожает взаимодействия, существующие в опухолевом микроокружении. В частности,

в клетках ЭО и СМТ/ОС может меняться экспрессия виментина и/или цитокератинов как следствие изменения подвижности клеток в культуре.

### **3.2.3. Сравнительный анализ экспрессии раково-тестикулярных антигенов клетками солидных опухолей, определяемой молекулярно-генетическими методами**

С точки зрения выбора молекулярных мишеней для иммунотерапии злокачественных новообразований РТА представляют наибольший интерес, так как во взрослом организме практически здорового человека они экспрессируются в основном только в тканях яичка и плаценты, но могут быть гиперэкспрессированы в опухоли, следовательно, они являются высокоиммуногенными, потому что иммунная система взрослого организма их «не знает» [112]. В некотором смысле РТА являются «универсальными» для распознавания клетками иммунной системы, так как они представлены в широком спектре опухолей, однако в то же время необходимо отметить, что уровень и профиль экспрессии РТА может значительно отличаться, даже у больных, имеющих одинаковый диагноз [493; 573; 574].

Сегодня известно множество РТА, в частности, 276 РТА и соответствующих им генов зарегистрировано в онлайн-банке данных, основанном Институтом исследований рака им. Людвига (<http://www.cta.lncc.br>) [575]. Некоторые антигены, в том числе антигены MAGE, представлены мультиантигенными семействами, состоящими из родственных антигенов. Гены, кодирующие другие РТА, например *SCP1*, представлены в единственной копии. Разнообразие родственных антигенов позволяет полагать, что стимулирование иммунного ответа против одного члена семейства будет способствовать распознаванию и элиминации клеток, экспрессирующих родственные антигены. Таким образом, чтобы оценить иммуногенные свойства опухоли, достаточно определить активность только некоторых генов-представителей семейств. Можно предполагать, что определение профиля экспрессии 11 РТГ, принадлежащих к основным изученным семействам, таким как *GAGE*, *HAGE*, *NY-ESO1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SLLP1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*, позволит достаточно подробно характеризовать иммунофенотип опухолевых клеток. Нами было проведено сравнительное изучение профилей экспрессии представителей генов основных семейств РТА культивируемыми клетками солидных опухолей: МК, СМТ, РП, РМП, КРР, РМЖ, РЯ. В процессе молекулярно-генетического анализа в 91 из 100 (91%) образцов клеточных линий злокачественных новообразований была зафиксирована активность генов РТА. Одна культура КРР #1002 и 8 культур СМТ/ОС: #944,1, #945 – липосаркома, #967 – хондросаркома, #976 – шваннома, #996 – остеосаркома, #997 – синовиальная саркома, #1008 – лейомиосаркома, #1013 – плеоморфная рабдомиосаркома – не экспрессировали ни один из изучаемых генов. Все клеточные культуры имели высокогетерогенный профиль экспрессии РТГ. Мы не обнаружили

активности гена *SPANXA1* в культивируемых клетках КРР, РМП, РМЖ и РЯ, среди культур МК активность этого гена была зарегистрирована только в двух случаях. Westbrook V.A. и соавт. (2004) изучали экспрессию представителей мультигенного семейства *SPANX* в клеточных линиях МК и РЯ и продемонстрировали, что клеточные линии МК характеризовались гетерогенностью в экспрессии этих генов, в *SPANX*-положительных культурах белки *SPANX*, локализующиеся в ядерной оболочке клеток, были выявлены в небольшом проценте в клеточной популяции [576]. Локализация белка *SPANX* в ядерной оболочке клеток образца опухоли пациента коррелировала с наблюдениями, сделанными для клеточной линии МК. Ген *SEMG1* был активен только в клетках некоторых культур МК (4/32) и РМП (1/6), редкой была экспрессия гена *SCPI* – она была выявлена в клетках СМТ (1/59), РМП (1/6) и РЯ (3/4) (табл. 13, 14; рис. 38). Для остальных исследуемых генов регистрировали наличие активности, которая очень сильно варьировала, в том числе в пределах одного гистологического типа опухоли, особенно в группе СМТ/ОС. Гиперэкспрессию гена *PRAME* выявили в клетках всех типов опухолей. Это наблюдение совпадает с данными, что ген *PRAME* является наиболее часто экспрессируемым РТГ при злокачественных новообразованиях [577; 578].

Транскрипционная активность РТГ в культурах клеток солидных опухолей на первых пассажах практически не зависела от пола пациентов: обнаружили только статистически значимое увеличение экспрессии генов *GAGE* ( $p=0,037$ ) и *PASD1* ( $p=0,0024$ ) в образцах клеток опухолей больных женского пола (рис. 39 А). В литературе не встречается однозначных данных по гендерным различиям экспрессии РТА. В частности, Peng J.R. и соавт. (2005) предприняли исследование взаимосвязи экспрессии РТА (8 членов семейства *MAGE*, 4 члена семейства *SSX*, *NY-ESO1*, *SCPI*) в гепатоцеллюлярной карциноме с рядом клинических параметров и не выявили никаких гендерных различий в активности изучаемых генов [579].

Исследование Gure A.O. и соавт. (2005) экспрессии РТГ при немелкоклеточном раке легкого продемонстрировало, что повышенная экспрессия в опухоли антигенов СТ-Х, локализующихся на X-хромосоме, более характерна для мужчин, чем для женщин [580]. Исследование экспрессии *MAGEA1* как прогностического фактора при плоскоклеточном раке пищевода показало отсутствие связи выявляемости этого антигена с полом больных [581]. Мы не нашли в литературе сведений, касающихся обнаруженных нами гендерных различий в экспрессии генов *GAGE* и *PASD1* в культивируемых клетках солидных опухолей. Однако необходимо отметить, что все предпринятые ранее исследования в этом направлении были выполнены на тканевых срезах иммуногистохимическими методами.

В процессе культивирования мы не выявили большого массива статистически значимых отличий в экспрессии РТГ опухолевыми клетками, выделенных из образцов злокачественных новообразований разной локализации (первичная опухоль, рецидив заболевания, метастаз).



Таблица 13 – Анализ экспрессии РТГ в культивируемых клетках солидных опухолей

Количественное сравнение уровня экспрессии генов РТА							
Ген	МК	СМТ/ОС	РП	РМЖ	КРР	РМП	РЯ
	М (min–max)						
<i>GAGE</i>	2,0334 (0–5,2095)	1,6344 (0–8,5687)	0	0	0	0	0
<i>HAGE</i>	0,0312 (0–0,5063)	0,0489 (0–0,6590)	0	0	0	0	0
<i>NY-ESO1</i>	2,2024 (0–7,3584)	0,3806 (0–5,1318)	0	2,1043 (0–4,2086)	2,1719 (0–6,5158)	4,2034 (0–6,5652)	3,7117 (2,7225–4,6088)
<i>MAGEA1</i>	1,5422 (0–4,4856)	0,2646 (0–4,0592)	0	0,7595 (0–1,5190)	0	1,9554 (0,6769–3,4816)	0
<i>PASDI</i>	0,8476 (0–2,8546)	0,2801 (0–3,6171)	0	0	0	0,0396 (0–0,2378)	0,0272 (0–0,0635)
<i>SCP1</i>	0	1,22956E-05 (0–0,0070)	0	0	0	0,0638 (0–0,3829)	0,3444 (0–1,1699)
<i>SEMG1</i>	0,0407 (0–1,1801)	0	0	0	0	0,2707 (0–1,6243)	0
<i>SLLP1</i>	0,2219 (0–2,6924)	0,2621 (0–6,3577)	0	0	0,0598 (0–0,1793)	0	0,0001 (0–0,0007)
<i>SPANXA1</i>	0,0399 (0–1,0621)	0,0053 (0–0,1767)	0	0	0	0	0
<i>SSX1</i>	0,2859 (0–4,4957)	0,2613 (0–9,3122)	0	0	0	0	0
<i>PRAME</i>	4,5111 (0–6,3973)	1,1823 (0–5,5951)	3,2771 (3,2323–3,3219)	3,3144 (0,2486–6,1801)	1,7527 (0–5,2581)	4,1625 (0–6,8429)	2,6682 (1,1947–3,9727)

Примечание: М – среднее значение.

Таблица 14 – Частота встречаемости экспрессии РТГ в культивируемых клетках солидных опухолей

Ген	МК	СМТ/ОС	РП	РМЖ	КРР	РМП	РЯ
	% (N <sub>pos</sub> /N <sub>total</sub> )*						
<i>GAGE</i>	93,75 (30/32)	49,15 (29/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>HAGE</i>	9,37 (3/32)	6,77 (4/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>NY-ESO1</i>	84,37 (27/32)	16,95 (10/59)	0 (0/2)	50 (1/2)	33,3 (1/3)	83,33 (5/6)	100 (4/4)
<i>MAGEA1</i>	75 (24/32)	18,64 (11/59)	0 (0/2)	50 (1/2)	0 (0/3)	100 (6/6)	0 (0/4)
<i>PASD1</i>	71,87 (23/32)	32,2 (19/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	16,66 (1/6)	75 (3/4)
<i>SCP1</i>	0 (0/32)	1,69 (1/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	16,66 (1/6)	75 (3/4)
<i>SEMG1</i>	12,5 (4/32)	0 (0/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	16,66 (1/6)	0 (0/4)
<i>SLLP1</i>	46,87 (15/32)	32,2 (19/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	33,3 (1/3)	0 (0/6)	25 (1/4)
<i>SPANXA1</i>	6,25 (2/32)	11,86 (7/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>SSX1</i>	34,37 (11/32)	23,73 (14/59)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/6)	0 (0/4)
<i>PRAME</i>	93,75 (30/32)	55,93 (33/59)	100 (2/2)	100 (2/2)	66,6 (2/3)	83,33 (5/6)	100 (4/4)

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

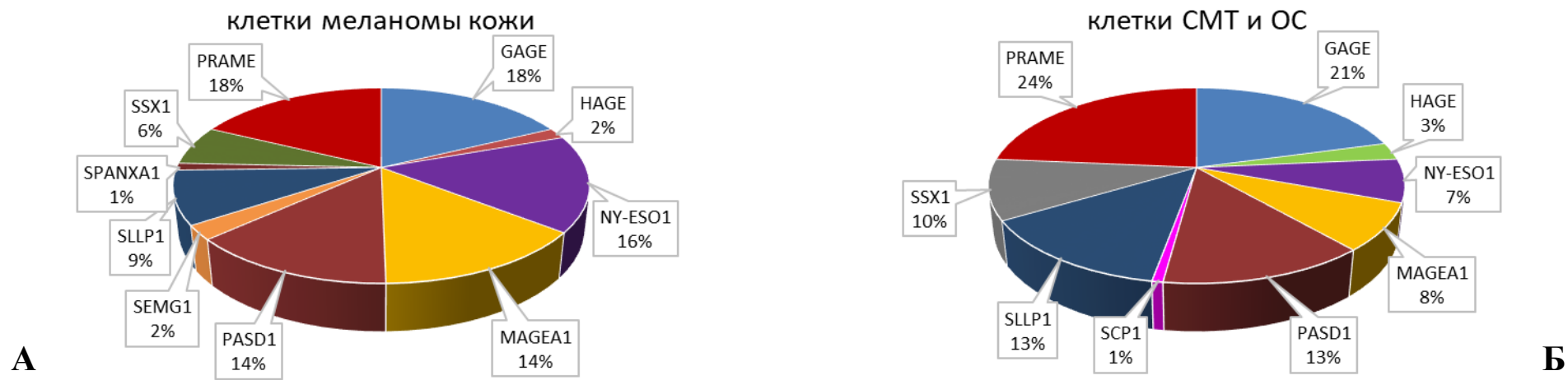


Рисунок 38 – Графическое изображение соотношения транскрипционной активности РТГ в культивируемых клетках МК и СМТ/ОС

Отличия были обнаружены для гена *MAGEA1* ( $p=0,032$ ), при этом его наибольшая активность была выявлена в клетках, полученных из метастатических опухолей, по сравнению с культурами, полученными из первичных новообразований (рис. 39 Б). Было также подтверждено наличие статистически значимых различий в экспрессии *SLLP1* между метастатическими культурами и культурами, полученными из рецидивных опухолей ( $p=0,043$ ). При этом экспрессия *SLLP1* в культурах метастатического происхождения была более выраженной. Park T.S. и соавт. (2016) провели сравнительное иммуногистохимическое изучение экспрессии РТА *MAGEA* и *NY-ESO1* в первичных и метастатических образцах МК, плоскоклеточного рака и аденокарциномы различного происхождения и показали, что на фоне более высокой экспрессии, в целом, этих РТА в меланомах, в метастатических образцах выявляемость *MAGEA* и *NY-ESO1* была более высокой [582]. В то же время Salmaninejad A. и соавт. (2016) отмечают, что связь между сильной степенью экспрессии РТА и стадией заболевания прослеживается не всегда [115]. В частности, Barrow C. и соавт. (2006) обнаружили меньшую частоту экспрессии *MAGEA1* и *MAGEA4* в первичных меланомах, по сравнению с метастатическими, в то время как уровень экспрессии *NY-ESO1* не менялся [93].

Экспрессия *SLLP1* первоначально была выявлена при онкогематологических заболеваниях, и продукт этого гена в этом случае рассматривается как возможная перспективная мишень для иммунотерапии при множественной миеломе [583]. *SLLP1* – это уникальный небактериолитический, с-лизоцимоподобный белок, выделенный из сперматозоидов человека и участвующий в процессах их адгезии [584]. Его функция в опухолевых клетках не совсем понятна, но установлено, что этот белок обладает иммуногенными свойствами: анти-*SLLP1* иммуноглобулины были обнаружены в сыворотке крови пациентов с острым и хроническим миелоидным лейкозом, множественной миеломой [585]. В литературе практически не обсуждается экспрессия *SLLP1* в солидных опухолях, однако анализ активности гена *SLLP1* в культивируемых опухолевых клетках позволил нам выявить 46,87% культур МК, 32,2% культур СМТ/ОС, 33,3% – КРР и 25% – РЯ, где наблюдалась экспрессия этого РТГ. Клетки МК характеризовались более выраженным профилем экспрессии РТА по сравнению с культивируемыми клетками других злокачественных новообразований. Наибольшую частоту транскрипционной активности в клетках МК продемонстрировали гены *GAGE*, *PRAME*, экспрессия которых была обнаружена в 93,75% случаев (30/32); *NY-ESO1* – 84,37% (27/32) и *MAGEA1* – 75% (24/32) (см. табл. 14, рис. 38). В группе культур СМТ/ОС наиболее часто встречали экспрессию генов *PRAME* – 55,93% (33/59), *GAGE* – 49,15% (29/59), *PASD1* и *SLLP1* – 32,2% (19/59), *SSX1* – 23,73% (14/59). Наибольшую экспрессию РТГ демонстрировали клетки синовиальных сарком и остеосарком – 9 генов из 11, лейомиосарком – 8/11 и миксофибросарком – 7/11.

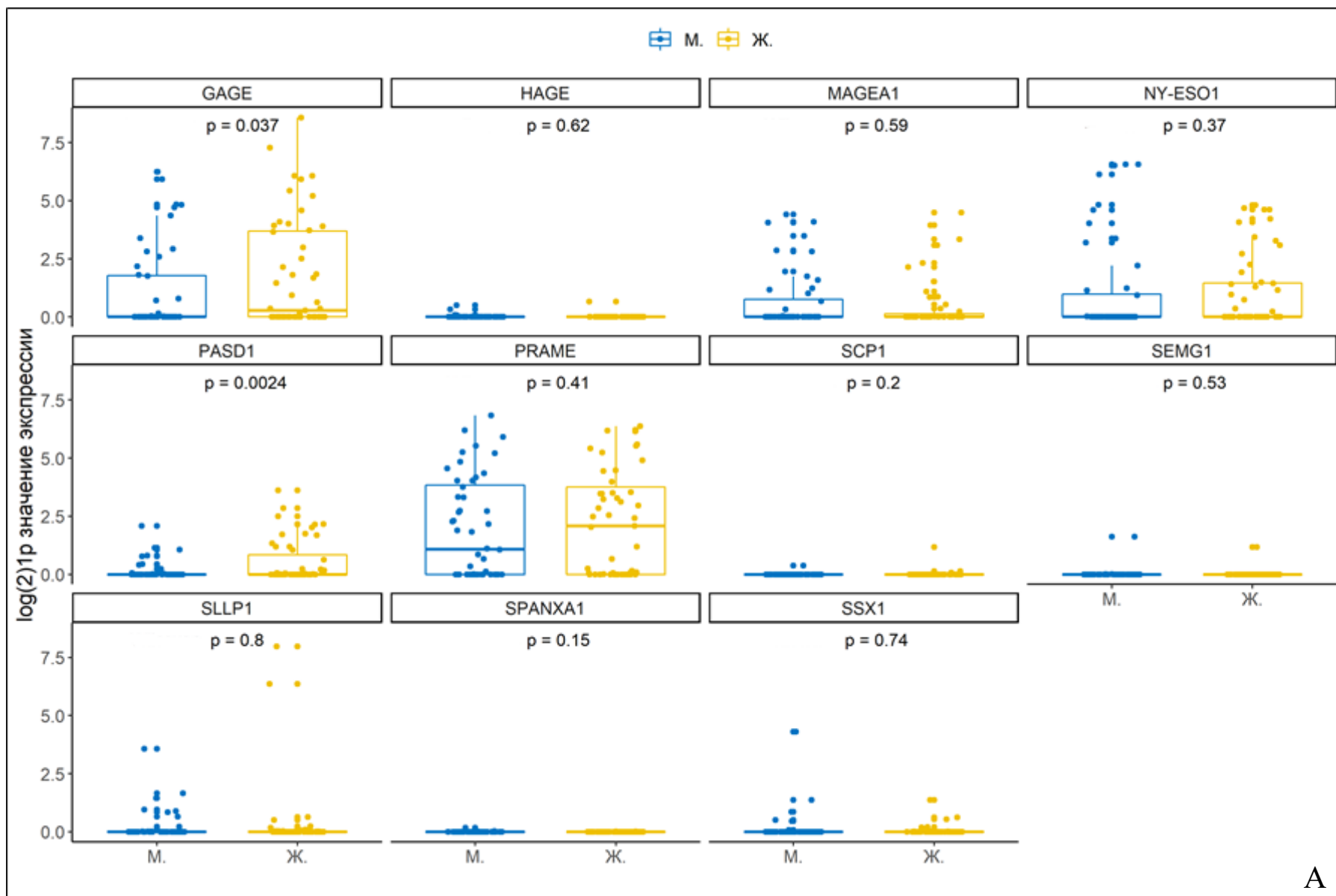


Рисунок 39 А – Графическое отображение распределения образцов культивируемых клеток солидных опухолей по экспрессии РТГ в зависимости от пола пациентов

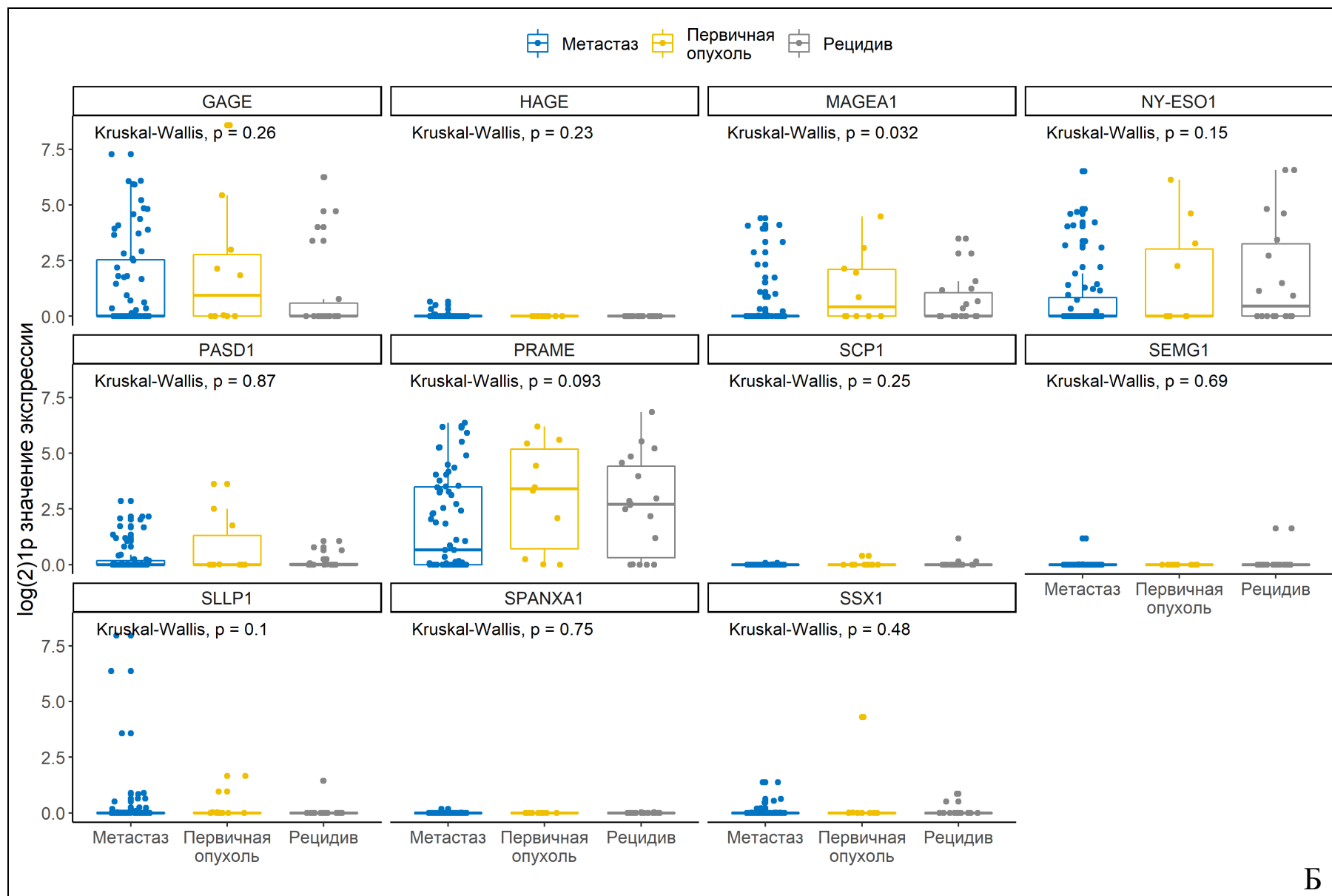


Рисунок 39 Б – Графическое отображение распределения образцов культивируемых клеток солидных опухолей по экспрессии РТГ в зависимости от локализации источника культивируемых клеток (первичная опухоль, рецидив, метастаз)

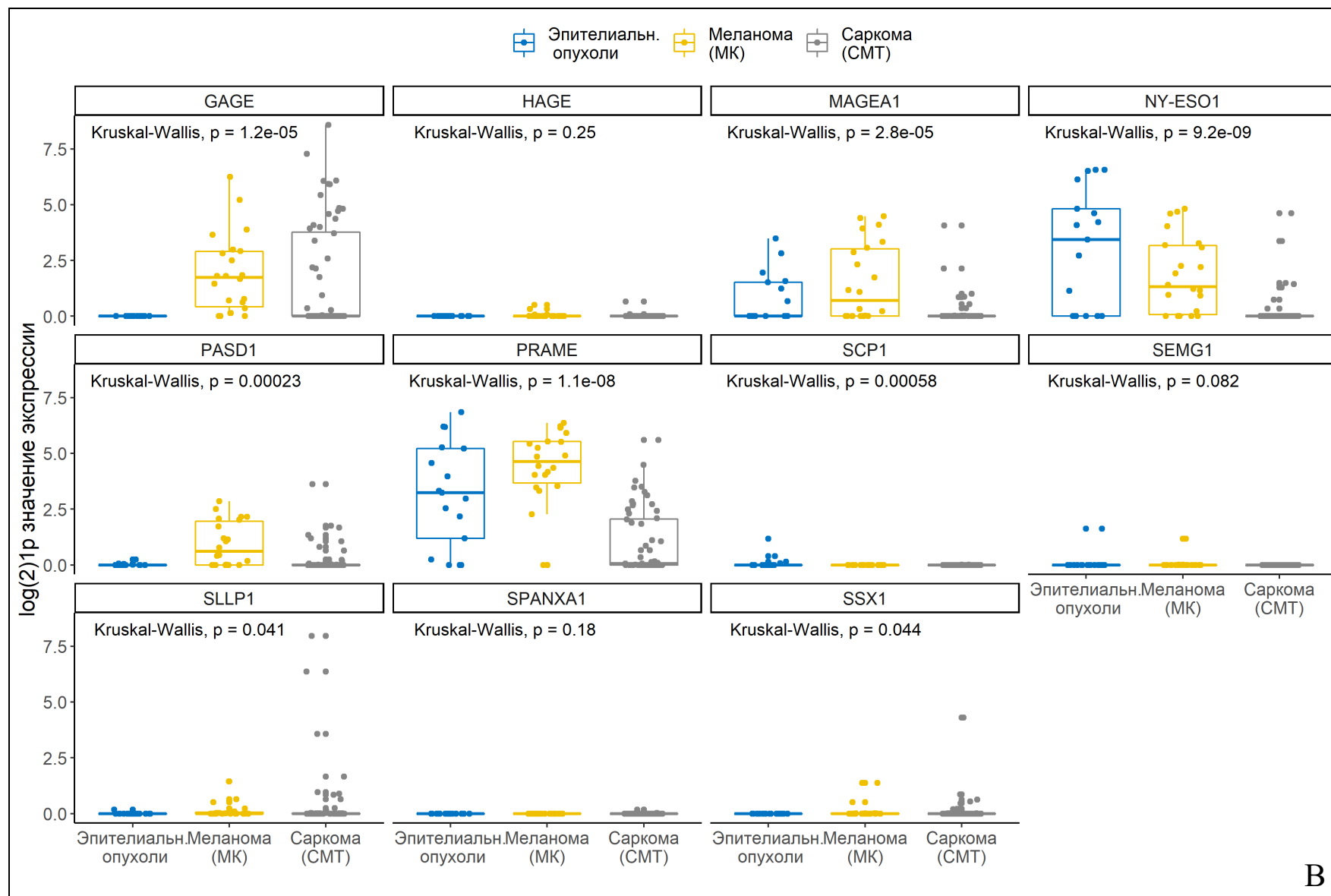


Рисунок 39 В – Графическое отображение распределения образцов культивируемых клеток солидных опухолей по экспрессии РТГ в зависимости от гистотипа злокачественного новообразования

В клеточных образцах рабдомиосарком и шванномы экспрессия генов была минимальной – 2/11 и 1/11 соответственно (табл. 15). В клетках РМП было выявлено 6 активных генов из 11, при этом экспрессия гена *MAGEA1* была представлена во всех культурах, часто встречалась экспрессия гена *PRAME* и *NY-ESO1* – 83,33% (5/6).

Все культуры РЯ экспрессировали ген *NY-ESO1* и *PRAME*, 3 образца из четырех проявляли активность в отношении генов *PASD1* и *SCP1*, в одном образце была детектирована активность гена *SLLP1*. В культурах РМЖ и КРР только 3 гена из 11 проявляли транскрипционную активность, в двух культурах РП имела место активность только одного гена *PRAME* (см. табл. 13, 14).

Согласно критерию Краскела–Уоллиса, в культивируемых клетках МК, СМТ/ОС и ЭО наблюдали статистически значимые различия в интенсивности экспрессии *GAGE* ( $p=1,2e-05$ ), *MAGEA1* ( $p=2,8e-05$ ), *NY-ESO1* ( $p=9,2e-09$ ), *PRAME* ( $p=1,1e-08$ ), *PASD1* ( $p=0,00023$ ), *SLLP1* ( $p=0,041$ ), *SSX1* ( $p=0,044$ ), *SCP1* ( $p=0,00058$ ) (см. рис. 39 В). Различий не было обнаружено в экспрессии *HAGE* ( $p=0,25$ ), *SEMG1* ( $p=0,082$ ), *SPANXA1* ( $p=0,18$ ).

В работе Scanlan M.J. и соавт. (2004) была предложена классификация опухолей по степени выраженности экспрессии РТА: к опухолям с высокой экспрессией РТА отнесли РМП, немелкоклеточный рак легкого, МК согласно ПЦР-детекции РТГ-транскриптов в 11/20 (55%), 17/33 (51%) и 17/32 (53%) образцах соответственно [586]. Вторая группа представлена опухолями с «промежуточным» уровнем экспрессии, в этом диапазоне находились опухоли преимущественно эпителиального происхождения, включая РМЖ и РПЖ (12/32 (37%) и 6/20 (30%) соответственно). И, наконец, третью группу составили опухоли с низким уровнем экспрессии РТГ, сюда отнесли РП, КРР и большинство опухолей гематологического происхождения. Для РП и КРР частота экспрессии РТГ была <20%, только 3/33 (9%) и 4/25 (16%) соответственно. В исследовании Yao J. и соавт. (2014) было обнаружено, что МК и рак легкого представляют собой опухоли наиболее богатые по экспрессии РТА, в то время как рак почки и глиобластома – это обедненные экспрессией РТА злокачественные новообразования [577]. В нашем исследовании в клетках МК уровень экспрессии гена *GAGE* коррелировал с таковым геном *NY-ESO1* ( $\rho=0,462$ ,  $p=0,03$ ), *MAGEA1* ( $\rho=0,458$ ,  $p=0,032$ ), *PASD1* ( $\rho=0,476$ ,  $p=0,025$ ). Наблюдали также коэкспрессию генов *NY-ESO1* и *MAGEA1* ( $\rho=0,692$ ,  $p<0,001$ ), *NY-ESO1* и *PASD1* ( $\rho=0,570$ ,  $p=0,006$ ), *SLLP1* и *SSX1* ( $\rho=0,494$ ,  $p=0,019$ ). Для клеток СМТ/ОС была выявлена двухсторонняя положительная корреляция высокой силы между *GAGE* и *PASD1* ( $\rho=0,722$ ,  $p<0,001$ ). *PRAME* коррелировал с *GAGE* ( $\rho=0,560$ ,  $p<0,001$ ) и *MAGEA1* ( $\rho=0,619$ ,  $p<0,001$ ). Была выявлена коэкспрессия генов *MAGEA1* и *NY-ESO1* ( $\rho=0,414$ ,  $p=0,001$ ). Для гена *SSX1* была характерна корреляция слабой силы по транскрипционной активности с генами *HAGE* ( $\rho=0,449$ ,  $p<0,001$ ) и *SPANXA1* ( $\rho=0,254$ ,  $p=0,05$ ).

Таблица 15 – Частота встречаемости экспрессии РТГ в культивируемых клетках СМТ/ОС

Тип опухоли	n	Гены										
		<i>GAGE</i>	<i>HAGE</i>	<i>NY-ESO1</i>	<i>MAGEA1</i>	<i>PASD1</i>	<i>SCPI</i>	<i>SEMG1</i>	<i>SLLP1</i>	<i>SPANXA1</i>	<i>SSX1</i>	<i>PRAME</i>
Миксофибросаркома	7	5/7	3/7	3/7	3/7	4/7	0/7	0/7	7/7	0/7	3/7	4/7
Лейомиосаркома	7	5/7	1/7	1/7	0/7	3/7	0/7	0/7	3/7	1/7	2/7	4/7
Рабдомиосаркома	4	1/4	1/4	0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	1/4	0/4	2/4	1/4
Липосаркома	7	3/7	1/7	4/7	2/7	2/7	0/7	0/7	2/7	0/7	0/7	5/7
Синовиальная саркома	14	8/14	1/14	2/14	1/14	6/14	0/14	0/14	4/14	4/14	4/14	12/14
Остеогенная саркома	11	8/11	0/11	2/11	2/11	6/11	2/11	0/11	6/11	3/11	5/11	9/11
Хондросаркома	5	3/5	1/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	3/5	0/5	3/5	3/5
Дерматофибросаркома	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
Альвеолярная саркома	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
Ангиосаркома	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Светлоклеточная	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Шваннома	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Примечание: ■ – наличие случаев с положительным результатом.



В группе культур клеток ЭО коррелятивных связей по экспрессии РТГ не было выявлено. В исследовании различных образцов тканей злокачественных новообразований эпителиального происхождения, выполненного Ishihara M. и соавт. (2020) была продемонстрирована коэкспрессия *MAGEA4*, *NY-ESO1* и *SAGE*, которая была наиболее выражена при раке пищевода [587]. При этом предполагается, что коэкспрессия этих РТГ обусловлена их близкой локализацией в области q28 на X-хромосоме, за счет чего может происходить деметилирование общих промоторов или тех, которые расположены поблизости [588]. В то же время Soga N. и соавт. (2013), исследуя образцы рака почки 35 пациентов, не обнаружили коэкспрессию *MAGEA4*, *NY-ESO1* и *SAGE* ни в одном из них [589]. Kakimoto T. и соавт. (2019) продемонстрировали высокую степень коэкспрессии *MAGEA4* и *NY-ESO1* в синовиальных саркомах, предложив эти антигены в качестве диагностического инструмента [590].

Ikeda H. и соавт. (1997) обнаружили, что *PRAME* гиперэкспрессируется в 88% случаев первичной меланомы и в 95% случаев – метастатической, что позволило им сделать вывод о связи гена *PRAME* с метастазированием меланомы [591]. В последующем другие исследователи также показали, что *PRAME* активен в 86% случаев первичной меланомы [592]. Из этого следует, что активация гена *PRAME* в первичном очаге меланомы происходит на очень высоком уровне либо не происходит вовсе и может существовать небольшая популяция первичных *PRAME*-негативных больных меланомой [593]. Для меланом была обнаружена корреляция между идентификацией антигена *PRAME* в ткани опухоли и окончательным цитологическим/гистологическим диагнозом, при этом экспрессия гена *PRAME* была более выражена в метастатических образованиях [594]. В нашем исследовании только две культуры МК из 32 (6,25%) не экспрессировали *PRAME*, в обоих случаях злокачественные меланоциты были выделены из метастазов в лимфатические узлы.

Roszik J. и соавт. (2017) обнаружили, что синовиальные саркомы и мультифокальные лейомиосаркомы гиперэкспрессируют *PRAME*, что позволяет предположить, что белок *PRAME* может быть эффективной мишенью для иммунотерапии этих опухолей [595]. Hemminger J.A. и соавт. (2014) выявили высокий гомогенный характер экспрессии гена *PRAME* в образцах миксоидной и круглоклеточной липосаркомы [596]. В нашем исследовании 5/7 образцов липосарком были положительны по экспрессии этого гена, но характеризовались низкой степенью экспрессии по отношению к референсному гену. *PRAME* является также самым экспрессируемым РТГ для остеосарком: в исследовании Tan P. и соавт. (2012) была продемонстрирована его активность более чем в 70% образцов первичной остеосаркомы и во всех изученных клеточных линиях этого злокачественного новообразования, *in vitro* при нокауте по *PRAME* наблюдали значительное торможение пролиферации опухолевых клеток,

колониеобразования и остановку клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub> [597]. Zou C. и соавт. (2012) выделили мРНК у 96,4% больных остеосаркомой [598]. Наши результаты подтверждают это наблюдение: среди проанализированных РТГ *PRAME* был активен в 9 из 11 клеточных линий остеогенной саркомы. Zhao Q. и соавт. (2022) проанализировали паттерны экспрессии и прогностическое значение *PRAME* в различных солидных опухолях и обнаружили, что ген *PRAME* активирован в большинстве злокачественных новообразований, и его высокая экспрессия ассоциирована с низкой общей выживаемостью пациентов [599]. Кроме того, уровни экспрессии *PRAME* коррелировали с лимфоцитарной инфильтрацией, системами иммунных контрольных точек (CTLA-4 и PD-1/PD-L1), мутационной нагрузкой, микросателлитной нестабильностью.

Интересно, что в других исследованиях отмечали высокую частоту экспрессии NY-ESO1 в синовиальных саркомах, обнаруживаемую иммуногистохимически: по данным Jungbluth A.A. и соавт. (2001), 20 или 25 синовиальных сарком экспрессировали *NY-ESO1* [130]. Потенциальная диагностическая роль экспрессии *NY-ESO1* базировалась на выявлении высокой степени экспрессии этого антигена в синовиальных саркомах по сравнению с другими опухолями мезенхимального происхождения [600]. Iuga K. и соавт. (2017) продемонстрировали, что экспрессия генов *NY-ESO1* и *PRAME* в синовиальных саркомах ассоциирована с плохим прогнозом [601]. Эти подходы позволили в дальнейшем разработать вакцину на основе NY-ESO1-активированных дендритных клеток путем трансдукции лентивирусным вектором, которая продемонстрировала высокую иммунологическую эффективность для пациентов с рефрактерной синовиальной саркомой [602]. В то же время анализ более 400 образцов различных сарком, проведенный Jo U. и соавт. (2022), показал, что только 14,75% были иммунореактивными по отношению к NY-ESO-1, а наиболее частым типом опухоли в группе с положительным результатом была миксоидная липосаркома (70,3%, 45/64), затем синовиальная саркома (17,2%, 11/64) [132]. В нашем исследовании в культурах синовиальных сарком не выявили высокую частоту экспрессии *NY-ESO1*, активность этого гена была обнаружена в 2 образцах из 14 (14,28%). Среди культур липосарком экспрессия *NY-ESO1* была выявлена в 4 образцах из 7 (57,14%). Столь противоречивый характер результатов, полученных разными научными группами, можно объяснить высокой степенью гетерогенности СМТ/ОС в проявлении активности генов РТА, которая, вероятно, носит индивидуальный характер и зависит от многих факторов, которые еще предстоит обнаружить.

Среди проанализированных клеточных культур опухолей эпителиального происхождения 2 культуры КРР и 1 культура РМП не экспрессировали *PRAME*, при этом это был единственный активный РТГ в клетках РП. Действительно, в злокачественных новообразованиях почки часто выявляют активность *PRAME*, в частности, Dannenmann S.R.

и соавт. (2013) обнаружили гиперэкспрессию *PRAME* в 39% опухолевых образцов, при этом наибольший уровень экспрессии *PRAME* был ассоциирован с молекулярным субтипом светлоклеточного почечно-клеточного рака, имеющим неблагоприятный прогноз [603]. Ряд исследователей рассматривают антиген *PRAME* как прогностический биомаркер при трижды негативном РМЖ и связывают его присутствие в опухолевых клетках с их способностью к миграции и инвазии, ключевых признаков прогрессирующего и метастатического заболевания [604]. В нашем исследовании была получена одна клеточная линия трижды негативного РМЖ с гиперэкспрессией *PRAME*, в 70 раз превышающей уровень экспрессии референсного гена. Mahmoud A.M. (2018) отмечает, что среди РТА для опухолей молочной железы наиболее значимыми являются антигены семейств *MAGE* (*MAGEA*, *MAGEB*, *MAGEC*), *GAGE* (*GAGEA*, *GAGEB*, *PAGE*, *XAGE*), *NY-ESO1*, *BAGE* и *BORIS* [605]. Тем не менее другие исследователи выявляли частую экспрессию *SCP1* (65% образцов) и *SSX4* (65%), но не *MAGE* и *NY-ESO1* [148]. В когорте из 82 больных РМЖ Taylor M. и соавт. (2007) обнаружили, что более  $\frac{2}{3}$  опухолей экспрессировали на уровне мРНК, по меньшей мере один из следующих РТА: *STAG1*, *BAGE1* и *MAGEA10*, и все они, как известно, являются сильными иммуногенными мишенями цитотоксических Т-лимфоцитов [606].

Имуногистохимический анализ парафиновых срезов РМП, предпринятый Mohsenzadegan M. и соавт. (2022) для выявления степени экспрессии и клинко-патологического значения РТА *MAGE-A6* и *MAGE-A11*, показал высокую степень экспрессии и наличие значительной положительной корреляции между присутствием этих антигенов и стадией заболевания, а также степенью инвазии [607]. Все культивируемые клетки РМП в нашем исследовании экспрессировали *MAGEA1*, что согласуется с данными других авторов, полученных на срезах опухолевой ткани.

Дополнительным аспектом, который следует учитывать, обсуждая экспрессию РТА при солидных опухолях, является надежность методов, используемых для характеристики и измерения РТА в малигнизированных тканях. Количественная полимеразная цепная реакция – это простой и чувствительный метод для определения профилей РТА в опухолях, позволяющий получить информацию при малом количестве материала. Однако использование мРНК в качестве суррогатного параметра экспрессии РТА предполагает, что ее уровень коррелирует с уровнем белка, который она кодирует. Довольно часто не наблюдается прямой корреляции между экспрессией РТГ и уровнем белка, содержащегося в злокачественных клетках, так как происходит изменение путей протеасомной деградации и посттрансляционных модификаций, этапов, предшествующих презентации антигена [606]. Как известно, потеря компонентов процессинга антигенов является механизмом уклонения опухолевых клеток от воздействия иммунной системы [75], который реализуется при злокачественных новообразованиях и может

способствовать отсутствию корреляции между уровнями мРНК и белка для некоторых РТА, таких как *MAGE1* [608].

Таким образом, прямое обнаружение и количественное определение белков РТА, в частности, иммуногисто- и цитохимическими методами, позволяет, как ожидается, более точно определить локализацию изучаемых РТА на поверхности опухолевых клеток, что важно для разработки иммунотерапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований.

Проведенная нами кластеризация данных по экспрессии РТГ на ранних этапах культивирования позволила выделить три основных кластера: в первый кластер вошли культуры МК и СМТ/ОС, характеризующиеся гиперэкспрессией *GAGE*, *PASD1*, *PRAME*; во втором кластере оказались культуры МК и ЭО (КРР, РМЖ, РМП) с гиперэкспрессией генов *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PRAME*; большая часть образцов культивируемых клеток оказалась в третьем кластере: культуры СМТ/ОС, МК и ЭО с отсутствием или низкой активностью большинства генов, но экспрессирующие *HAGE*, *GAGE*, *NY-ESO-1* и *PRAME* (рис. 40).

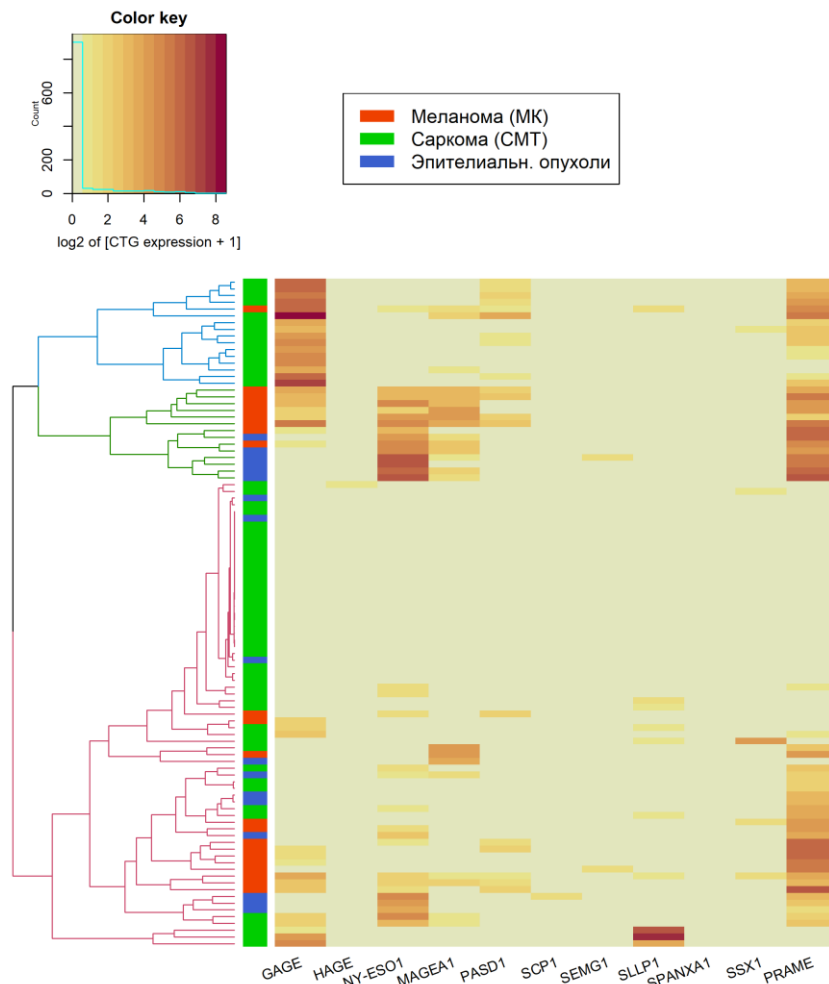


Рисунок 40 – Графическое изображение кластеризации образцов культивируемых клеток солидных опухолей по экспрессии РТГ на начальных этапах культивирования ( $\leq 5$  пассаж)

Изучение экспрессии дифференцировочных антигенов и других иммуногисто- и цитохимических маркеров в культивируемых *in vitro* клетках МК, СМТ/ОС и ЭО на ранних пассажах (<15) продемонстрировало преимущественное сохранение иммунофенотипического профиля экспрессии исходной опухолевой ткани, что позволяет использовать культивируемые малигнизированные клетки до 15 пассажа в качестве клеточных моделей для решения задач доклинических исследований. Установлен факт гетерогенной изменчивости презентации ОАА культивируемыми клетками МК, приводящей к обеднению специфического антигенного профиля и HLA I класса, появлению молекул HLA II класса, усилению презентации антигенов, ассоциированных с процессами инвазии и метастазирования. Отсутствие однонаправленного характера антигенных изменений в культивируемых клетках МК определяет необходимость контролировать экспрессию ОАА и антигенов МНС в опухолевых клетках в процессе приготовления на их основе противоопухолевых биомедицинских клеточных продуктов и вести отбор клеточных линий, стабильно продуцирующих ОАА. Проведенное исследование позволило отобрать клеточные линии МК, стабильно воспроизводящие специфический антигенный профиль в процессе длительного культивирования, которые явились субстратом для создания клеточного продукта для нагрузки и активации дендритных клеток при создании противоопухолевых клеточных препаратов на их основе.

Несмотря на то, что клетки МК характеризуются более выраженной экспрессией изучаемых генов РТА, полученные данные позволяют сделать вывод, что существует сходство профилей экспрессии РТА клетками МК и клетками других опухолей: СМТ/ОС и ЭО (рис. 41), что дает теоретические предпосылки для использования клеток МК как источник РТА в клеточной иммунотерапии на основе активированных дендритных клеток.

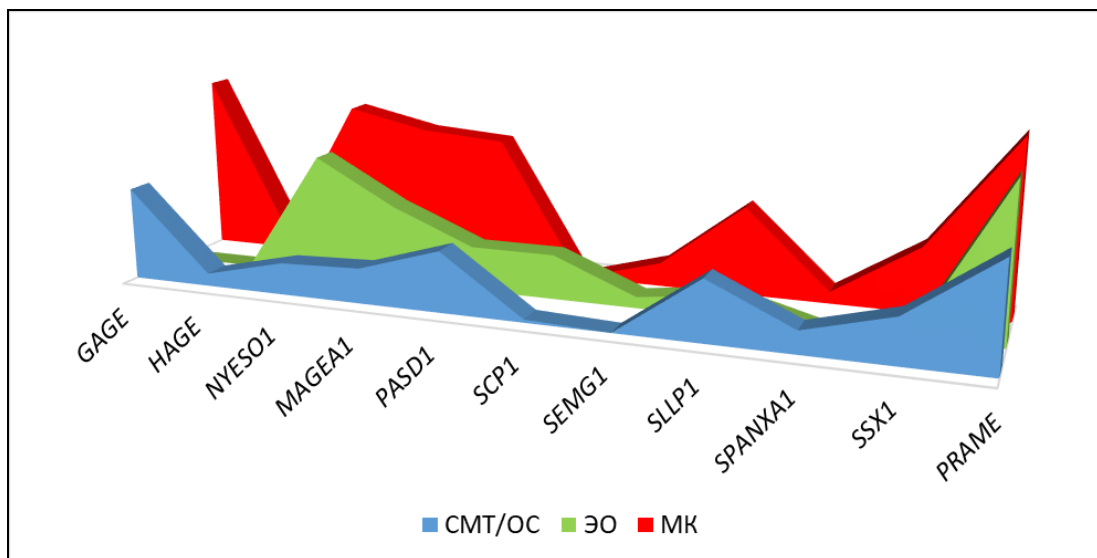


Рисунок 41 – Графическое сопоставление профилей экспрессии генов РТА культивируемыми клетками МК, СМТ/ОС и опухолей эпителиального происхождения (ЭО)

Культивируемые клетки МК характеризуются большей легкостью перевода их в культуру, более интенсивной пролиферацией и возможностью нарастить большую массу идентичного клеточного материала в короткий период времени. Отобранные по продукции РГА, они могут служить источником клеточных лизатов, предназначенных для нагрузки и активации дендритных клеток в процессе создания противоопухолевых вакцин для лечения больных солидными опухолями широкого спектра локализаций при условии совпадения профиля экспрессии РГА.

### **3.3. Продукция иммуносупрессивных факторов культивируемыми клетками солидных опухолей**

#### **3.3.1. Оценка продукции МІСА культивируемыми клетками солидных опухолей**

Анализ результатов создания и применения вакцин для лечения солидных опухолей позволяет сделать вывод, что на современном этапе исследований в этой области пока не удастся добиться значимой клинической эффективности подобной терапии злокачественных новообразований. Действительно, Rosenberg S.A. и соавт. (2004) проанализировали свой многолетний опыт применения разнообразных схем вакцинотерапии и пришли к выводу, что доля объективных клинических ответов (полный или частичный регресс опухоли) составляет 2,6% случаев [347]. В связи с этим изучение причин несоответствия теоретически ожидаемого эффекта лечения и наблюдений в клинической практике становится в наши дни особенно актуальным.

Исследования последних лет демонстрируют, что в результате опухолевой прогрессии у злокачественных клеток появляется способность продуцировать растворимые факторы, создающие в собственном микроокружении условия локальной иммунодепрессии, а также способные оказывать иммуносупрессорное воздействие на системном уровне. К таким факторам относят лиганд активационного рецептора НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов МІСА/В [212].

В настоящее время активно проводится изучение иммуносупрессорных молекул, выделяемых опухолевыми клетками, в том числе лиганда рецептора НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов NKG2D. Полученные данные свидетельствуют, что циркуляция молекул МІСА/В может оказывать ингибирующий системный эффект на функции иммунных клеток [609; 610]. Больные с диссеминированными формами опухолей эпителиального происхождения демонстрируют повышенное содержание этих молекул в периферической крови, сниженную активность НК-клеток и ЦТЛ, при этом в ряде случаев

выявляют корреляцию между высоким уровнем молекул МІСА/В и низкой продолжительностью жизни пациентов [611; 612].

Мы изучили количественное содержание МІСА в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей в процессе пассирования.

На ранних пассажах все культуры солидных опухолей синтезировали в микроокружение большее количество МІСА, по сравнению с контролем, которым служили супернатанты культур нормальных фибробластов легких эмбриона человека FLECH, при этом различия между культурами клеток разного гистотипического происхождения были статистически значимы, согласно критерию Краскела–Уоллиса ( $p=2e-16$ ) (рис. 42). Парное сравнение данных по культурам с контрольными образцами фибробластов продемонстрировало статистически значимые различия в продукции МІСА (табл. 16).

Таблица 16 – Содержание МІСА (пг/мл) в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей на ранних пассажах (1–5) культивирования

Тип культуры	n	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль 25–75%	U(p)*
Контроли							
DMEM	13	0,13	0	0	0,95	0–0	–
DMEM+FCS	13	10,53	9,42	3,45	17,21	6,25–16,1	–
FLECH	17	16,58	18,54	5,12	28,9	12,3–19,3	–
Образцы							
МК	107	224,61	71,01	9,96	1897,71	31,24–184,21	5,9e-08
СМТ/ОС	38	124,87	99,52	13,58	535,95	28,13–175,41	2,9e-07
РП	18	145,77	80,66	9,61	966,27	38,92–147,74	5,3e-07
КРР	7	102,78	113,16	17,25	226,76	25,73–130,32	1,0e-06
РМЖ	15	169,33	78,45	19,07	710,38	33,45–228,12	9,4e-07
РМП	22	146,82	147,72	15,92	385,52	38,83–228,75	3,6e-08
РПЖ	8	72,17	56,33	21,62	159,97	35,95–86,77	6,7e-08
РЯ	6	60,99	41,30	18,93	231,38	27,15–59,37	1,2e-05

*Примечание:* DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки; DMEM+FCS – контрольный образец питательной среды с сывороткой; FLECH – супернатанта культуры фибробластов легкого эмбриона человека. \* – статистически значимо при сравнении с контролем FLECH.

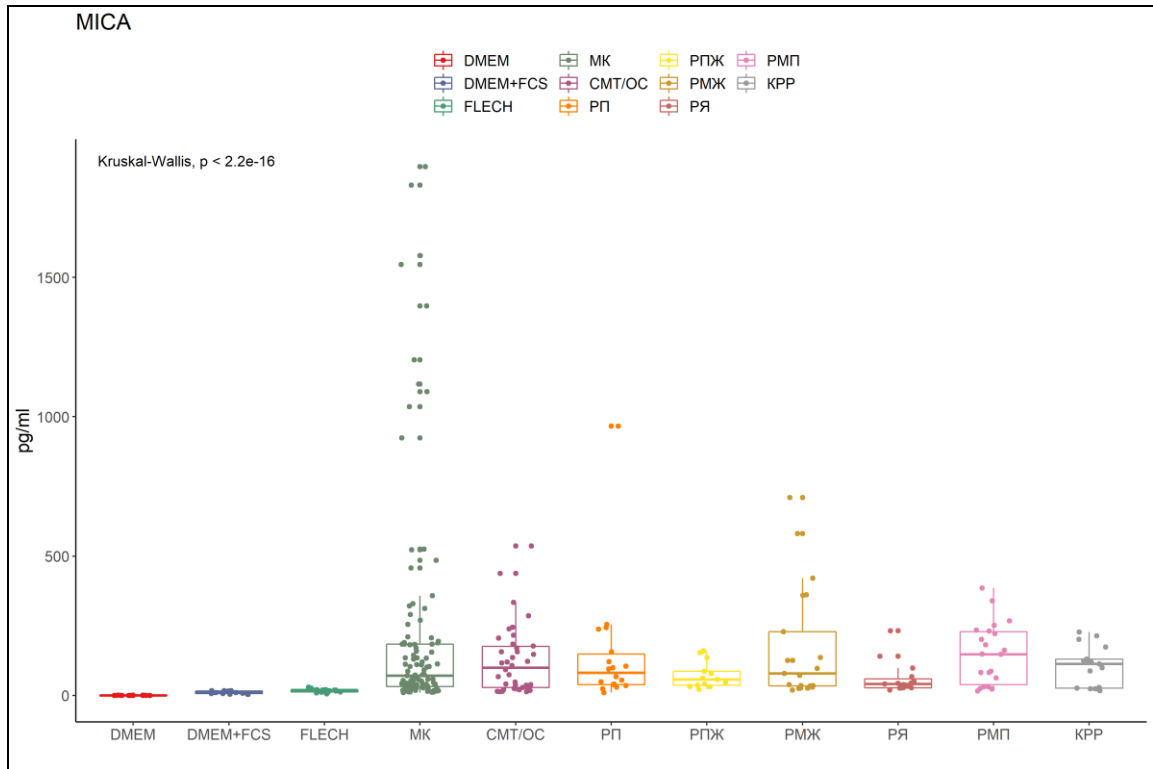


Рисунок 42 – Содержание МІСА в супернатантах культур клеток солидных опухолей на ранних этапах культивирования:

DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки;

DMEM+FCS – контрольный образец питательной среды с сывороткой; FLECH – супернатанта фибробластов легкого эмбриона человека. Различия статистически значимы ( $p < 2,2e-16$ )

В то же время наблюдали значительную вариабельность показателей в пределах определенных гистотипов опухолей. Было исследовано 107 культур МК, для них показателем было количество МІСА (min 9,96 – max 1897,71 пг/мл), этот разброс значений был самым значительным. Для 18 культур РР (min 9,61 – max 966,27 пг/мл), для культур СМТ/ОС (n=38) (min 13,58 – max 535,95 пг/мл). Наименьшее количество МІСА обнаружили в супернатантах клеток РРЖ и РЯ (медиана 56,33 пг/мл (min 21,62 – max 159,97 пг/мл) и 41,30 пг/мл (min 18,93 – max 231,38 пг/мл) соответственно).

Таким образом, у разных пациентов клетки одних и тех же гистологических типов опухолей *in vitro* продуцировали разное количество лиганда активационных рецепторов цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток, в том числе и сопоставимое с контролем.

Исследование Ја Н.У. и соавт. (2014) продемонстрировало, что процент экспрессии мембранного МІСА был значительно увеличен в тканях РР человека и опухолевых клеточных линиях по сравнению со здоровыми индивидуумами и клетками линии эмбриональной почки НЕК293 [613]. При этом в сыворотке крови пациентов с РР наблюдали высокие концентрации этого фактора. Эксперименты на животных убедительно показали, что эктопическая экспрессия лигандов NKG2D на различных линиях опухолевых клеток приводила к отторжению опухоли



в модельных системах посредством активации НК-клеток и в некоторых случаях CD8<sup>+</sup>-Т-клеток [614]. В частности, Guerra N. и соавт. (2008) использовали генетический подход и показали, что при инокуляции NKG2D-дефицитной трансгенной аденокарциномы предстательной железы мыши в организм животных развивались в три раза более агрессивные опухоли, чем в NKG2D-интактной модели [615]. Таким образом, это исследование продемонстрировало, что иммунитет, опосредованный взаимодействием лиганд-NKG2D, играет значительную роль в контроле инициации и прогрессирования опухоли.

В отличие от убедительных данных, полученных на животных моделях, клинические данные, свидетельствующие о значении лигандов NKG2D в опухолевом иммунитете, довольно противоречивы. Было показано, что на ранних стадиях РМЖ и КРР уровни экспрессии MICA в ткани положительно коррелируют с увеличением выживаемости больных [616; 617]. В то же время были опубликованы исследования, где при инвазивном раке РМЖ и РЯ уровни экспрессии MICA в тканях опухоли коррелировали с плохим прогнозом [618; 619]. Аналогичные данные были получены Espinoza I. и соавт. (2021): они обнаружили гиперэкспрессию этого лиганда в тканях КРР, по сравнению с непораженной тканью, которая не зависела от стадии заболевания, гистотипа опухоли и статуса метастазирования в лимфоузлы, однако коррелировала с уменьшением общей выживаемости пациентов [620].

Zhao Y. и соавт. (2017) представили данные мета-анализа по оценке прогностической значимости лиганда MICA/B, охватывающего более 2588 пациентов с десятью различными видами злокачественных новообразований, включая рак шейки матки, яичников, желудка, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточный рак полости рта, рак легких, меланому кожи и множественную миелому [621]. Высокие концентрации свободных лигандов MICA и MICB в сыворотке крови пациентов были ассоциированы с меньшей общей выживаемостью больных без существенной разницы между типами рака. С другой стороны, высокий уровень экспрессии MICA/B опухолевыми клетками, обнаруживаемой иммуногистохимически, был связан с более длительной выживаемостью при опухолях пищеварительной системы. Эти данные указывают на то, что продукция лигандов NKG2D клетками опухолей позволяет им «уклоняться» от иммунного ответа, избегая обнаружения НК-клетками,  $\gamma\delta$ T-клетками и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами. И наоборот, высокая экспрессия MICA/B была связана с благоприятным исходом при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта, подтверждая мнение, что MICA/B является очень важной молекулой для проявления цитотоксических свойств клеток иммунной системы.

В результате длительного пассирования клеточные линии злокачественных новообразований приобретали способность увеличивать синтез и выделение в микроокружение MICA (рис. 43).

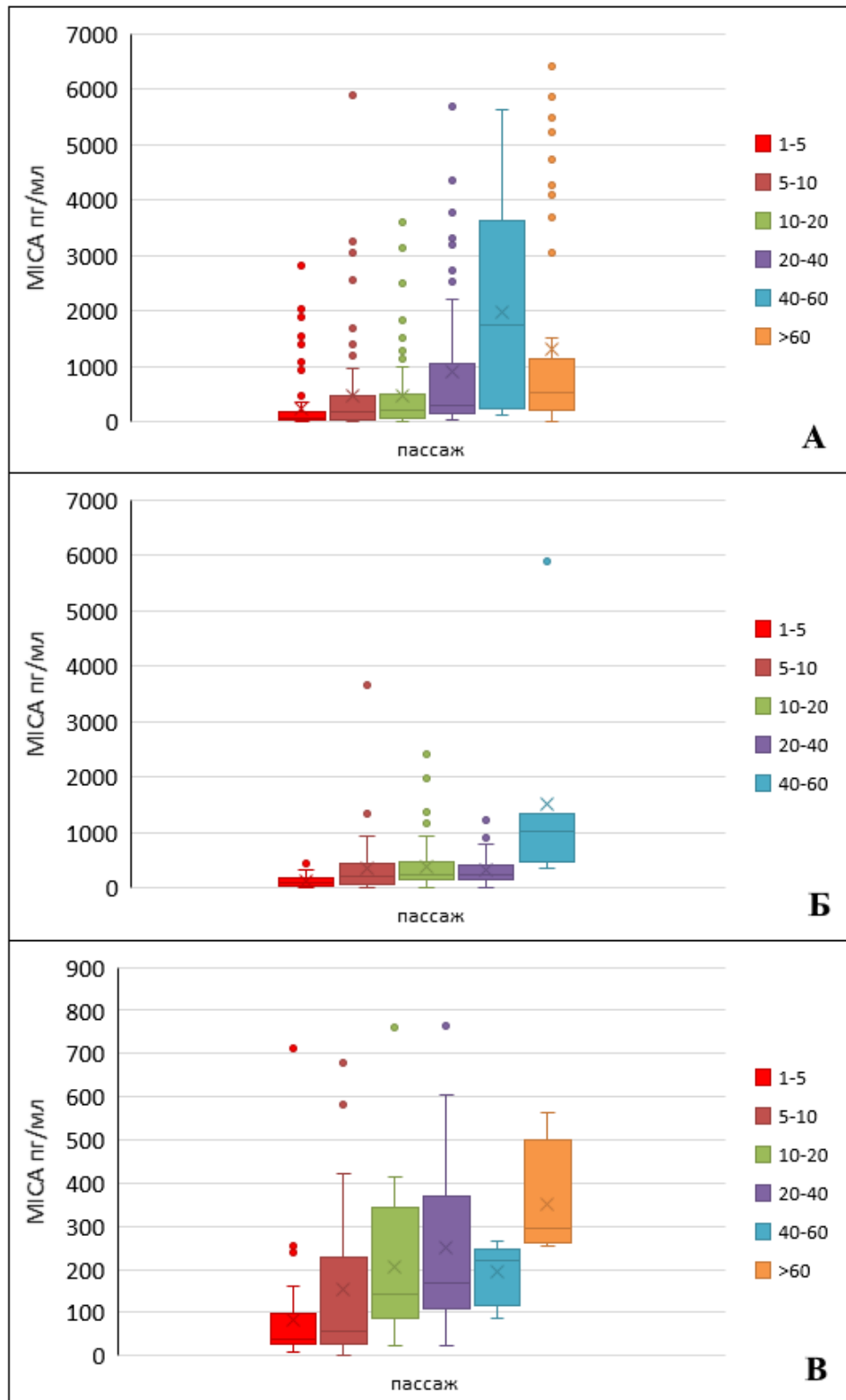


Рисунок 43 – Динамика продукции МІСА клетками солидных опухолей в процессе длительного культивирования:  
 А – культуры МК; Б – культуры СМТ/ОС;  
 В – культуры клеток опухолей эпителиального происхождения

Исследование супернатантов клеточных линий МК, культивируемых более 60 пассажей, показало min количество МІСА – 15,168 пг/мл и max – 6415,66 пг/мл. При этом, начиная с 20 пассажа, различия в содержании МІСА были статистически значимы при сравнении с концентрацией этого фактора в супернатантах культур до 5 пассажа, согласно критерию Вилкоксона ( $p=0,00389$ ). Для культивируемых клеток СМТ/ОС min и max показатели на 40–60 пассаже составили 356,22 и 5884,88 пг/мл соответственно, что статистически значимо отличалось от измерений, сделанных на начальных этапах культивирования ( $p=0,0004$ ). Для клеток опухолей эпителиального происхождения эти данные составили, 254,7 и 564,57 пг/мл соответственно, начиная с 20 пассажа, различия были статистически значимы, в сравнении с 1–5 пассажем, ( $p=0,00753$ ) (табл. 17).

Таблица 17 – Динамика содержания МІСА (пг/мл) в супернатантах культур клеток солидных опухолей в процессе пассирования

Пассаж	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль (25–75%)	W(p)*
Культуры МК						
1–5	243,313	71,011	9,965	2830,57	31,24–184,21	
5–10	477,158	190,81	12,31	5892,45	41,73–447,43	0,31193
10–20	481,097	198,2	13,198	3600	68,25–469,82	0,14612
20–40	904,290	289,88	23,01	5681,23	143,13–999,14	0,00389
40–60	1979,077	1741,51	119,56	5637,8	247,99–3468,75	0,00002
>60	1304,466	521,715	15,168	6415,66	200,87–1093,52	0,00037
Культуры СМТ/ОС						
1–5	124,872	99,525	13,581	535,952	28,13–175,4	
5–10	349,786	221,2	13,1	3658,15	93,74–414,72	0,03989
10–20	396,122	238,963	10,86	2404,007	160,23–467,97	0,00004
20–40	313,313	246,055	18,49	1225,782	145,42–393,69	0,00038
40–60	1525,454	1023,44	356,22	5884,88	472,74–1234,07	0,0004
Культуры эпителиальных опухолей						
1–5	83,518	38,532	9,61	710,38	26,41–90,52	
5–10	154,107	58,95	7,203	679,95	32,96–227,1	0,03989
10–20	207,374	141,133	24,68	761,14	90,67–309,07	0,11241
20–40	250,052	170,005	23,474	765,32	119,7–309,56	0,00753
40–60	192,645	218,945	86,54	265,5	146,9–237,02	0,02721
>60	352,769	295,905	254,7	564,57	273,27–375,39	0,0147

Примечание: \* – сравнение с данными по 1–5 пассажи, значимость критерия Вилкоксона.

Индивидуальное наблюдение за продукцией МІСА культурами клеток солидных опухолей показало, что этот процесс усиливается в ходе пассирования в большинстве случаев для клеток МК и опухолей эпителиального происхождения, среди культур СМТ/ОС наблюдали варианты стабильно высокой продукции МІСА до 40 пассажа (рис. 44).

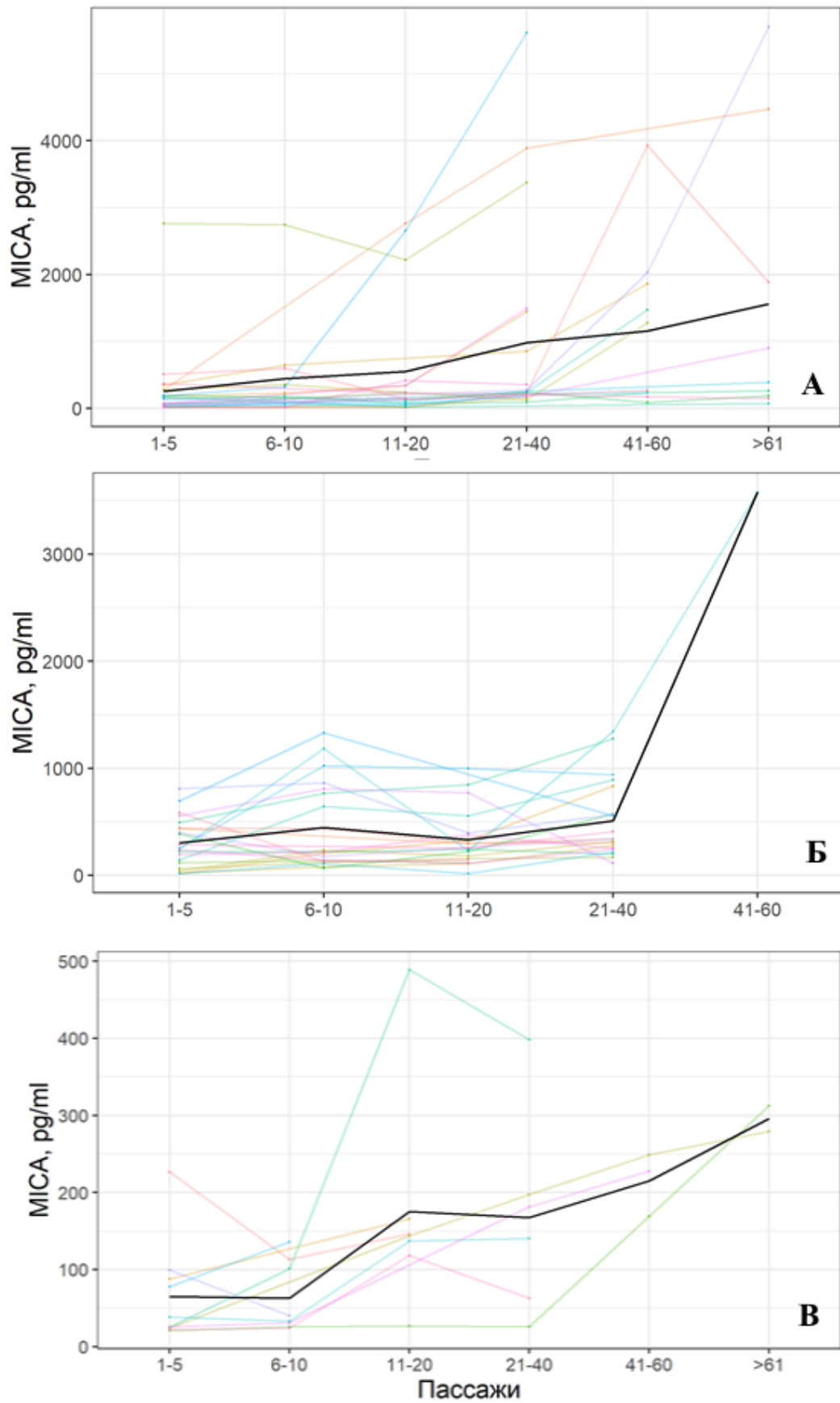


Рисунок 44 – Динамика продукции МІСА индивидуальными культурами клеток солидных опухолей при непрерывном культивировании (>60 пассаж):  
 А – клетки МК; Б – клетки СМТ/ОС; В – клетки опухолей эпителиального происхождения

В настоящее время активно изучаются молекулярные механизмы процессов «потери» в результате протеолиза лигандов MICA и обнаружено, что на поверхности опухолевых клеток MICA ассоциирован с протеином 5 эндоплазматического ретикулула (ERp5), который участвует в процессинге синтезируемых клеткой белков [622]. ERp5 и MICA образуют транзиторийный дисульфидный комплекс, из которого путем протеолитического расщепления за счет редукции дисульфидной связи в мембранном проксимальном  $\alpha 3$  домене молекула MICA высвобождается в микроокружение. Удалось установить антагонистическое воздействие интерферона- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) и INF- $\gamma$  на уровень экспрессии лиганда рецептора NKG2D в опухолевых клетках [623]. INF- $\alpha$  оказывает стимулирующий эффект на уровень транскрипции MICA, усиливая промоторную активность, в то же время INF- $\gamma$  модулирует экспрессию MICA не только на стадии транскрипции, но и путем инициации протеолитического расщепления молекул MICA металлопротеиназами клеточного матрикса. Лиганд рецептора NKG2D может быть подвержен гидролизу за счет активности некоторых интегринов и металлопротеиназ, находящихся в опухолевом микроокружении, включая ADAM9, ADAM10, ADAM17, матриксные металлопротеиназы MMP9, MMP14 и дисульфидизомеразу Erp5 с образованием растворимой формы лиганда [624]. Как было установлено, металлопротеиназа MMP2 опосредует «слющивание» MICA с мембран клеток РП [625].

Sun D. и соавт. (2011) продемонстрировали, что шеддинг MICA не зависит от степени дифференцированности остеосарком и присутствует на ранних стадиях развития опухоли [218]. В то же время в клетках остеосаркомы с инвазивными свойствами гиперэкспрессируется металлопротеиназа MMP9, участвующая в ремоделинге структур внеклеточного матрикса. Авторы данного исследования показали, что шеддинг MICA ассоциирован с активностью MMP9. Свободно циркулирующий MICA, присоединяющийся к рецептору NKG2D, инициирует эндоцитоз последнего и его деградацию посредством лизосом, нарушая тем самым механизм иммунологического надзора посредством NKG2D [626]. Свободный лиганд влияет на распознавание НК-клетками и их миграцию, ингибирует цитотоксические свойства НК-клеток, нарушает гомеостаз натуральных киллеров, приводит к истощению этой популяции клеток иммунной системы [627]. В настоящее время на предклинических моделях с использованием трансплантируемой сингенной опухоли B16F10-sMICB исследуется возможность комбинированного применения терапевтических моноклональных антител против PDL1 и антител, нацеленных на циркулирующие молекулы MIC [628]. Сообщается, что комбинированная терапия анти-PDL1 и анти-MIC антителами привела к заметному ингибированию пролиферации опухолевых клеток и значительно увеличила процент NKG2D<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в селезенке по сравнению с терапией одним агентом.

Были созданы также другие моноклональные антитела против MICA/B, которые нацелены на домен  $\alpha 3$  и ингибируют протеолитический шеддинг [198]. Одно из таких антител (7C6) ингибировало выделение MICA и MICB опухолевыми клетками человека, задерживало рост меланомы мыши и карциномы толстой кишки в экспериментальных моделях, ингибировало метастазирование меланомы человека в гуманизированной модели мыши, а его механизм действия включал стимуляцию экспрессии рецептора NKG2D и CD16-зависимые эффекторные функции, опосредованные NK-клетками [610]. Многие исследователи видят будущее иммуноонкологии в использовании комбинированной терапии антителами против MICA/B и лекарственными средствами, нацеленными на негативную регуляцию опухолевого микроокружения, способствующего опухолевому росту, в частности, на инфильтрирующие опухоль клетки иммунной системы с иммуносупрессирующими свойствами [198; 629; 630].

### **3.3.2. Оценка продукции TGF- $\beta$ <sub>1</sub> культивируемыми клетками солидных опухолей**

Среди разнообразных молекул, которые синтезируются и выделяются опухолевыми клетками для формирования специфического иммуносупрессорного микроокружения, присутствует трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$ , который у млекопитающих существует в виде трех изоформ, но TGF- $\beta$ <sub>1</sub> – наиболее распространенная и универсально экспрессируемая изоформа, и большинство исследований посвящено именно экзогенному TGF- $\beta$ <sub>1</sub> [631]. В норме TGF- $\beta$ <sub>1</sub> может синтезироваться многими типами клеток, в том числе активированными Т-лимфоцитами, макрофагами, и ингибирует продукцию IL-2, IL-4, IL-7, в результате чего происходит блокада IL2-зависимой пролиферации ЦТЛ [64]. TGF- $\beta$ <sub>1</sub> также ингибирует дифференцировку Т-клеток и предохраняет наивные Т-клетки от приобретения эффекторных (цитотоксических или хелперных) функций [632]. В естественных условиях TGF $\beta$ <sub>1</sub>-дефицитные мыши не имеют клеток Лангерганса в эпидермисе, хотя предшественники этих клеток у мышей имеются, что говорит о необходимости присутствия TGF- $\beta$ <sub>1</sub> для нормального развития клеток Лангерганса и/или их миграции в эпидермис [223].

Макрофаги секретируют TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, который регулирует их функции в тканях [254]. TGF- $\beta$  является ключевым компонентом и модулятором опухолевого микроокружения, играющим важную роль в подавлении функции эффекторных иммунных клеток и поддержании «ускользания» от иммунной системы, действуя паракринным или аутокринным образом [633]. В микроокружении опухоли TGF- $\beta$  секретируется не только малигнизированными клетками, но и регуляторными Т-клетками (Tregs), фибробластами стромы опухоли, макрофагами M2, регуляторными В-клетками (Bregs) и миелоидными супрессорными клетками (MDSCs), которые играют важную роль в прогрессировании опухоли [634]. По данным других исследователей, у больных раком легкого, печени, молочной железы, яичников, мочевого

пузыря, желудка, колоректальным раком концентрация TGF- $\beta_1$  в плазме крови повышена и коррелирует со степенью прогрессии опухоли [635; 636]. Кроме того, метастатические формы заболевания при раке почки, молочной железы, желудка, толстой кишки, немелкоклеточном раке легкого, меланоме кожи также ассоциированы с повышенным уровнем TGF- $\beta_1$  в крови больных. У пациентов с диссеминированными формами заболевания наблюдали блокаду функционирования NK-клеток, и предполагается, что TGF- $\beta_1$ , продуцируемый у онкологических больных, может влиять на синтез и функцию NK-рецепторов, вовлеченных в лизис клеток опухоли [637]. При этом иммуносупрессирующее действие TGF- $\beta_1$ , присутствующего в плазме больных, модулирует ответы NK-клеток снижением экспрессии NKG2D [243]. Lippitz В.Е. (2013) указывает, что повышенная концентрация этого фактора в крови онкологических больных может рассматриваться как общий феномен, ассоциированный со злокачественными новообразованиями [638].

Мы изучали концентрацию TGF- $\beta_1$  в супернатантах культур опухолевых клеток, выделенных из тканей злокачественных новообразований пациентов. При этом оказалось, что содержание этого фактора в супернатантах культивируемых малигнизированных клеток существенно превышает контрольные показатели, определяемые на культуре фибробластов легкого эмбриона человека – медиана 0,239 нг/мл (min 0 – max 1,932 нг/мл): МК (n=82) – медиана 2,763 нг/мл (min 0,282 – max 33,56 нг/мл); СМТ/ОС (n=53) – медиана 1,037 нг/мл (min 0,207 – max 10,888 нг/мл); РП (n=13) – медиана 5,04 нг/мл (min 1,23 – max 19,338 нг/мл) (табл. 18).

Таблица 18 – Содержание TGF- $\beta_1$  (нг/мл) в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей на ранних пассажах (1–5) культивирования

Тип культуры	n	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль 25–75%	U(p)*
Контроли							
DMEM	10	0,004	0	0	0,023	0–0,004	–
DMEM+FCS	10	0,005	0	0	0,034	0–0,007	–
FLECH	11	0,465	0,239	0,082	1,932	0,184–0,436	–
Образцы							
МК	82	5,194	2,763	0,282	33,56	1,166–5,896	3,0e-06
СМТ/ОС	53	2,097	1,037	0,207	10,888	0,63–3,276	0,00014
РП	13	6,580	5,04	1,23	19,338	3,075–9,0	3,2e-06
КРР	7	2,703	1,34	0,206	12,278	0,774–2,824	0,00410
РМЖ	15	2,545	2,829	0,458	4,346	1,563–3,522	3,4e-05
РПЖ	8	1,990	1,506	0,3	4,73	1,059–2,714	0,00152
РЯ	6	2,818	2,693	0,458	5,725	1,073–4,211	0,00038

*Примечание:* DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки; DMEM+FCS – питательной среды с сывороткой; FLECH – супернатанта культуры фибробластов легкого эмбриона человека. \* – статистически значимо по сравнению с контролем FLECH.

В культурах клеток опухолей данных типов разброс значений был самым значительным (рис. 45).

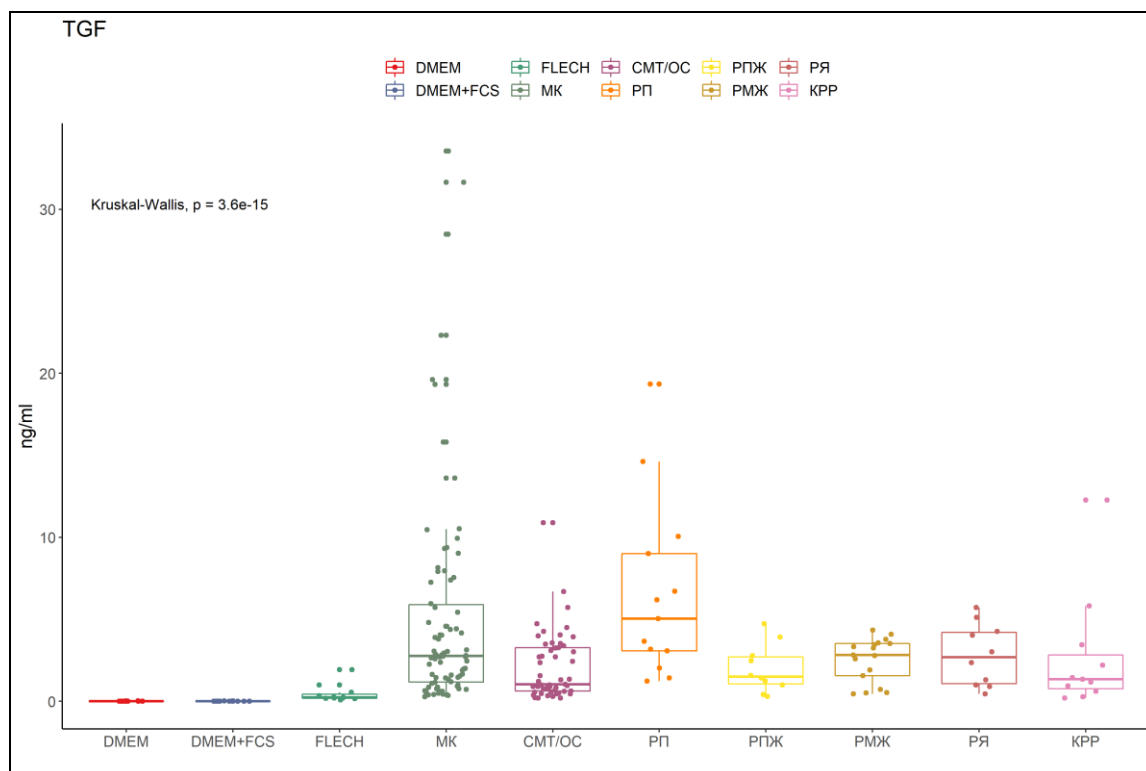


Рисунок 45 – Содержание TGF-β<sub>1</sub> в супернатантах культур клеток солидных опухолей на ранних этапах культивирования:

DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки;

DMEM+FCS – питательной среды с сывороткой;

FLECH – супернатанта фибробластов легкого эмбриона человека

Наименьшей продукцией TGF-β<sub>1</sub> характеризовались клетки РПЖ (n=10): медиана 1,506 нг/мл (min 0,3 – max 4,73 нг/мл). Blanchère M. и соавт. (2002) изучали продукцию TGF-β<sub>1</sub> и TGF-β<sub>2</sub> культивируемыми клетками, выделенными из нормальных и малигнизированных тканей предстательной железы и обнаружили, что андроген-независимые клеточные линии РПЖ синтезировали меньшее количество этих факторов, чем линия иммортализованных клеток эпителия предстательной железы, и в процессе культивирования клетки РПЖ полностью теряли способность к их продукции, при этом присутствие стромальных фибробластов не оказывало стимулирующего действия в системе *in vitro* [639].

В более позднем исследовании Sun D.Y. и соавт. (2019), используя модель ксенотрансплантатов Danio rerio, продемонстрировали, что фибробласты стромы опухоли предстательной железы принимают участие в активации процессов пролиферации и миграции злокачественных клеток за счет стимуляции продукции ими TGF-β<sub>1</sub> [31].



В нашем исследовании ряд культур клеток МК продуцировал самые значимые количества TGF- $\beta_1$ , в этом отношении интересна работа Bennicelli J.L. соавт. (1993), которые анализировали 8 первичных и 21 метастатическую клеточную линию МК на предмет продукции цитокинов и факторов роста и обнаружили, что культивируемые клетки МК синтезировали TGF- $\beta$  в 8 случаях из 25, IL-1 $\alpha$  (4/25), IL-1 $\beta$  (12/25), IL-6 (13/29), IL-8 (29/29) и GM-CSF (11/29) [640].

Lauden L. и соавт. (2014) оценили экспрессию и продукцию TGF- $\beta_1$  клетками МК и продемонстрировали, что метастатические меланомы человека экспрессируют и секретируют значительно большее количество TGF- $\beta_1$  по сравнению с поражениями невуса и первичными опухолями [641]. Внутривенная инъекция высокометастатических клеток МК человека, экспрессирующих этот фактор, приводит к формированию дистальных метастазов меланомы у иммунодефицитных мышей, при этом ингибирование активности TGF- $\beta_1$  не препятствует дистальной диссеминации клеток МК, но ограничивает их пролиферацию и рост в новом микроокружении.

В нашем исследовании длительное пассирование приводило к увеличению синтеза и экскреции в окружающую среду TGF- $\beta_1$  (рис. 46 А, Б, В). Культуры МК после 60 пассажа продуцировали статистически значимо большее количество TGF- $\beta_1$  по сравнению с начальными этапами культивирования (1–5 пассаж) ( $p=0,030214$ , табл. 19). Вместе с тем клетки МК *in vitro* проявляли индивидуальные свойства, и количество TGF- $\beta_1$ , синтезируемое в культурах, могло значительно варьировать, что нашло отражение в большом разбросе значений: 1–5 пассаж (min 0,282 – max 33,56 нг/мл); >60 пассаж (min 0,396 – max 50,05 нг/мл).

В культурах СМТ/ОС и ЭО наблюдали аналогичную тенденцию: 1–5 пассаж (min 0,208 – max 6,703 нг/мл); >60 пассаж (min 2,65 – max 21,139 нг/мл) для клеток СМТ/ОС и 1–5 пассаж (min 0,458 – max 19,338 нг/мл); >60 пассаж (min 1,22 – max 65,71 нг/мл) для клеток ЭО соответственно. При этом для культур СМТ/ОС различия были статистически значимы, начиная с 5 пассажа ( $p=0,018246$ ). Содержание TGF- $\beta_1$  статистически значимо было различным в супернатантах культур ЭО после 60 пассажа ( $p=0,007753$ ).

Кроме блокирующего влияния на клетки иммунной системы TGF- $\beta_1$  способен выступать в роли регулятора клеточной адгезии, подвижности, состава экстрацеллюлярного матрикса [631]. Этот фактор регулирует адгезивные свойства опухолевых клеток через уменьшение экспрессии E-кадгерина и увеличение экспрессии интегринов, ассоциированных с инвазией, таких как  $\alpha_3\beta_1$  интегрин [642]. TGF- $\beta_1$  напрямую воздействует на подвижность опухолевых клеток эпителиальной природы, например, при раке молочной железы [643].

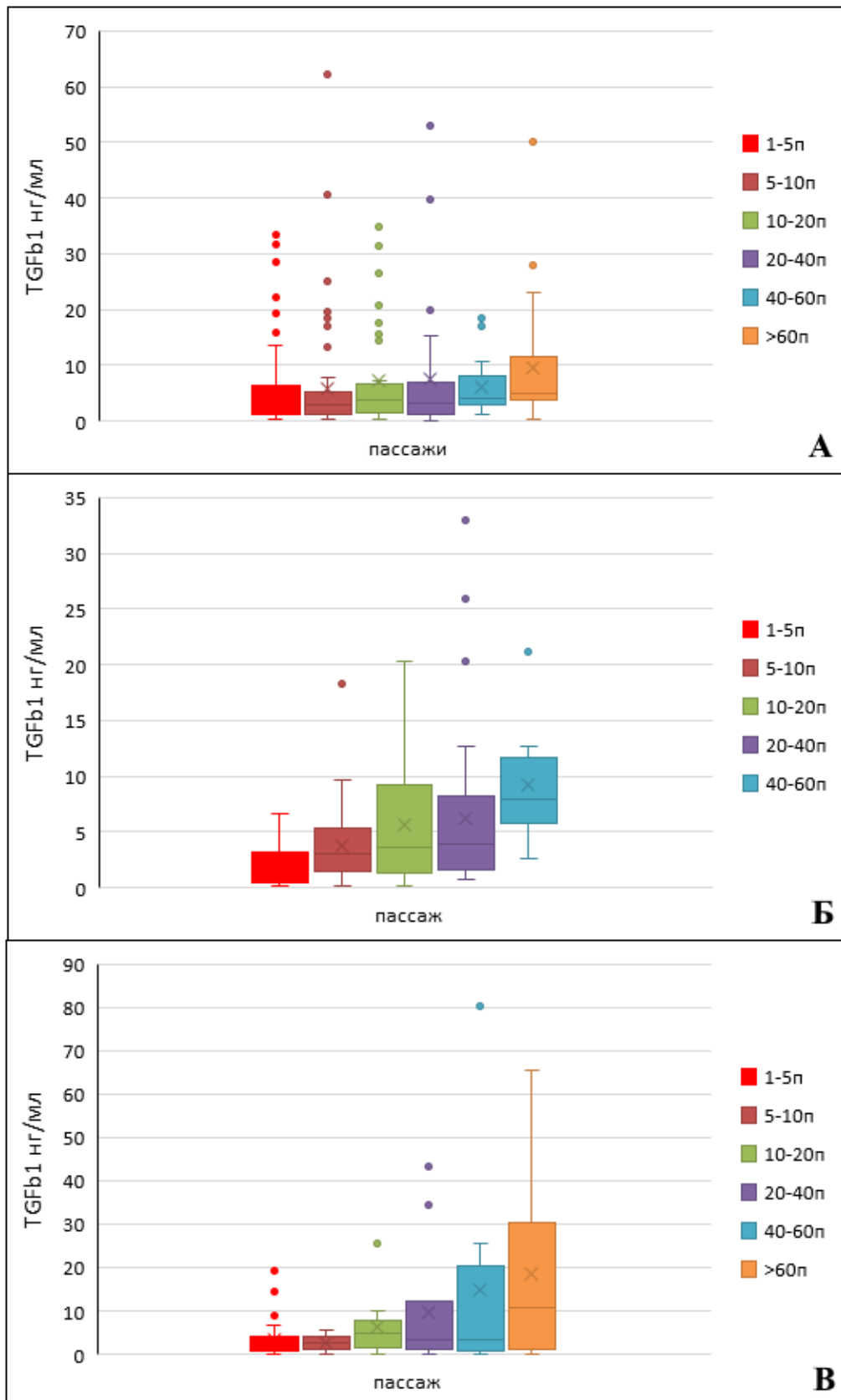


Рисунок 46 – Динамика продукции TGF- $\beta_1$  клетками солидных опухолей в процессе длительного культивирования:

**А** – культуры клеток МК; **Б** – культуры клеток СМТ/ОС;

**В** – культуры клеток опухолей эпителиального происхождения

Таблица 19 – Динамика содержания TGF- $\beta_1$  (нг/мл) в супернатантах культур клеток солидных опухолей в процессе пассирования

Пассаж	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль (25–75%)	W(p)
Культуры МК						
1–5	5,194	2,763	0,282	33,56	1,16–5,89	
5–10	5,715	2,862	0,458	62,15	1,26–5,08	0,361344
10–20	7,132	3,674	0,397	34,83	1,72–6,47	0,123090
20–40	9,26	3,156	0,226	53,116	1,42–8,42	0,161203
40–60	6,111	4,228	1,13	18,492	3,017–7,67	0,274811
>60	9,553	4,865	0,396	50,05	3,83–10,83	0,030214
Культуры СМТ/ОС						
1–5	1,741	0,907	0,207	6,703	0,55–3,07	
5–10	3,751	3,065	0,226	18,345	1,47–5,33	0,018246
10–20	5,678	3,638	0,226	20,32	1,46–8,17	0,001408
20–40	6,247	3,961	0,717	32,91	1,84–7,96	0,000987
40–60	9,175	7,91	2,65	21,139	6,13–10,64	0,00010
Культуры эпителиальных опухолей						
1–5	3,383	2,478	0,458	19,338	1,01–4,00	
5–10	2,95	3,026	0,3	5,68	2,42–4,09	0,304915
10–20	6,845	5,82	0,994	25,43	3,12–7,52	0,008615
20–40	10,315	3,603	0,937	43,41	2,01–12,24	0,055717
40–60	16,611	3,465	0,611	80,49	2,15–18,08	0,083300
>60	21,395	10,888	1,17	65,71	5,8–30,2	0,007753

*Примечание:* \* – сравнение с данными по 1–5 пассажиру, значимость критерия Вилкоксона.

Таким образом, можно предполагать, что повышенный уровень в кровотоке пациентов может способствовать дальнейшей прогрессии опухоли. Изучение механизмов регуляции, опосредованных функционированием TGF- $\beta$ , показало, что TGF- $\beta$  секретируется в виде большого латентного комплекса, внедряется во внеклеточный матрикс или удерживается на поверхности клеток и должен быть активирован перед опосредованием его многочисленных функций [644]. Таким образом, хотя TGF- $\beta$  в избытке присутствует в микроокружении опухоли, его функциональность регулируется локальной активацией, и  $\alpha\beta$ -интегрины являются основными активаторами латентного TGF- $\beta$ .

В то же время TGF- $\beta_1$  является одним из регуляторов процессов пролиферации клеток в организме. Эти функции реализуются через механизмы аутокринной регуляции, которые теряют свое значение при опухолевом росте, так как мутации генов, кодирующих рецепторы TGF- $\beta$  и белки Smad, вызывают понижение уровня их экспрессии или нарушения молекулярной структуры, что, в свою очередь, способствует созданию условий неконтролируемой

пролиферации опухолевых клеток [645]. Ряд исследователей указывают, что на поздних стадиях онкогенеза TGF- $\beta$  функционирует как промотор опухоли, стимулируя опухолевые клетки к эпителиально-мезенхимальному переходу [646].

В наших исследованиях культуры опухолевых клеток на ранних пассажах синтезировали количества TGF- $\beta_1$ , в основном значительно превышающие эти показатели для контрольной культуры фибробластов легкого эмбриона человека, и в процессе длительного культивирования имел место процесс увеличения секреции этого фактора в окружающую среду, что подтверждалось в процессе индивидуального анализа продукции TGF- $\beta_1$  во времени отдельными клеточными линиями (рис. 47). Как правило, длительное пассирование возможно для культур опухолей, которые проявляют *in vivo* биологически агрессивные свойства.

Активная продукция TGF- $\beta_1$  опухолевыми клетками в модельной системе *in vitro* дает основания предполагать, что высокие концентрации этого фактора в плазме крови онкологических больных обусловлено прежде всего секреторной активностью злокачественных новообразований. В настоящее время TGF- $\beta_1$  рассматривается как потенциальная мишень для таргетной терапии [241]. Интересной в этом отношении является разработка противоопухолевой вакцины belagenpneumatusel-L (Lucanix®, NovaRx), состоящей из клеточных линий немелкоклеточного рака легкого, генетически модифицированных для экспрессии антисмысловых олигонуклеотидов и блокирования экспрессии TGF- $\beta$  в злокачественных клетках пациентов [647]. На стадии I/II фазы клинических исследований у 15% больных был достигнут частичный регресс, и у этих пациентов наблюдали увеличенное содержание в крови фактора некроза опухоли, гамма-интерферона и IL-4 и IL-6.

В многоцентровом исследовании III фазы приняло участие 532 пациента с немелкоклеточным раком легкого (стадии IIIA, IIIB и IV), которые получали либо belagenpneumatusel-L, либо плацебо после химиотерапии. Вакцина не продемонстрировала увеличения выживаемости (медиана общей выживаемости 20 мес. – при лечении вакциной и 17 мес. – с плацебо ( $p=0,594$ ) [648]. Этот пример указывает на необходимость комплексного подхода в поиске новых решений в терапии злокачественных новообразований, так как опухолевые клетки способны реализовывать множественные альтернативные пути, способствующие их пролиферации и диссеминации.

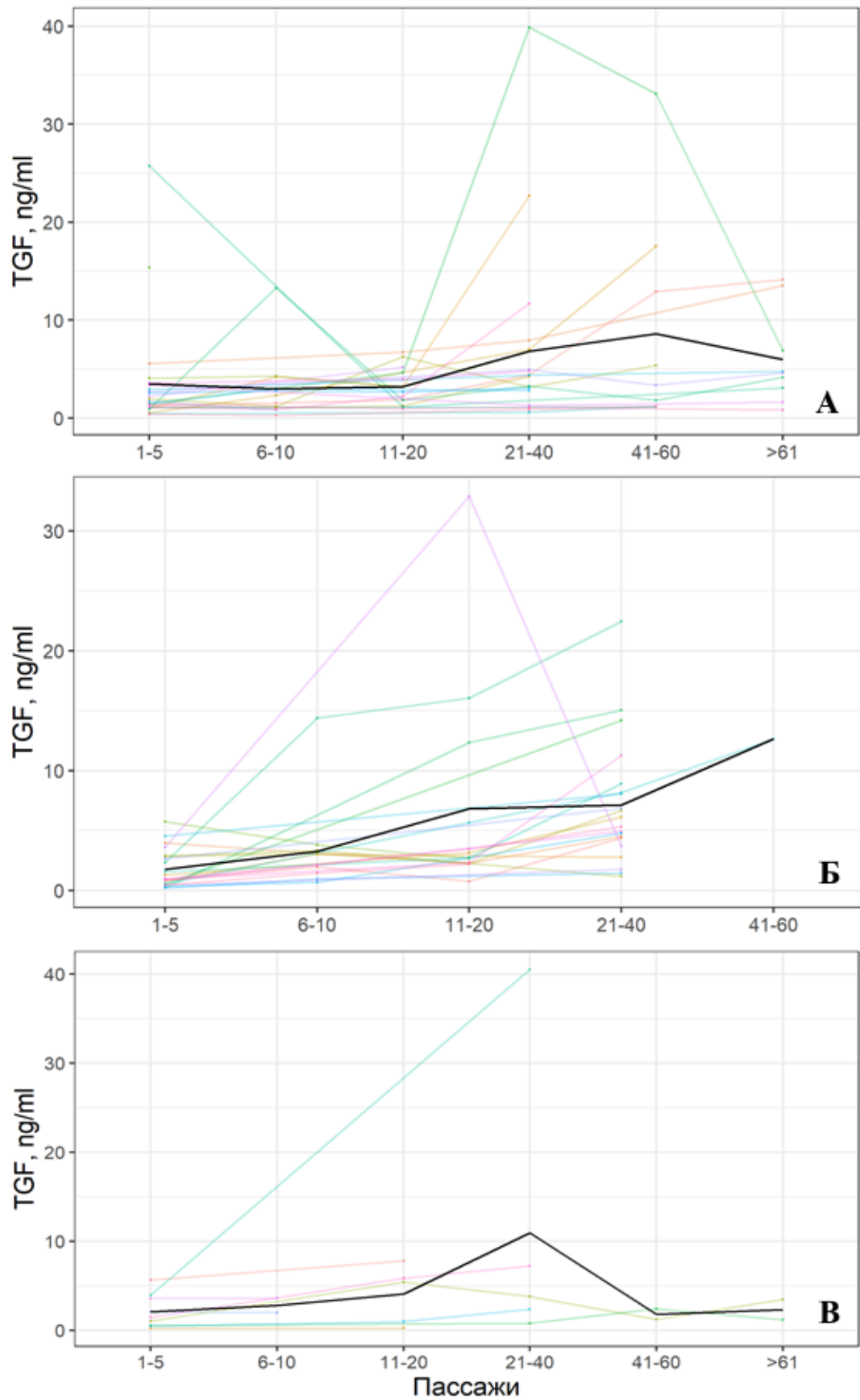


Рисунок 47 – Динамика продукции TGF-β<sub>1</sub> индивидуальными культурами клеток солидных опухолей при непрерывном культивировании (>60 пассаж):  
**А** – клетки МК; **Б** – клетки СМТ/ОС; **В** – клетки опухолей эпителиального происхождения

### 3.3.3. Оценка продукции IL-10 культивируемыми клетками солидных опухолей

Еще один фактор, который могут синтезировать опухолевые клетки, IL-10 оказывает сложное антагонистическое воздействие на рост и развитие опухоли. С одной стороны, на многих экспериментальных системах была продемонстрирована его противоопухолевая активность, с другой – проонкогенное воздействие [261]. Повышенное количество IL-10 в кровотоке больных зарегистрировано при меланоме кожи, раке ободочной кишки, яичников, легкого. Обнаружено, что высокие уровни IL-10 (более 10 пг/мл) в кровотоке коррелируют с плохим прогнозом у больных диссеминированной МК, В-клеточной лимфомой, РМЖ, КРР [261; 262; 649; 650]. Одним из возможных источников системного увеличения содержания IL-10 в крови онкологических больных называют непосредственно сами опухолевые клетки [651]. Однако необходимо учитывать, что клетки миелоидной и лимфоидной дифференцировки секретируют IL-10 в ответ на различные стимулы [249]. Кроме CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>- Т-лимфоцитов и В-клеток, макрофаги, моноциты, ДК, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, естественные клетки-киллеры и клетки-супрессоры миелоидного происхождения способны синтезировать и выделять в микроокружение этот цитокин [652].

Анализ образцов супернатантов культивируемых клеток солидных опухолей на ранних пассажах показал, что все культуры опухолевых клеток различного происхождения продуцировали количество IL-10, статистически значимо превышающие таковое в супернатантах контрольной культуры фибробластов легкого эмбриона человека (табл. 20).

Таблица 20 – Содержание IL-10 (пг/мл) в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей на ранних пассажах (1–5) культивирования

Тип культуры	n	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль 25–75%	U(p)*
Контроли							
DMEM	13	0,0002	0	0	0,0023	0–0	–
DMEM+FCS	13	0,002	0,001	0	0,01	0–0,002	–
FLECH	13	0,014	0,011	0	0,05	0,004–0,015	–
Образцы							
МК	87	6,992	1,753	0	72,089	0,636–6,039	2,6e-06
СМТ/ОС	17	3,723	3,678	0,061	10,075	2,063–4,618	4,1e-06
РП	12	7,322	1,603	0	53,4	0,591–5,768	0,00036
КРР	5	12,96	12,85	2,368	24,61	4,07–20,903	0,00159
РМЖ	8	3,764	3,29	0,409	8,92	1,605–5,47	3,9e-05
РПЖ	7	0,437	0,01	0	1,195	0,01–0,917	0,34001
РЯ	6	14,916	2,015	0,354	83,881	0,977–9,254	0,00019

*Примечание:* DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки; DMEM+FCS – питательной среды с сывороткой; FLECH – супернатанта культуры фибробластов легкого эмбриона человека. \* – статистическая значимость при сравнении с контролем FLECH.

Исключение составили культуры РПЖ, которые экскретировали количество IL-10, сопоставимое с контролем ( $p=0,34001$ ). Различия в продукции IL-10 культурами опухолевых клеток разного гистогенеза были статистически значимыми ( $p=1,9e-14$ ) (рис. 48).

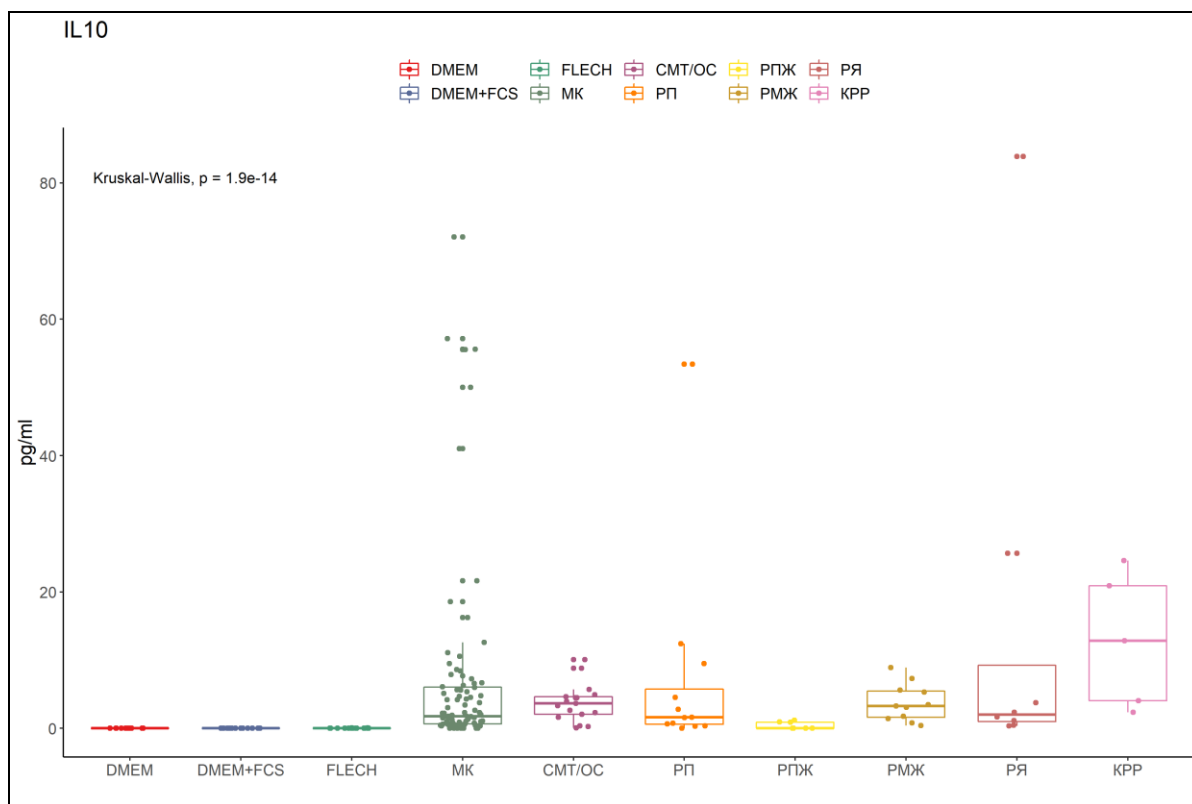


Рисунок 48 – Содержание IL-10 в супернатантах культур клеток солидных опухолей на ранних этапах культивирования:

DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки;

DMEM+FCS – питательной среды с сывороткой;

FLECH – супернатанта фибробластов легкого эмбриона человека.

Различия статистически значимы ( $p=1,9e-14$ )

Наибольшая вариабельность показателей была характерна для культур МК: медиана составила 1,753 пг/мл (min 0 – max 72,089 пг/мл), при этом 8 образцов были негативны по присутствию в супернатантах IL-10. Все культуры CMT/OC продуцировали IL-10, наблюдали отсутствие синтеза IL-10 в 1-й культуре РП и 1-й культуре РПЖ. Из культур клеток опухолей эпителиального происхождения высокими показателями характеризовались клетки KPP: медиана 12,85 пг/мл (min 2,368 – max 24,61 пг/мл) и RY: медиана 2,015 пг/мл (min 0,354 – max 83,881 пг/мл).

Источником циркулирующего IL-10 и локализующегося в микроокружении, могут быть как сами опухолевые клетки, так и клетки иммунной системы, инфильтрирующие опухоль, или их комбинация [653]. Вместе с тем ряд исследователей при сопоставлении продукции IL-10 культивируемыми клетками МК и уровнем этого фактора в периферической крови пациентов

пришли к выводу, что опухолевые клетки не продуцируют IL-10 [654]. В некоторых случаях было показано, что опухолевые клетки теряют способность экспрессировать IL-10 в процессе пассирования *in vitro* [655]. Однако в более позднем исследовании Itakura E. и соавт. (2011) изучали присутствие IL-10 на уровне мРНК в клетках МК и обнаружили, что экспрессия IL-10 присутствовала в опухолевых клетках 33% меланом *in situ*, 81% инвазивной меланомы и 92% метастатических меланом [247].

Lane D. и соавт. (2018) обнаружили, что IL-10, содержащийся в асците при раке яичников, усиливал пролиферацию и миграцию опухолевых клеточных линий ОС CaOV3 и OVCA3, но не влиял на жизнеспособность злокачественных клеток, что дает основания предполагать участие этого цитокина в процессах метастазирования [656]. Большинство исследователей рассматривает в качестве продуцентов IL-10 при КРР клетки иммунной системы, в частности, регуляторные Т-лимфоциты [657], однако наши исследования культивируемых клеток КРР дают возможность предполагать участие опухолевых клеток в регуляции процессов опухолеассоциированного воспаления в кишечнике. В эксперименте и у онкологических больных было показано угнетение экспрессии антигенов МНС I класса на опухолевых клетках в присутствии IL-10 или при трансфекции гена IL-10 [658]. IL-10 способен оказывать прямое влияние на опухолевые клетки, стимулируя их пролиферацию через активацию STAT3, что приводит к усилению экспрессии таких антиапоптотических генов, как BCL-2 или BCL-XL [259]. При использовании перевивной модели мышинной меланомы B16, трансфицированной геном IL-10, было продемонстрировано, что происходит ингибирование функций макрофагов, стимуляция ангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток [258].

Измерение содержания IL-10 в супернатантах опухолевых клеточных линий на разных стадиях культивирования показало, что количество этого цитокина увеличивается в процессе пассирования в культурах МК на 20 пассаже ( $p=0,01264$ ), в культурах СМТ/ОС, начиная с 40 пассажа ( $p=0,0158$ ), в культурах клеток эпителиальных опухолей после 20 пассажа ( $p=0,00016$ ) (табл. 21, рис. 49), то есть длительное культивирование приводит к усилению продукции IL-10 опухолевыми клетками.

Это согласуется с клиническими наблюдениями, в частности, что рост уровня IL-10 в крови больных раком желудка ассоциирован со стадией заболевания [659]. Visconti L. и соавт. (2014) после проведения системного анализа пришли к выводу, что содержание IL-10 может рассматриваться как независимый прогностический фактор неблагоприятного прогноза при онкологических заболеваниях [660]. Интересным фактом является наблюдение Vahl J.M. и соавт. (2017) о том, что в условиях метаболических ограничений, развивающихся во время роста опухоли, на культивируемых клетках аденокарциномы легкого человека было обнаружено



повышенное количество рецепторов к IL-10, в результате чего происходило ингибирование лиганда PDL1 и апоптоза опухолевых клеток [260].

Таблица 21 – Динамика содержания IL-10 (пг/мл) в супернатантах культур клеток солидных опухолей в процессе пассирования

Пассаж	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль (25–75%)	W(p)*
Культуры МК						
1–5	6,991	1,753	0	72,089	0,63–6,03	
5–10	24,966	3,57	0	458,32	1,62–8,59	0,06434
10–20	27,978	4,641	0,02	426,358	1,89–12,04	0,07094
20–40	37,036	5,942	3,45	308,73	4,21–40,38	0,01264
40–60	140,998	25,6	0,192	462,4	5,07–233,64	0,00403
>60	79,384	40,152	0,294	426,2	4,84–114,56	0,00181
Культуры СМТ/ОС						
1–5	3,723	3,678	0,061	10,075	2,06–4,61	
5–10	7,602	4,157	0,298	28,288	2,25–5,70	0,15705
10–20	10,113	6,035	0,409	52,231	2,84–12,68	0,03729
20–40	20,91	4,04	0	140,04	1,97–18,29	0,16051
40–60	21,757	12,865	4,43	56,87	4,85–29,76	0,0158
Культуры эпителиальных опухолей						
1–5	7,359	1,778	0	83,881	0,71–5,47	
5–10	3,882	1,379	0,087	11,076	0,42–7,92	0,14878
10–20	7,954	4,966	0,241	27,147	1,64–11,4	0,38359
20–40	33,691	10,67	2,49	148,35	4,89–43,95	0,00016
40–60	31,052	19,557	0,78	146,4	10,78–27,29	0,002124

*Примечание:* \* – сравнение с данными по 1–5 пассажу, значимость критерия Вилкоксона.

В нашем исследовании индивидуальный анализ секреции IL-10 культивируемыми клетками МК, СМТ/ОС и опухолей эпителиального происхождения позволили выявить отдельные клеточные линии, которые стабильно продуцировали очень большое количество этого цитокина (>200 пг/мл) (рис. 50).

Одна из наиболее значимых функций IL-10 – это блокирующее воздействие на процесс презентации антигенов АПК, такими как ДК и макрофаги [661]. Под влиянием IL-10 подавляется экспрессия молекул HLA II класса, костимулирующих молекул CD80 и CD86. Было показано, что опухолевые клетки в присутствии IL-10 или трансфицированные геном этого цитокина, снижают уровень экспрессии молекул MHC I класса за счет ингибирования перемещения пептидов в эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к накоплению незрелых молекул MHC класса I и низкой степени их выраженности на поверхности клеточной мембраны [654].

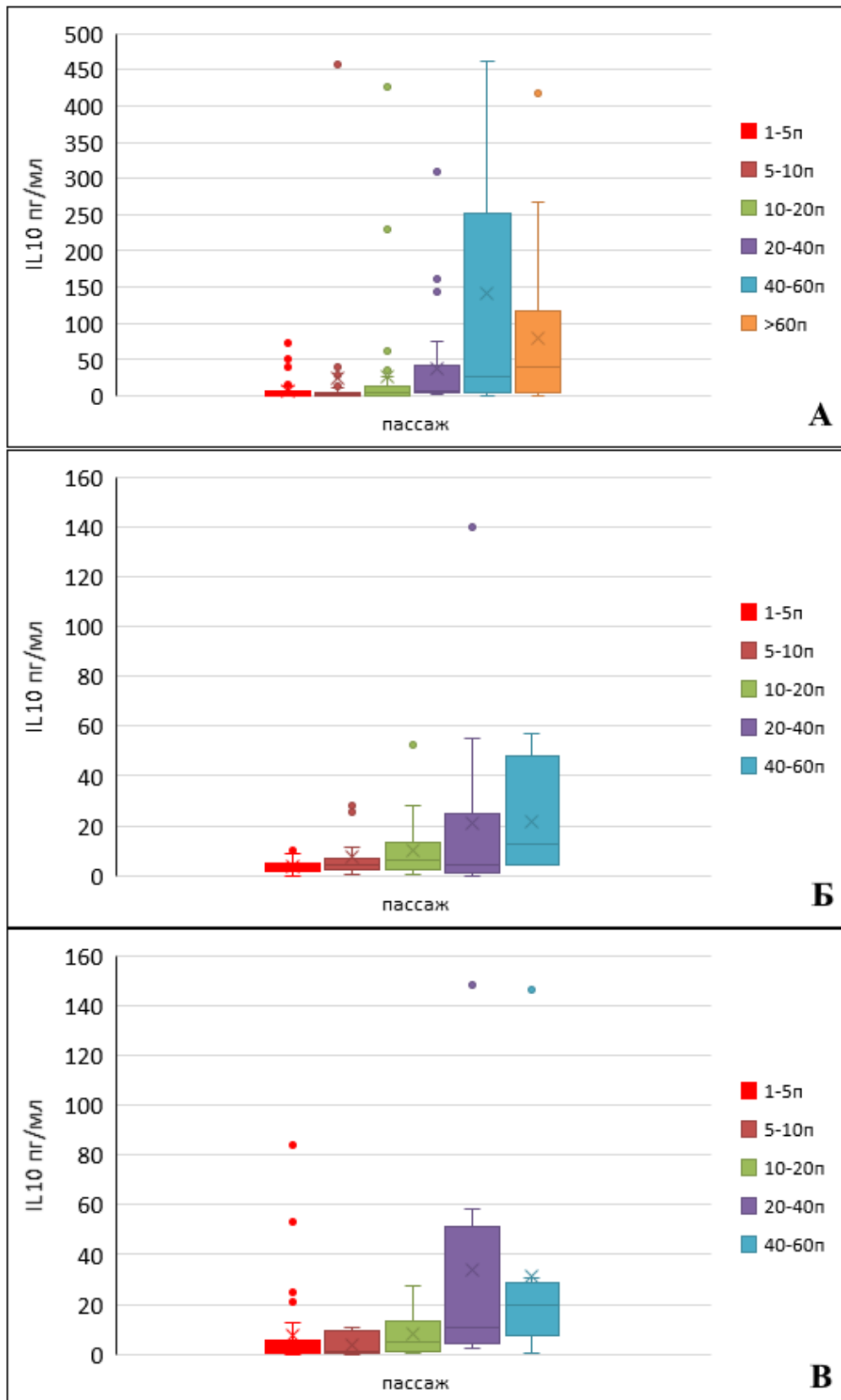


Рисунок 49 – Динамика продукции ИЛ-10 клетками солидных опухолей в процессе длительного культивирования:

А – культуры клеток МК; Б – культуры клеток СМТ/ОС;

В – культуры клеток опухолей эпителиального происхождения

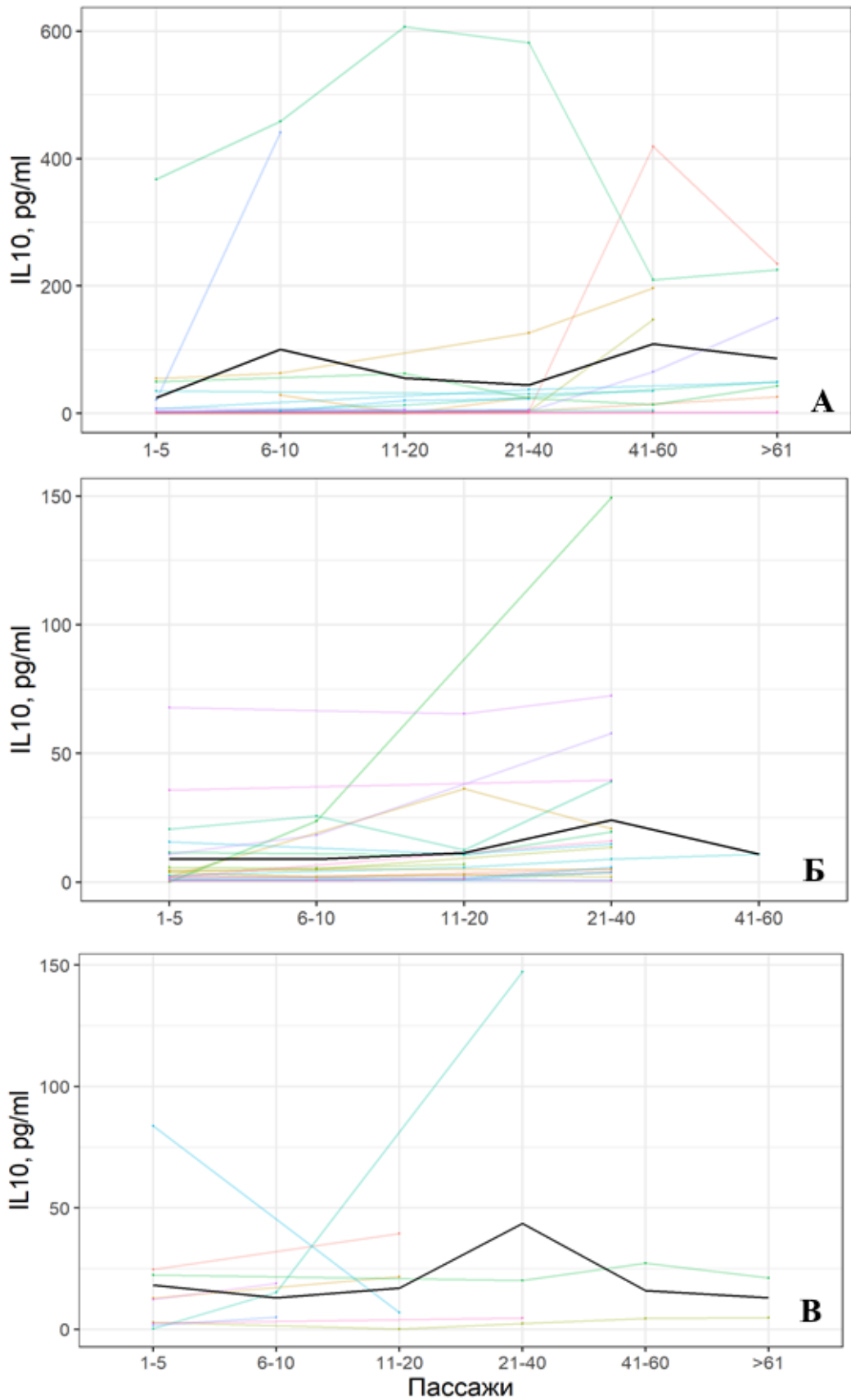


Рисунок 50 – Динамика продукции ИЛ-10 индивидуальными культурами клеток солидных опухолей при непрерывном культивировании (>60 пассажа):  
**А** – клетки МК; **Б** – клетки СМТ/ОС; **В** – клетки опухолей эпителиального происхождения.  
*Черная линия* отображает усредненные значения

Кроме того, IL-10 блокирует моноцит-зависимую Т-клеточную пролиферацию, провоцирует анергию CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и ингибирует экспрессию цитокинов НК-клетками и Т-хелперами I типа (Th1) [249; 662].

Таким образом, под локальным и системным воздействием интерлейкина-10 формируются условия для реализации механизмов «уклонения» опухолевых клеток от контроля со стороны иммунной системы.

### **3.3.4. Оценка продукции клетками солидных опухолей VEGF и других факторов, ассоциированных с ангиогенезом, инвазией, метастазированием и иммуносупрессией**

В настоящее время хорошо известно, что опухолевый ангиогенез имеет определяющее значение в процессах прогрессирования и метастазирования опухоли. Среди множества ангиогенных факторов сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и его рецепторы являются одними из главных индукторов опухолевого ангиогенеза [197; 268], вследствие чего эта система стала мишенью для разработки целого ряда терапевтических агентов, таких как bevacizumab (блокирующие антитела) и ингибиторы рецепторов VEGFR-2: pazopanib, sorafenib и sunitinib [269]. Однако подобная терапия не всегда демонстрирует высокую эффективность, что обусловлено существованием альтернативных механизмов опухолевого ангиогенеза, реализуемых вне этой системы, связанной с активностью VEGF и его рецепторов.

Другими, не менее важными регуляторами процессов пролиферации эндотелиальных клеток и развития капиллярной сети, являются фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), плацентарный фактор роста (PLGF), трансформирующий фактор роста (TGF-β), эндоглин, ангиопоэтин (ANG) -1 и -2, система активации плазминогена uPA/PAI-1, интерлейкин-8 (IL-8) и др. [269; 663–665].

Нами было изучено в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей содержание VEGF, количество которого статистически значимо превышало показатели, обнаруженные в надосадочной жидкости культур фибробластов легкого эмбриона человека (табл. 22). Кроме того, мы наблюдали статистически значимые различия в продукции этого фактора культурами клеток разных опухолей ( $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$ ) (рис. 51).

Наиболее активными продуцентами оказались клетки МК: медиана 3,348 нг/мл, (min 0,012 – max 7,898 нг/мл). Культуры РП и РПЖ продуцировали наименьшее количество VEGF: медиана 1,644 нг/мл (min 0,013 – max 4,526 нг/мл) – для РП и медиана 1,165 нг/мл (min 0,065 – max 3,015 нг/мл) – для РПЖ.

Таблица 22 – Содержание VEGF (нг/мл) в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей на ранних пассажах (1–5) культивирования

Тип культуры	n	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль 25–75%	U(p)*
Контроли							
DMEM	18	0,004	0,004	0,00057	0,010	0,001–0,005	–
DMEM+FCS	18	0,013	0,012	0,009	0,019	0,011–0,014	–
FLECH	18	0,140	0,141	0,116	0,163	0,130–0,146	–
Образцы							
МК	90	3,115	3,348	0,012	7,898	1,644–4,235	1,8e-10
СМТ/ОС	19	3,009	2,427	1,166	7,369	1,673–3,973	1,1e-10
РП	13	1,625	1,644	0,013	4,526	0,243–2,342	0,01079
КРР	5	3,038	2,3053	1,385	6,719	1,892–2,892	5,9e-05
РМЖ	12	3,121	2,971	1,128	5,375	2,316–4,091	2,3e-08
РПЖ	6	1,334	1,165	0,065	3,015	0,551–1,976	0,01480
РЯ	6	2,689	2,754	1,542	3,607	2,505–2,980	1,3e-06

Примечание: DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки; DMEM+FCS – питательной среды с сывороткой; FLECH – супернатанты культуры фибробластов легкого эмбриона человека. \* – статистическая значимость при сравнении с контролем FLECH.

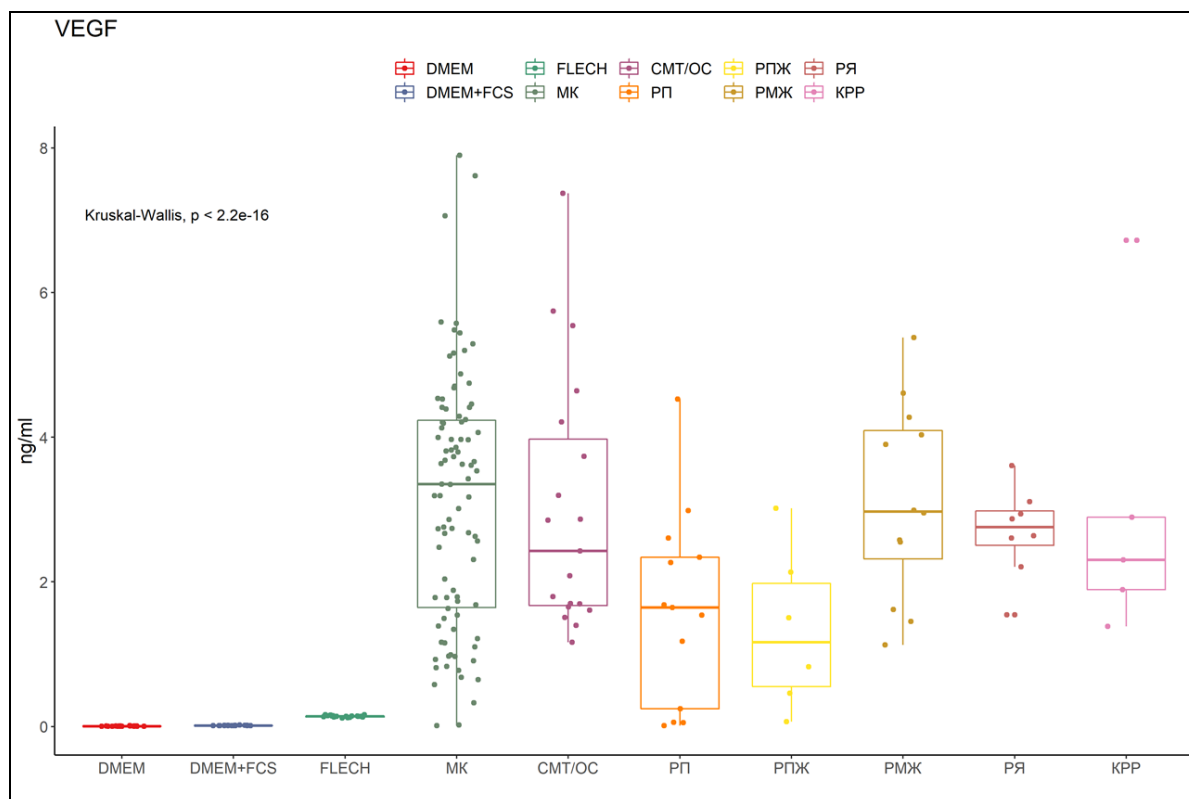


Рисунок 51 – Содержание VEGF в супернатантах культур клеток солидных опухолей на ранних этапах культивирования ( $\leq 5$  пассаж): DMEM – контрольный образец питательной среды без сыворотки; DMEM+FCS – питательной среды с сывороткой; FLECH – супернатанта фибробластов легкого эмбриона человека. Различия статистически значимы ( $p < 2,2e-16$ )

На протяжении всего периода наблюдения на разных пассажах культуры МК и СМТ/ОС продуцировали высокие уровни VEGF, которые не различались статистически значимо между

собой (табл. 23, рис. 52 А, Б). В то же время наблюдение за отдельными культурами опухолевых клеток позволило выявить образцы культивируемых клеток МК и СМТ/ОС, в супернатантах которых содержалось не менее 5–7,5 нг/мл VEGF, и концентрация этого фактора увеличивалась по мере пассирования (рис. 53).

Таблица 23 – Динамика содержания VEGF (нг/мл) в супернатантах культур клеток солидных опухолей в процессе пассирования

Пассаж	Среднее значение	Медиана	min	max	Перцентиль (25–75%)	W(p)*
Культуры МК						
1–5	3,115	3,348	0,012	7,898	1,64–4,23	
5–10	3,313	3,128	0,013	9,486	1,59–4,4	0,30673
10–20	3,421	2,362	0,013	12,567	1,22–3,95	0,28673
20–40	3,659	3,109	0,014	12,389	1,25–3,85	0,18036
40–60	4,397	3,538	0,047	10,892	2,94–5,65	0,07105
>60	3,200	2,457	0,054	13,927	1,24–3,81	0,44551
Культуры СМТ/ОС						
1–5	3,009	2,427	1,166	7,369	1,67–3,97	
5–10	4,215	3,951	0,146	9,486	2,13–6,15	0,07662
10–20	4,494	4,046	0,1	9,884	2,33–7,12	0,06385
20–40	5,027	5,445	0,157	9,936	2,81–6,92	0,05415
40–60	6,23	5,478	0,959	12,305	2,56–9,84	0,12043
Культуры эпителиальных опухолей						
1–5	2,347	2,323	0,012	6,719	1,49–2,98	
5–10	3,993	3,128	2,206	9,738	2,69–4,61	0,01169
10–20	2,994	3,015	0,058	8,124	0,26–3,53	0,99888
20–40	2,29	1,589	0,051	6,719	1,11–2,52	0,99384
40–60	2,867	1,838	1,24	6,548	1,36–3,34	0,99997
>60	5,892	5,39	4,532	8,256	5,17–6,11	0,01334

Примечание: \* – сравнение с данными по 1–5 пассажиру, значимость критерия Вилкоксона.

Культуры клеток опухолей эпителиального происхождения в результате длительного непрерывного культивирования (>60 пассажей) приобретали способность к продукции большого количества VEGF, эти различия были статистически значимы в сравнении с начальным этапом культивирования (1–5 пассаж) ( $p=0,01334$ ) (см. табл. 23, рис. 52 В).

При анализе образцов супернатантов культивируемых *in vitro* клеток солидных опухолей с помощью мультиплексного анализа было обнаружено, что среди исследуемых членов семейства VEGF наибольшей экспрессией характеризовалась изоформа VEGF-A. При этом содержание этих молекул было самым значительным в супернатантах культур клеток РМЖ: медиана 5189 пг/мл (min 2631,0 – max 8008,8 пг/мл), по сравнению с клетками МК: медиана 1666,15 пг/мл (min 122,5 – max 10053,0 пг/мл) и клетками СМТ/ОС: медиана 3901,5 пг/мл (min 1650,3 – max 10063,0 пг/мл), (табл. 24, 25; рис. 54).

VEGF-C преимущественно экспрессировали клетки РП и РМЖ: медиана 1860,0 пг/мл (min 1546,0 – max 2090,0 пг/мл) и медиана 786,4 пг/мл (min 309,0 – max 1546,0 пг/мл) соответственно, по сравнению с клетками МК: медиана 95,75 пг/мл (min 4,0 – max 923,8 пг/мл).

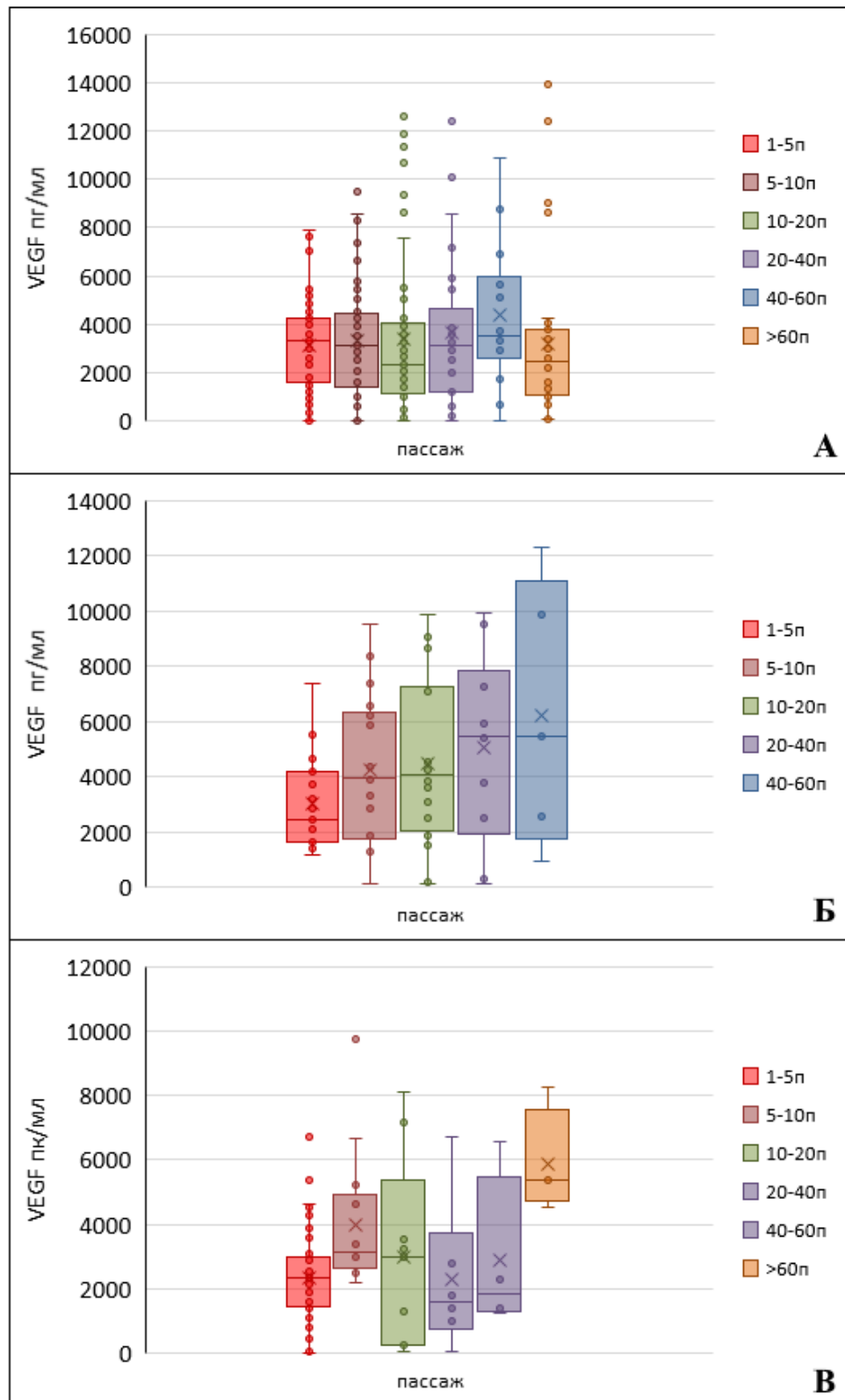


Рисунок 52 – Динамика продукции VEGF клетками солидных опухолей в процессе длительного культивирования: **А** – культуры клеток МК; **Б** – культуры клеток СМТ/ОС; **В** – культуры клеток опухолей эпителиального происхождения

Таблица 24 – Сравнительное содержание факторов ангиогенеза, инвазии, иммуносупрессии в супернатантах клеток МК и СМТ/ОС в процессе субкультивирования

Фактор	Супернатанты клеток МК, пг/мл				Супернатанты клеток СМТ/ОС, пг/мл				U(p)
	Среднее значение		min–max	Перцентиль (25–75%)	Среднее значение	Медиана	min–max	Перцентиль (25–75%)	
ANG-2	2888,74	519,5	30,5–12606,5	123,05–4229,25	446,9	247,0	72,5–1873,5	221,8–373,5	0,27172
VEGF-A*	2769,65	1666,15	122,5–10053	1046,0–4239,58	5153,76	3901,5	1650,3–10063	2867,3–7258,3	0,02287
VEGF-C*	204,92	95,75	4,0–923,8	29,38–260,6	1345,83	793	392,5–2771,5	661,5–2091,8	2,5e-05
VEGF-D*	140,85	109,15	3,0–526,5	41,23–212,55	368,76	360,5	150,8–636,8	304,8–426,3	0,00023
PLGF	1557,15	1071,25	4,5–6821,3	128,85–2172,47	1883,42	776,5	141,0–11318,5	262,5–1050,5	0,92099
uPA*	538,6	48,25	2,0–9433	19,38–179,25	3850,27	882,0	62,0–13793,8	221,3–3946,5	0,00222
PAI-1*	4454,91	4349,05	41,8–9222,3	2512,25–7178,85	7014,45	7336,0	2936,0–9494,0	6622,5–7776,8	0,03962
Endoglin*	61,03	43,9	3,0–245,3	18,18–87,98	154,06	158,0	65,5–290,5	94,8–181,0	0,00065
TGF $\alpha$	736,01	165,9	2,5–2873	81,18–1411,0	231,47	225,0	97,3–417,8	182,0–278,5	0,76594
TGF $\beta$	5398,71	3093	1092,0–19842	1995,63–5986	2678,11	3018,0	799,0–3938	2740,0–3276,0	0,32196
EGF	876,67	171,55	56,0–4799,8	110,37–322,57	326,61	272,0	158,5–604,0	222,0–402,0	0,14224
HB-EGF	418,68	243,9	3,0–1589,8	110,88–641,75	278,75	259,8	138,8–501,5	226,3–319,5	0,98387
IGFPB-1*	259,45	60,5	3,5–4627	33,13–106,85	615,71	239,8	63,3–1984,0	170,5–701,5	0,00023

Примечание: \* – различия между группами статистически значимы (p<0,05).



Таблица 25 – Сравнительное содержание факторов ангиогенеза, инвазии, иммуносупрессии в супернатантах клеток опухолей эпителиального происхождения в процессе субкультивирования

Фактор	Супернатанты клеток РМЖ, пг/мл				Супернатанты клеток РП, пг/мл			
	Среднее значение	Медиана	min–max	Перцентиль (25–75%)	Среднее значение	Медиана	min–max	Перцентиль (25–75%)
ANG-2	266,64	241,80	81,3–622,8	127,5–258,9	533,4	547,7	389,5–613,5	543,8–572,5
VEGF-A*	5364,16	5189	2631,0–8008,8	4895,0–5597,0	3396,7	3560,0	2086,0–3972,0	3496,5–3869,0
VEGF-C*	840,98	786,4	309,0–1546,0	522,5–1041,0	1845,4	1860,0	1546,0–2090,0	1749,0–1982,0
VEGF-D	357,12	402,1	170,5–483,3	289,7–440,0	434,96	357,5	278,5–627,5	348,9–562,4
PLGF	688,02	566,7	112,0–1491,5	286,5–983,4	1129,5	1110,0	982,0–1345,0	991,5–1219,0
uPA*	1301,7	1002,0	73,8–3886,5	256,7–1289,5	23495,6	23682,0	18705,0–27831,0	20467,0–26793,0
PAI-1*	6024,82	5472,0	3543,8–8829,3	4684,0–7595,0	1460,14	1374,5	856,5–1775,5	959,2–1775,5
Endoglin*	133,04	148,5	65,8–208,5	85,7–156,7	248,48	240,8	198,0–290,5	230,8–282,3
TGF $\alpha$ *	274,92	293,5	145,0–332,5	288,0–315,6	850,76	856,5	734,5–945,6	829,6–887,6
TGF $\beta$	3246,2	3173	2584,0–4087,0	2829,0–3558,0	4262	4183	2387,0–6190,0	3988,0–4562,0
EGF*	1497,2	864,5	412,0–4183,3	412,0–4183,3	245,54	260,5	157,2–339,0	157,2–339,0
HB-EGF*	345,4	355,5	300,5–360,5	351,0–359,5	485,9	456,0	385,5–620,0	396,5–571,5
IGFPB-1*	158,0	169,5	66,8–220,0	128,7–205,0	4092,04	4174,3	3372,4–4762,5	3568,5–4582,5

Примечание: \* – различия между группами статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

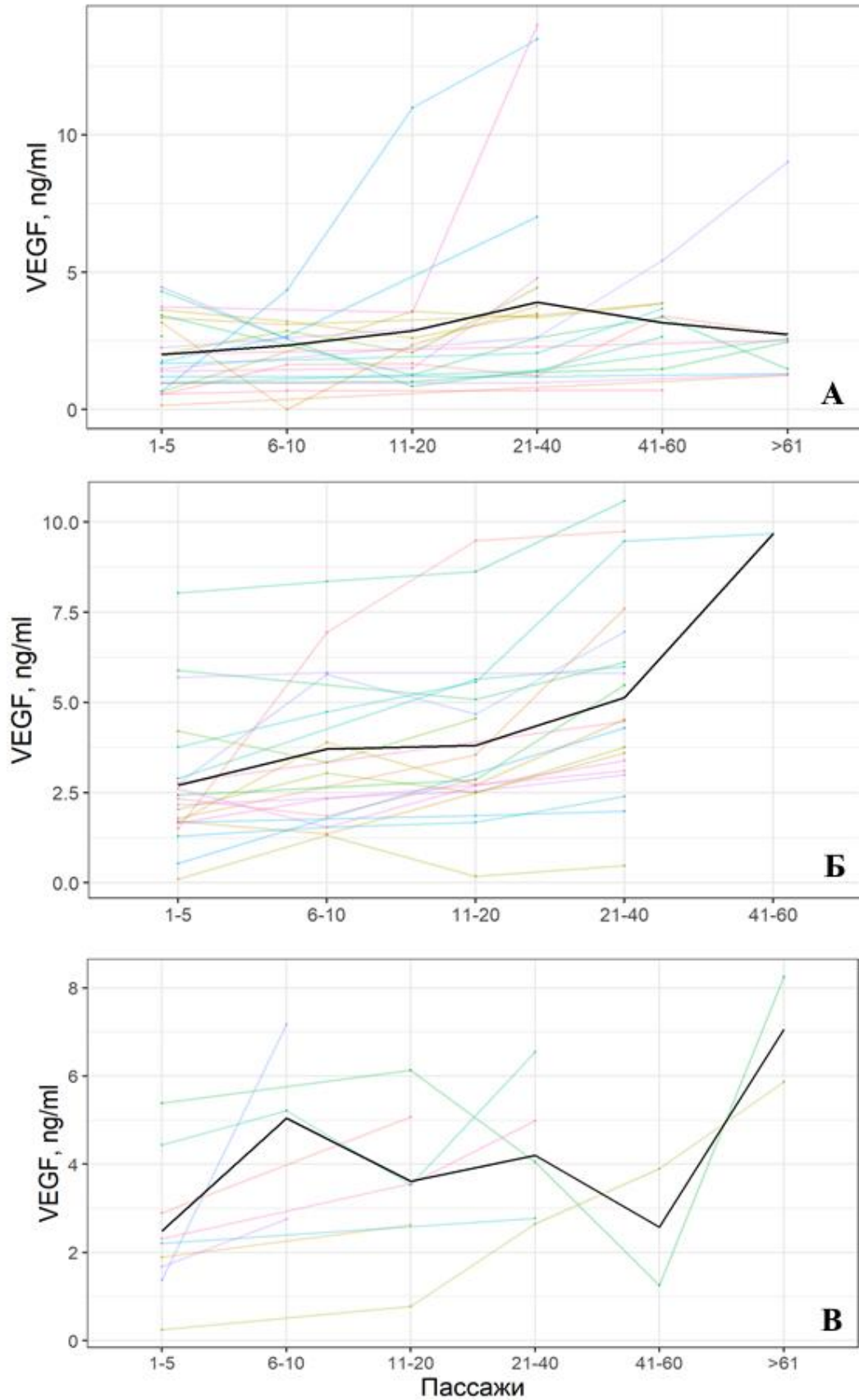


Рисунок 53 – Динамика продукции VEGF индивидуальными культурами клеток солидных опухолей при непрерывном культивировании (>60 пассажей):  
**А** – клетки МК; **Б** – клетки СМТ/ОС; **В** – клетки опухолей эпителиального происхождения.  
 Черная линия отображает усредненные значения

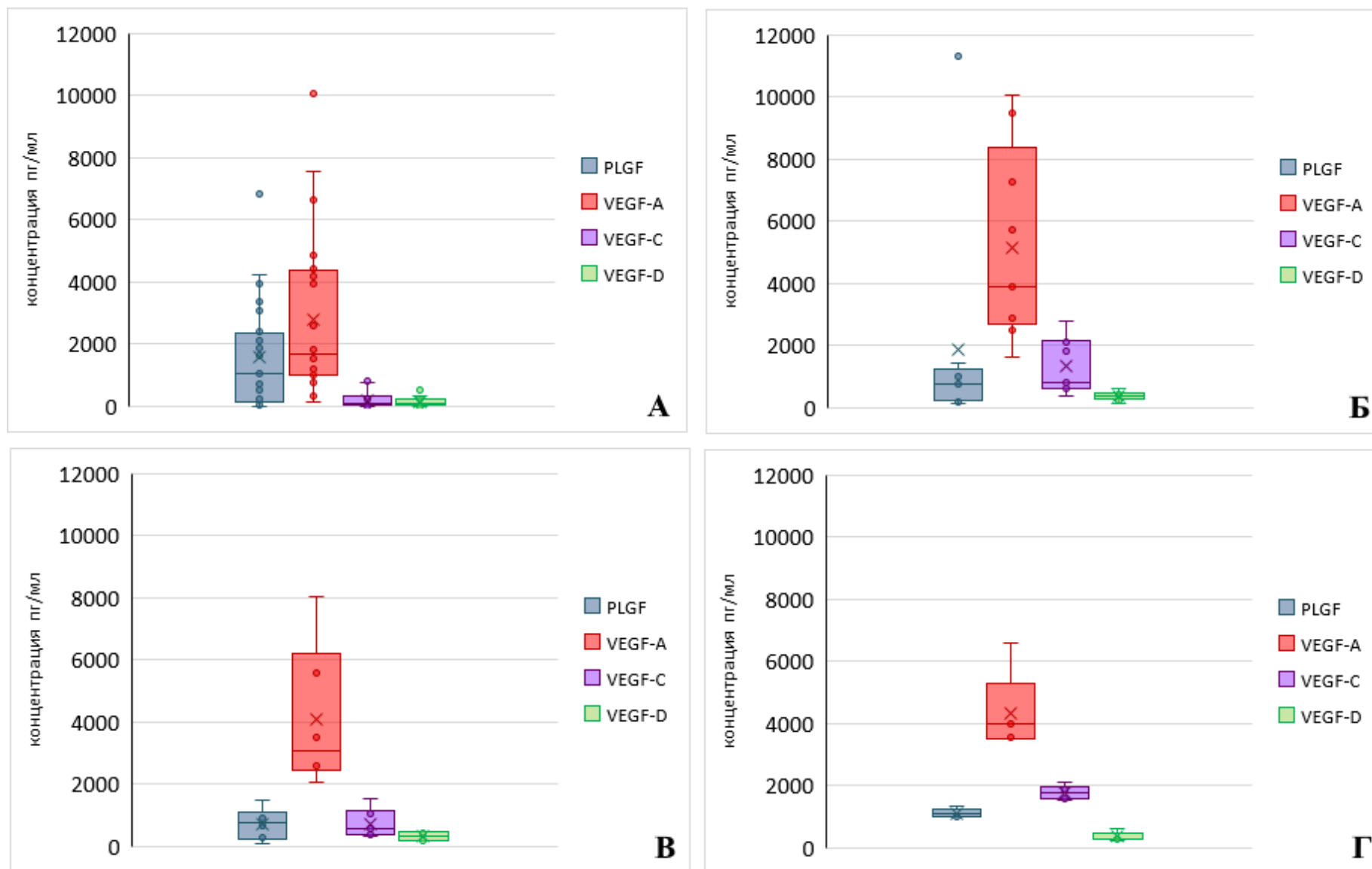


Рисунок 54 – Продукция клеточными линиями солидных опухолей эндотелиального фактора роста (VEGF-A, -C, -D) и плацентарного фактора роста (PLGF): А – культивируемыми клетками МК (n=24); Б – СМТ/ОС (n=9); В – РМЖ (n=5); Г – РП (n=5)

Практически все опухолевые клеточные культуры в незначительном количестве продуцировали VEGF-D (см. табл. 24, 25; рис. 54). Интересно, что в работе по исследованию экспрессии ряда активных молекул клетками РМЖ обнаружили, что опухолевые клеточные линии РМЖ с высоким метастатическим потенциалом обладали сверхэкспрессией VEGF [666]. Было также установлено, что при опухолевом лимфангиогенезе отмечается выбрасывание филоподий эндотелиоцитов лимфатических сосудов в направлении опухолевых клеток, которые продуцируют VEGF-C, и, таким образом, осуществляется миграция эндотелиальных клеток [667]. Необходимо отметить, что VEGF-A, являясь митогеном для эндотелиальных клеток и вызывая усиление проницаемости сосудов, играет роль главного регулятора процессов физиологического и патологического формирования сосудистой сети в самых разнообразных патологических ситуациях, в том числе в процессе диссеминации опухолей [280; 665]. Белки VEGF-C и -D оказывают регуляторное влияние на эндотелиальные клетки лимфатических сосудов через рецептор VEGFR3, также активируя их пролиферацию. Кроме того, установлено, что VEGF и TGF- $\beta$  в совокупности с другими факторами создают иммуносупрессивную «сеть» в микроокружении опухоли и оказывают ингибирующее действие на дифференцировку клеток иммунной системы, привлекаемых в опухоль, в частности, нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток, их созревание и нормальное функционирование [668; 669].

Вместе с тем было показано, что опухолевые клетки способны модифицировать характер роста под влиянием традиционной анти-VEGF-терапии и удовлетворять свои метаболические потребности, находясь в непосредственной близости от существующих уже кровеносных сосудов за счет экспрессии других факторов, поддерживающих ангиогенез [670]. С этой точки зрения интересно заметить, что культивируемые клетки солидных опухолей продуцируют значительные количества PLGF, TGF- $\alpha$  и - $\beta$ , эндоглина (см. табл. 24, 25). PLGF определялся преимущественно в кондиционированных средах культур СМТ/ОС: медиана 776,5 пг/мл (min 141,0 – max 11318,5 пг/мл) и МК: медиана 1071,25 пг/мл (min 4,5 – max 6821,3 пг/мл), в отличие от клеток РМЖ, в супернатантах которых количество PLGF было значительно ниже: медиана 566,7 пг/мл (min 112,0 – max 1491,5 пг/мл). В супернатантах культур РП медиана содержания PLGF составила 1110,0 пг/мл (min 982,0 – max 1345 пг/мл).

Первые данные об экспрессии этого фактора в опухолевых клетках были получены Takahashi M. и соавт. (1994), которые изучали гиперваскуляризацию карциномы почки [671]. С тех пор накапливаются данные о возможности использования PLGF как прогностического маркера динамики опухолевого процесса [672]. По сравнению с VEGF, роль PLGF, который принадлежит к этому же семейству ангиогенных факторов, в образовании новых сосудов менее понятна. Есть данные об участии его в процессах метастазирования и васкуляризации рака легкого [673]. Обнаружено, что в ряде опухолей, таких как рак почки, легкого, толстой кишки,

PMЖ, PLGF синтезируется не только злокачественными клетками, но также и клетками эндотелия гладкой мускулатуры, перицитами, фибробластами стромы опухоли, опухолеассоциированными лимфоцитами и макрофагами [296]. PLGF вызывает различные биологические эффекты, затрагивая широкий диапазон различных типов клеток. PLGF способен вызывать рост и созревание сосудов путем непосредственного воздействия на жизнеспособность, рост, миграцию эндотелиоцитов, пролиферацию фибробластов и гладкомышечных клеток; также способен привлекать и активировать макрофаги, ингибировать дифференцировку ДК [296]. PLGF, синтезируемый опухолевыми клетками, рекрутирует Flt1-позитивные гематопозитические предшественники и макрофаги в локусах роста опухоли и таким образом обеспечивает неоваскуляризацию и лимфангиогенез [667].

Опухолеассоциированные макрофаги, активированные PLGF, секретируют провоспалительные цитокины, такие как TNF- $\alpha$  и IL-6, а также ангиогенные факторы, подобные VEGF, усиливая воспаление и ангиогенез, необходимый для прогрессии опухоли [674; 675]. Кроме того, злокачественные клетки реализуют механизм действия PLGF, когда блокируется путь воздействия на ангиогенез через VEGF в процессе антиангиогенной терапии, активируя пролиферацию эндотелия, перицитов и гладкомышечных клеток сосудистой стенки [676]. Обнаружено, что PLGF играет непосредственную роль в процессах регуляции подвижности и инвазивности опухолевых клеток [197].

Последнее время внимание исследователей привлекла роль эндоглина, являющегося частью протеинового комплекса рецептора трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ , который экспрессируется активно пролиферирующими эндотелиальными клетками, и также может рассматриваться как маркер опухолевой васкуляризации [302; 677]. Мы обнаружили продукцию эндоглина всеми исследуемыми клетками опухолей – МК: медиана 43,9 пг/мл (min 3,0 – max 245,3 пг/мл); СМТ/ОС: медиана 158,0 пг/мл (min 65,5 – max 290,5 пг/мл); РМЖ: медиана 148,0 пг/мл (min 65,8 – max 208,5 пг/мл); РП: медиана 240,0 пг/мл (min 198,0 – max 290,5 пг/мл). При этом наблюдали статистически значимые различия между культурами МК и СМТ/ОС, РМЖ и РП (см. табл. 24, 25). Превышение нормального уровня экспрессии данного белка ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, касающимся развития более 10 типов солидных опухолей [302]. Эндоглин обнаруживается в эндотелиальных клетках сосудов опухоли, в строме и на самих опухолевых клетках, что показано для различных видов сарком, карцином и метастатической меланомы [611; 678]. Было также установлено в процессе исследования клеток метастатического РМЖ, что экспрессия эндоглина высокой степени изменяет морфологию поверхности опухолевых клеток через формирование псевдоподия-подобных структур, замеченных у малигнизированных клеток с высоким метастатическим потенциалом [679], усиливает протеазную активность, направленную против компонентов

экстрацеллюлярного матрикса, хемотаксис, способность клеток к миграции, уменьшает активность протеазных ингибиторов [680], то есть, по мнению некоторых исследователей, экспрессия эндоглина ассоциирована с агрессивным опухолевым фенотипом [678]. Было показано, что постоянный высокий уровень эндоглина приводит к дестабилизации кровеносных сосудов, способствующей интравазации опухолевых клеток [677].

Наряду с PLGF и семейством TGF- $\beta$ , ангиопоэтины ANG-1 и -2 принимают участие в регуляции созревания сосудов и формировании сосудистой сети [681]. Ряд генетических и биохимических исследований указывают на антагонистическую роль ANG-2 по отношению к системе ANG-1/TIE2, где ANG-2, связываясь с тирозинкиназным рецептором TIE2, специфичным для эндотелиоцитов, препятствует его контакту с ANG-1 и, таким образом, регулирует реакции эндотелиальных клеток на экзогенные цитокины [682]. Известно, что в опухолях ANG-2 способствует формированию новых сосудов, но молекулярные механизмы вовлечения этого фактора не совсем понятны в настоящее время. Сверхэкспрессия ANG-2 может иметь проопухолевый и противоопухолевый эффект. В экспериментах с линиями клеток назофарингеальной карциномы, которые экспрессировали разное количество ANG-2 и VEGF, удалось показать зависимость влияния ANG-2 на рост опухолевых клеток от присутствия VEGF [683].

В нашем исследовании культуры опухолевых клеток экскретировали сопоставимое количество ANG-2: содержание в кондиционированных средах клеток МК колебалось от 30,5 до 12606,5; СМТ/ОС – от 72,5 до 1873,5; РМЖ – от 81,3 до 622,8; РП – от 389,5 до 613,5 пг/мл (см. табл. 24, 25). Мы также обнаружили отрицательную корреляцию между продукцией VEGF-A и ANG-2 ( $\rho=-0,319$ ), при этом двухсторонняя корреляция была значима на уровне 0,05 ( $p=0,025$ ) (рис. 55 А), что представляет интерес в свете вышеописанных научных данных. Исследования ANG с помощью экспериментальных моделей опухолей человека, привитых мышам, таких как рак толстой кишки Colo205 и плоскоклеточная карцинома кожи A431, показали, что применение антител, блокирующих ANG-2, приводит к регрессу опухолей путем индукции апоптоза эндотелиальных клеток в опухолевой ткани, и в то же время сверхэкспрессия этой молекулы вызывает угнетение продукции VEGF, элиминацию перицитов в опухолевой ткани, блокаду пролиферации эндотелиальных клеток и в конечном итоге деградацию сосудистой сети опухоли и уменьшение опухолевой массы, то есть ANG и VEGF находятся в сложном антагонистическом взаимодействии [684].

Одним из важных моментов инвазии и метастазирования опухолей является процесс протеолитической деградации экстрацеллюлярного матрикса, осуществляемой в результате каскада реакций с участием множества ферментов, в том числе с участием системы активации плазминогена. Эта система состоит из собственно сериновой протеазы урокиназного активатора

плазминогена uPA, его рецептора uPAR и двух ингибиторов сериновой протеазы PAI-1 и PAI-2. Уже показано, что эта система функционирует универсально для большинства типов опухолей и вовлечена в процессы туморогенеза, клеточной адгезии, пролиферации, миграции и ангиогенеза [685].

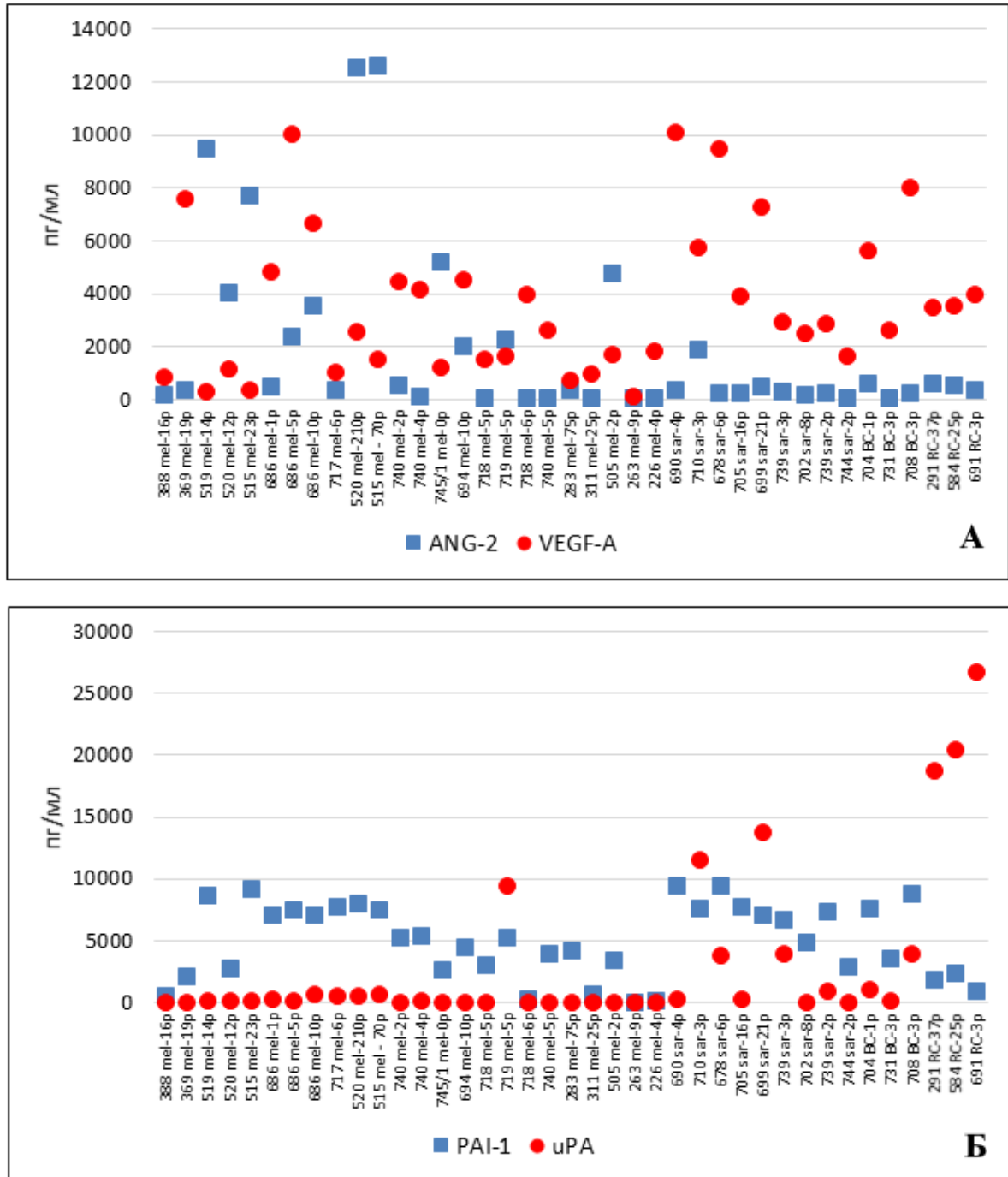


Рисунок 55 – Характер продукции в культурах клеток солидных опухолей:  
 А – ангиопоэтина-2 (ANG-2) и сосудистого эндотелиального фактора роста А (VEGF-A);  
 Б – урокиназного активатора плазминогена (uPA) и его ингибитора PAI-1.

*По оси ординат* – концентрация фактора;  
*по оси абсцисс* – наименование клеточной культуры и номер пассажа

В нашем исследовании мы обнаружили, что uPA и PAI-1 экспрессировались всеми типами культивируемых опухолевых клеток, но в клетках МК эта экспрессия была выражена менее значимо, чем в клетках СМТ/ОС (см. табл. 24, 25). Наибольшее количество uPA продуцировали клетки РП: медиана 23682,0 пг/мл (min 18705,0 – max 27831,0 пг/мл), максимальное количество этого фактора для клеток СМТ/ОС составило 13793,8 пг/мл, для клеток РМЖ – 3886,5 пг/мл. Культивируемые клетки солидных опухолей демонстрировали большую вариабельность в продукции PAI-1 (клетки МК экспрессировали от 41,8 до 9222,3 пг/мл; СМТ/ОС – от 2936,0 до 9494,0 пг/мл; РМЖ – от 3543,8 до 8829,3 пг/мл).

Для продукции uPA и PAI-1 была характерна обратная корреляция слабой силы (рис. 55 Б) ( $\rho = -0,275$ ,  $p = 0,049$ ). Интересно, что в ряде исследований было обнаружено, что не только опухолевые клетки способны продуцировать компоненты системы активации плазминогена, например, в случае колоректального рака продуцентами uPA являлись клетки стромы опухоли (фибробластоподобные клетки и эндотелиоциты), а в самих малигнизированных клетках экспрессия не была выявлена [686; 687]. Подобный феномен был обнаружен также для РМЖ, рака простаты, плоскоклеточного рака кожи, и повышенный уровень uPA, секретируемый фибробластами и опухолеассоциированными макрофагами, обнаруживаемый в кровотоке пациентов, был ассоциирован с плохим прогнозом [283]. В исследовании Märkl В. И соавт. (2017) была выявлена прогностическая роль PAI-1 и связь с наличием отдаленных метастазов при колоректальном раке [688]. Получены данные об участии системы активации плазминогена в направленной миграции в опухоль и поляризации макрофагов [689]. Имеются данные о прогностической роли экспрессии системы PAI-1/uPA при опухолях молочной железы: увеличение количества uPA и/или PAI-1 в тканях опухоли больных раком молочной железы коррелирует с характером течения заболевания и риском развития рецидива [690].

Таким образом, опухолевая инвазия – это результат сложного взаимодействия между опухолевыми и стромальными клетками с участием системы активации плазминогена. Основная роль uPA – катализировать превращение неактивного плазминогена в активный плазмин, который способен промотировать процессинг многих белков экстрацеллюлярного матрикса, активировать предшественники некоторых матриксных металлопротеаз, высвободить и активировать такие специфические факторы, как FGF и TGF- $\beta$ , которые способны усиливать опухолевую прогрессию путем реализации различных механизмов воздействия на опухолевые клетки [681].

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) принадлежит к семейству рецепторных тирозинкиназ ErbB и выполняет важные функции в физиологии эпителиальных клеток [691]. Мутации EGFR и/или его сверхэкспрессия наблюдается при различных злокачественных



новообразованиях человека, вносят вклад в их агрессивный фенотип, в плохой прогноз и являются мишенью для множества методов лечения опухолей, применяемых в настоящее время в клинической практике [692; 693].

Сверхэкспрессия или сверхактивация EGFR может быть результатом мутаций, блокирующих рецептор в состоянии непрерывной передачи сигналов, или аномально высоких уровней лигандов EGFR, высвобождаемых из опухолевых или неопухолевых клеток микроокружения опухоли [694].

Эти лиганды включают эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF- $\alpha$ ), гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), бетацеллулин, амфирегулин и эпирегулин [695]. Взаимодействие EGFR с его лигандами приводит к гомодимеризации или гетеродимеризации рецептора с другим членом семейства ErbB. Димеризация вызывает аутофосфорилирование EGFR по специфическим остаткам тирозина в его внутриклеточном домене, запуская сигнальные пути, которые часто сверхактивны в злокачественных клетках во время прогрессирования опухоли [696].

Мы изучили содержание EGF, EGFRs и HB-EGF в супернатантах культивируемых клеток солидных опухолей и обнаружили, что продукция EGF присуща всем типам изучаемых малигнизированных клеток, при этом клетки МК и СМТ/ОС секретируют сопоставимое количество этого фактора: от 56 до 4799,8 пг/мл и от 158,5 до 604,0 пг/мл соответственно (см. табл. 24; рис. 56). В то же время культуры МК и СМТ/ОС статистически значимо различались по продукции растворимой формы EGFRs, клетки сарком характеризовались более выраженной экспрессией и секрецией рецепторов EGF: медиана 123,0 пг/мл (min 0 – max 959,88 пг/мл) и медиана 258,54 пг/мл (min 16,3 – max 1681,76 пг/мл) соответственно ( $p=0,015$ ) (табл. 26, рис. 57).

Среди клеток ЭО культуры РМЖ характеризовались более выраженной продукцией EGF: медиана 864,5 пг/мл (min 412,0 – max 4183,3 пг/мл), по сравнению с клетками РП: медиана 260,5 пг/мл (min 157,2 – max 339,0 пг/мл) ( $p=0,005$ ), но продукция EGFRs клетками эпителиальных опухолей была сопоставима ( $p=0,501$ ) (см. табл. 25; табл. 27). Использование в работе Fisher S.A. и соавт. (2018) трехмерных клеточных моделей РМЖ позволило установить, что высокие концентрации EGF воздействуют различно на клеточные линии РМЖ, характеризующиеся разной плотностью рецепторов EGFR, и влияют на их инвазивные свойства [697]. Учитывая полученные нами высокие показатели содержания EGF с супернатантах культур РМЖ, можно предполагать реализацию аутокринного пути регуляции этого сигнального пути, обнаружение умеренного количества растворимой формы EGFRs позволяет предполагать активацию метастатических свойств опухолевых клеток.

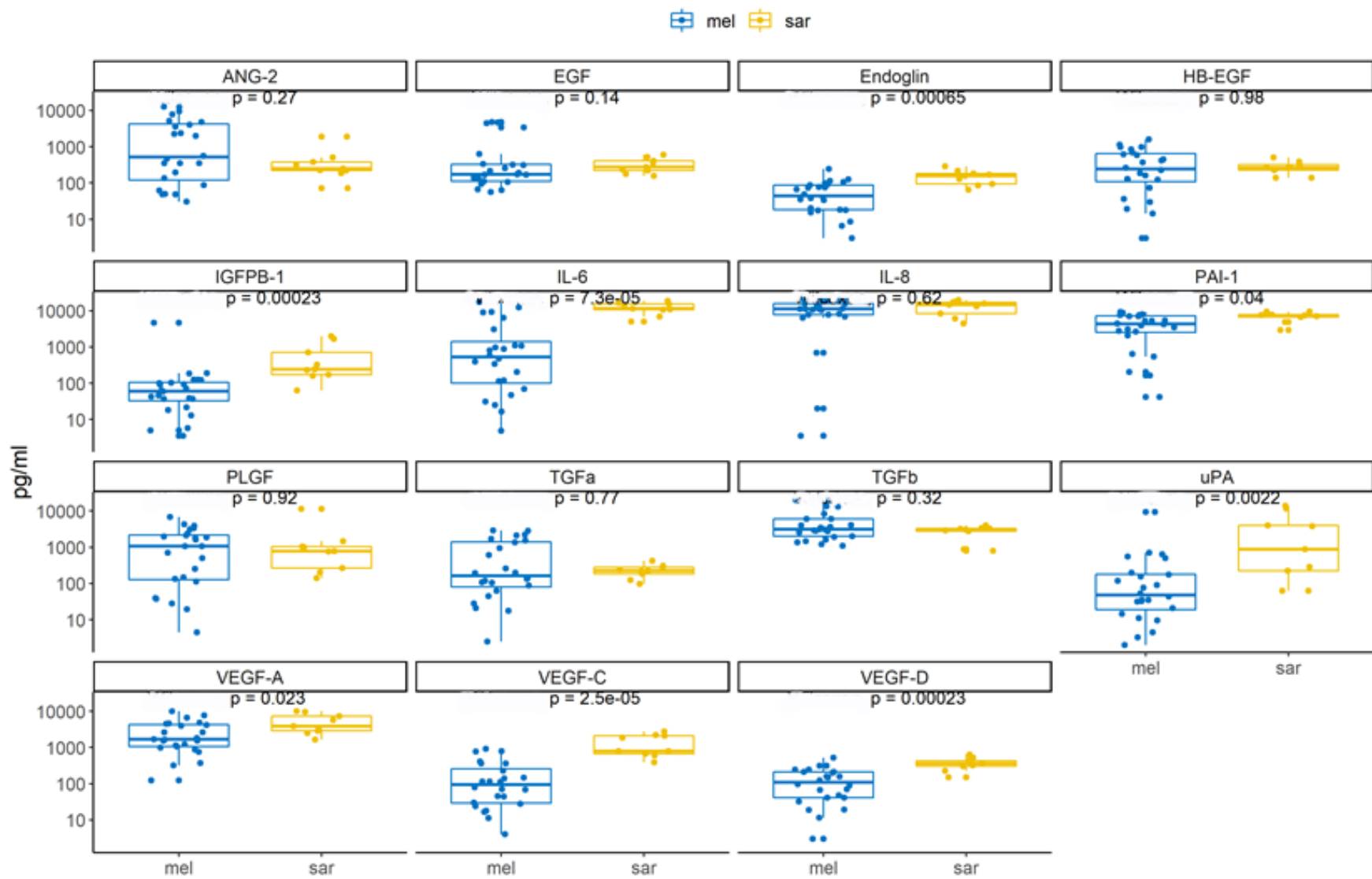


Рисунок 56 – Сравнительный анализ содержания факторов, ассоциированных с процессами инвазии, ангиогенеза, иммуносупрессии в супернатантах культур клеток МК и СМТ/ОС

Таблица 26 – Сравнительное содержание факторов адгезии, инвазии, иммуносупрессии в супернатантах клеток МК и СМТ/ОС в процессе субкультивирования

Фактор	Супернатанты клеток МК, пг/мл				Супернатанты клеток СМТ/ОС, пг/мл				U(p)
	Среднее значение	Медиана	min–max	Перцентиль (25–75%)	Среднее значение	Медиана	min–max	Перцентиль (25–75%)	
FGF	157,69	47,41	0–3228,91	36,21–84,52	89,34	81,48	0–213,72	50,38–120,77	0,117
Follistatin	5049,36	1751,57	45,88–36385,29	482,13–3875,3	19173,4	2391,05	0–123709,87	430,13–26135,45	0,246
HGF*	624,26	80,98	0–4761,32	34,92–967,04	2633,07	565,38	12,0–10741,33	74,89–5027,59	0,039
Leptin	289,35	55	0–5014,25	31,25–140,95	455,58	228,77	5,75–2380,29	47,4–599,59	0,096
Osteopontin*	130194,3	13257,26	67,56–3257400	1860,3–17283,5	1512,08	361,82	18,93–17179,0	122,31–1059,13	1,2e-05
PECAM-1	98,91	38,6	0–746,53	0–127,3	249,65	88,36	0–1278,16	38,6–479,74	0,103
Prolactin	64,04	19,41	0–466,08	0–58,9	146,2	16,66	0–827,62	5,24–260,71	0,573
SCF	23,35	18,64	0,24–83,86	13,85–28,3	28,39	27,26	0–100,09	6,65–41,17	0,732
sEGFR*	220,13	123,42	0–959,88	64,05–234,3	453,11	258,54	16,3–1681,76	150,92–653,84	0,015
sVEGFR-1	1432,68	171,56	0–15901,13	26,4–653,4	271,36	140	0–1668,23	9,08–352,25	0,413
sVEGFR-2	106,19	43,55	0–766,53	21,97–106,01	147,09	51,83	2,31–775,34	13,99–267,03	0,894

Примечание: \* – различия между группами статистически значимы (p<0,05).

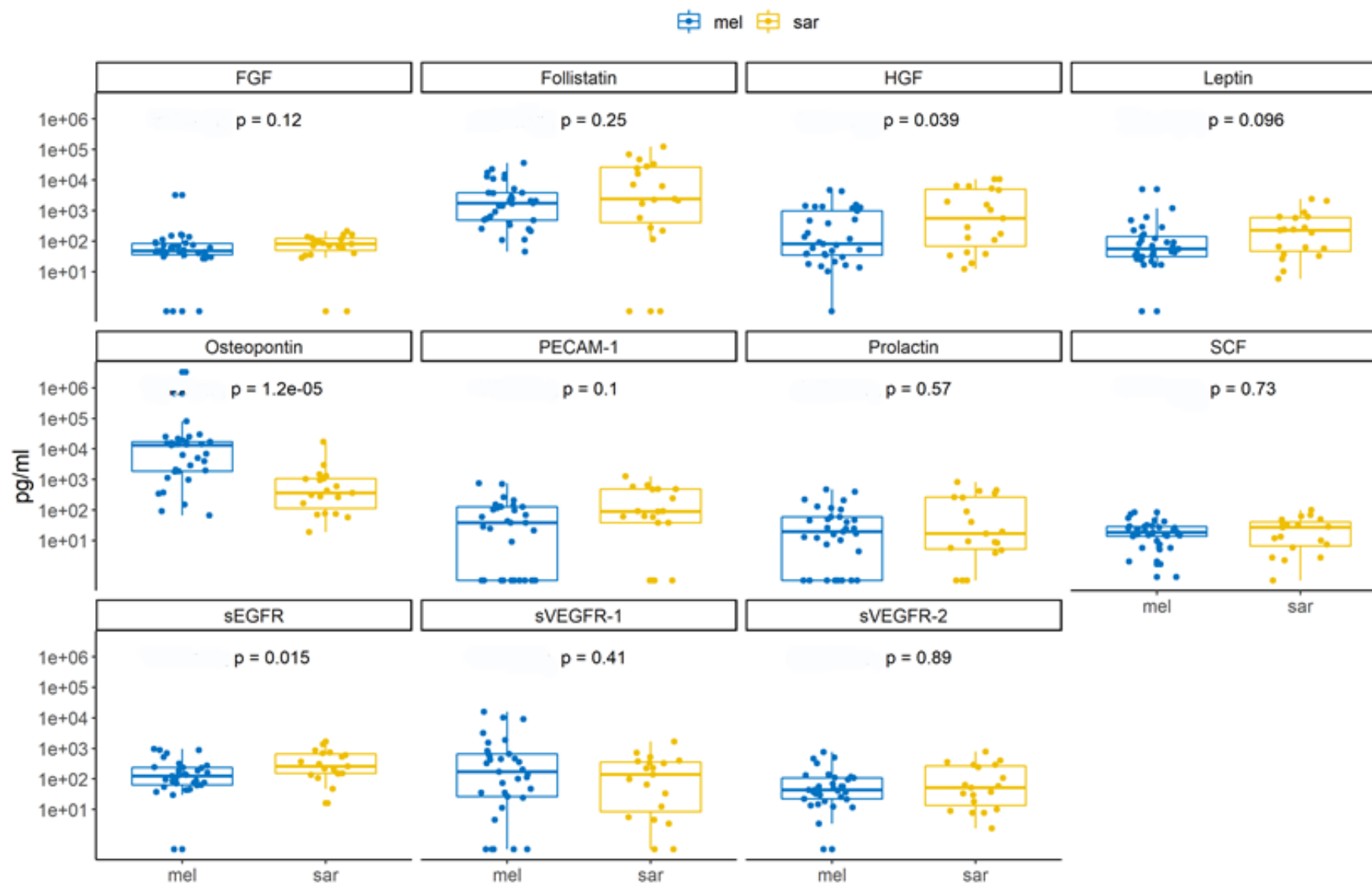


Рисунок 57 – Сравнительный анализ содержания факторов, ассоциированных с процессами адгезии, иммуносупрессии, факторов роста и растворимых форм их рецепторов в супернатантах культур клеток МК и СМТ/ОС

Таблица 27 – Сравнительное содержание факторов адгезии, инвазии, иммуносупрессии в супернатантах клеток опухолей эпителиального происхождения в процессе субкультивирования

Фактор	Супернатанты клеток РМЖ, пг/мл			Супернатанты клеток РП, пг/мл			Супернатанты клеток РЯ, пг/мл		
	Медиана/ Среднее значение	min–max	Персен- тиль (25–75%)	Медиана/ Среднее значение	min–max	Персен- тиль (25–75%)	Медиана/ Среднее значение	min–max	Персен- тиль (25–75%)
FGF	59,3/56,9	21,6–86,0	49,65– 82,51	174,2/74,1	60,4–566,2	66,35– 103,89	137,3/155,4	82,3–174,4	82,25– 155,36
Follistatin*	82,9/61,3	24,2– 158,0	250,99– 1385,65	688,4/355,0	157,6– 1547,4	30,38– 140,48	1016,4/920,2	270,7– 1858,3	270,71– 1858,3
HGF*	47,1/48,3	36,4– 601,4	91,19– 600,05	412,8/349,2	14,9–1219,2	38,44–50,79	682,8/872,8	130,2– 1045,5	130,17– 1045,5
Leptin	63,5/59,9	50,6–86,7	38,2– 743,26	483,8/397,6	33,0–1531,9	52,25– 68,05	42,33/38,20	38,2–50,59	38,2– 50,59
Osteopontin*	94954,7/ 17590,0	6311,5– 414066,0	298,54– 15293	5049,7/758,2	207,8– 17084,9	16902,0– 19904,0	790,0/502,8	152,5– 1714,7	152,55– 1714,7
PECAM-1	38,5/24,9	0–119,76	0–96,41	108,9/109,5	58,71– 159,09	88,36– 128,57	103,5/114,6	75,97– 119,76	75,97– 119,76
Prolactin*	19,76/3,8	0–68,11	0–48,79	55,43/53,38	29,49–82,85	31,33–80,08	84,39/82,85	61,66– 108,66	61,66– 108,66
SCF	52,92/53,86	3,65– 163,63	11,49– 64,7	38,71/23,07	12,92– 107,83	17,9–31,83	29,23/19,83	10,37–57,5	10,37– 57,5
sEGFR	235,3/169,33	64,05– 600,7	64,05– 393,75	446,0/287,3	113,2– 1302,1	136,12– 91,41	310,14/296,9	257,9–375,6	257,94– 375,57
sVEGFR-1	172,6/144,9	0–597,72	13,67– 189,83	39,09/35,85	5,64–75,02	21,79–57,15	44,93/38,21	0–96,58	0–96,58
sVEGFR-2	38,04/15,67	2,31– 125,57	8,9–72,13	106,4/115,16	69,73– 136,62	93,85– 116,38	107,84/106,1	78,74– 131,71	78,74– 107,84

Примечания: \* – различия между группами статистически значимы (p<0,05).

Культуры МК характеризовались большой вариабельностью в концентрации лиганда HB-EGF: от 3,0 до 1589,8 пг/мл, и эти показатели статистически не отличались от результатов, полученных при анализе супернатантов клеток СМТ/ОС (см. табл. 24, рис. 56). Культуры эпителиальных опухолей статистически различались между собой: для клеток РП показатели содержания HB-EGF были более значимые (медиана 456,0: min 385,0 – max 620,0 пг/мл), чем для клеток РМЖ (медиана 355,5: min 300,5 – max 360,5 пг/мл) (см. табл. 25). Согласно критерию Краскела–Уоллиса, все исследованные группы культивируемых клеток солидных опухолей различались по продукции компонентов системы EGF: культивируемые клетки РМЖ были самыми активными продуцентами EGF, клетки СМТ/ОС наиболее активно секретируют в окружающую среду растворимую форму EGFR и HB-EGF.

В исследовании Musumeci G. и соавт. (2013) был проведен иммуногистохимический анализ ряда сарком мягких тканей на предмет экспрессии HB-EGF и продемонстрировано, что специфическое окрашивание развивалось преимущественно в образцах светлоклеточных сарком и лейомиосарком, где выявляли HB-EGF в плеоморфных и атипичных клетках, а также в межклеточном матриксе [698]. Полностью отрицательные образцы: хондросаркомы и липосаркомы характеризовались высокой дифференцировкой ткани и отсутствием плеоморфных клеток. Таким образом, по мнению авторов этой работы, экспрессия HB-EGF в саркомах была связана с определенными стадиями онкогенеза. В нашем исследовании в надосадочной жидкости культур клеток, выделенных из метастазов липосаркомы и хондросаркомы, была обнаружена достаточно высокая концентрация HB-EGF (241,3 и 259,8 пг/мл соответственно). Как известно, HB-EGF сначала синтезируется в виде заякоренной в мембране формы (proHB-EGF), а его растворимая форма (sHB-EGF) высвобождается путем выделения эктодомена из proHB-EGF. Гиперэкспрессия HB-EGF приводит к прогрессивному увеличению концентрации этого фактора в межклеточных пространствах [699]. Передача сигналов инсулиноподобного фактора роста (IGF) представляет собой сложную систему, которая влияет почти на каждый орган в организме человека посредством регуляции множества клеточных процессов, таких как пролиферация, выживание, митогенез, миграция, старение, ангиогенез и аутофагия [700]. Система IGF состоит из двух естественных лигандов, инсулиноподобного фактора роста IGF-1 и IGF-2; двух трансмембранных рецепторов IGF-1R и IGF-2R; и шести высокоаффинных IGF-связывающих белков IGFBP1-6 [701]. Последние принимают участие в регуляции биодоступности и периода полужизни IGF-1 и IGF-2, и каждый из этих белков имеет различную аффинность связывания и различные функции в зависимости от ткани [702; 703].

Мы изучили содержание белка IGFBP1 в супернатантах культивируемых клеток МК, СМТ/ОС, РМЖ и РП (см. табл. 24, 25, рис. 56). Оказалось, что культуры РП продуцируют самое

большое количество IGFBP1, медиана составила 4174,3 пг/мл (min 3372,4 – max 4762,5 пг/мл). Культуры СМТ/ОС секретировали значимо большее количество этого белка, по сравнению с культурами МК ( $p=0,00023$ ), которые характеризовались, в целом, самыми небольшими показателями (медиана 60,5: min 3,5 – max 4627,0 пг/мл), за исключением двух культур, для которых были получены очень высокие значения IGFBP1 (3853,0 и 4627,0 пг/мл соответственно).

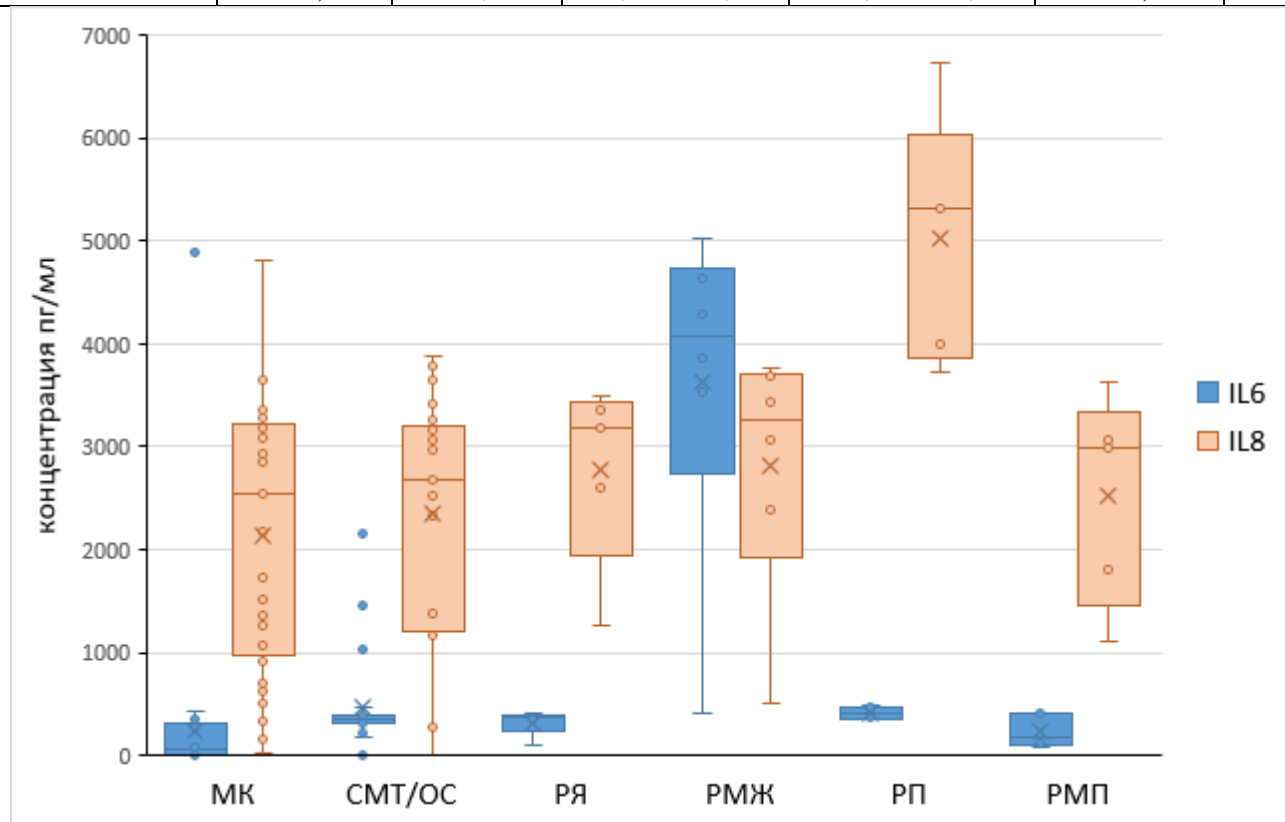
Reeve J.G. и соавт. (1992) продемонстрировали, что все изучаемые клеточные линии РМЖ, нейробластомы, ретинобластомы, рака толстой кишки, аденокарциномы печени, легкого экспрессировали белки IGFBP1-3 [704]. Zheng Y. и соавт. (2020) сообщили, что система IGF играет важную роль в развитии опухолей молочной железы, что подтверждается как *in vitro*, так и *in vivo* [700]. По крайней мере, в 50% опухолей молочной железы присутствует активированный IGF-1R, и уровень циркулирующего IGF-1 положительно коррелирует с частотой ER-положительных опухолей молочной железы.

В исследовании Pacher M. и соавт. (2007) у мышинной модели объем опухоли был значительно выше в ксенотрансплантатах, содержащих ER-положительные клетки MCF-7 со сверхэкспрессией IGF-1, по сравнению с контролем [705]. IGF-1 усиливал инвазивную способность клеток линии РМЖ MCF-7, при этом IGFBP-1, ингибитор передачи сигналов IGF-1, снижал активацию IGF-1R и подавлял пролиферацию и выживаемость в клетках MCF-7. Выявленный нами факт гиперэкспрессии IGFBP-1 культивируемыми клетками РП согласуется с наблюдениями других исследователей, в частности, с наблюдениями по выявлению IGF-1, его рецептора и белков IGFBP в тканях светлоклеточной почечно-клеточной карциномы, полученных интраоперационно [706].

Присутствие высоких концентраций ряда цитокинов в крови онкологических больных, таких как IL-6 и IL-8, является прогностическим индикатором прогрессирования заболевания при раке желудка, поджелудочной железы, молочной железы, легкого, при меланоме, колоректальном раке, миеломе [638; 707–709]. Установлено, что опухолевые клетки более десяти типов злокачественных новообразований способны продуцировать эти цитокины [638]. В нашем исследовании все клетки солидных опухолей секретировали в окружающую среду большие количества IL-6 и IL-8, по сравнению с культурой нормальных фибробластов FLECH, начиная с первых пассажей культивирования, при этом различия были статистически значимы ( $p=0,00001$  и  $p=0,00591$  соответственно) (табл. 28, рис. 58). Наиболее активными продуцентами этих цитокинов оказались культуры опухолевых клеток эпителиального происхождения: в супернатантах культур клеток РМЖ выявляли максимальное количество IL-6: медиана 4071,62 пг/мл (min 401,6 – max 5031,7 пг/мл), в супернатантах культур РП – IL-8: медиана 5322,8 пг/мл (min 3723,8 – max 6732,9 пг/мл).

Таблица 28 – Сравнительное содержание IL-6 и IL-8 в супернатантах культур клеток опухолей разного гистогенеза

Культура клеток	IL-6, пг/мл				IL-8, пг/мл			
	Медиана	Среднее значение	min–max	Перцентиль (25–75%)	Среднее значение	Медиана	min–max	Перцентиль (25–75%)
FLECH	132,07	98,34	0–409,78	15,23–233,94	430,34	344,87	0–1563,5	265,54–568,92
МК	244,47	51,79	0,04–4889,62	9,56–274,8	2143,77	2543,6	19,19–4809,1	983,8–3211,7
СМТ/ОС	464,75	349,02	2,09–2160,5	304,65–389,38	2260,71	2601,02	4,43–3879,5	1213,25–3198,5
РМЖ	3621,17	4071,62	401,6–5031,7	3521,8–4628,57	2808,43	3250,2	513,8–3762,8	3292,4–3681,2
РП	414,76	412,56	345,5–489,5	362,37–463,9	5019,97	5322,8	3723,8–6732,9	3987,8–5328,5
РЯ	319,2	362,37	98,41–410,01	356,61–463,9	2783,54	3186,62	1265,5–3497,6	3610,2–3357,8
РМП	239,8	182,64	82,18–408,97	117,74–407,45	2516,95	2983,89	1100,5–3623,2	1814,3–3062,9



*Примечание:* Различия статистически значимы, согласно критерию Краскела–Уоллиса ( $p=0,00001$  и  $p=0,00591$  соответственно).

Рисунок 58 – Продукция IL-6 и IL-8 клеточными линиями солидных опухолей



Среди всех исследованных культур опухолевых клеток именно клетки МК характеризовались наименее выраженными синтетическими функциями по отношению к IL-6 и IL-8: медиана 51,79 пг/мл (min 0,04 – max 4889,62 пг/мл) и медиана 2543,6 пг/мл (min 19,19 – max 4809,1 пг/мл) соответственно.

Для культивируемых клеток СМТ/ОС медиана концентрации IL-6 составила 349,02 пг/мл (min 2,09 – max 2160,5 пг/мл) и IL-8 – 2601,02 пг/мл (min 4,43 – max 3879,5 пг/мл). Известно, что в злокачественных новообразованиях, помимо опухолевых клеток, IL-6 продуцируется множеством других типов клеток, включая проникающие в опухоль клетки иммунной системы и стромальные клетки [710]. Для пациентов с РП характерны высокие концентрации IL-6 в сыворотке крови, что связывают со стадией и плохим прогнозом заболевания [711]. Интересно, что IL-6 связывается с мембранно-связанным рецептором IL-6 (IL-6R) на опухолевых клетках, чтобы индуцировать экспрессию генов-мишеней STAT3. Через данный сигнальный путь происходит стимуляция ангиогенеза и опухолевой инвазии через VEGF и экспрессию матриксных металлопротеиназ [712]. Кроме того, индуцированная IL-6 активация сигнального пути АКТ/mTOR участвует в защите от апоптоза и в усиленной пролиферации малигнизированных клеток. Гиперактивация передачи сигналов STAT3 отмечена при многих типах опухолей человека, в том числе у пациентов с РП в связи с чем разрабатываются терапевтические подходы, направленные на блокаду пути IL-6/STAT3 у данной категории больных [711].

Tobin R.P. и соавт. (2019) продемонстрировали, что больные МК с высокими концентрациями в плазме крови IL-6 (40%) либо IL-8 (63%), либо обоих (35%) имели меньшую ОВ по сравнению с пациентами с низкими концентрациями [713]. У пациентов с малыми концентрациями в периферической крови и низкой экспрессией в опухоли IL-6 и IL-8 наблюдали снижение количества циркулирующих MDSC. Многофакторный анализ показал повышенный риск смерти для индивидуумов с высоким уровнем IL-6 и IL-8 (HR 3,059) и с большим количеством MDSC (HR 4,265). Таким образом, эти результаты указывают на важную роль IL-6 и IL-8 в прогрессировании МК, так как IL-6 влияет на увеличение популяции периферических MDSC, а IL-8 рекрутирует эти высокоиммуносупрессивные клетки в микроокружение опухоли. При изучении концентрации IL-6 и IL-8 в сыворотке крови у пациентов с РМЖ было установлено, что уровни IL-6 и IL-8 были значительно выше у больных инвазивным протоковым раком, чем у практически здоровых людей, и коррелировали в высокой степени с клинической стадией заболевания, наличием метастазов в лимфатические узлы и экспрессией антигенов ER и HER2 ( $p < 0,05$ ) [708].

В настоящее время клиническое значение повышенной продукции IL-6 и IL-8 у больных СМТ/ОС изучено недостаточно. Nagi T. и соавт. (2017) продемонстрировали, что уровень IL-6

в сыворотке крови у пациентов с саркомами был выше, чем у пациентов с доброкачественными опухолями мягких тканей (медиана 9,04 и 3,31 пг/мл соответственно) [714], и определили, что размер опухоли и уровень IL-6 были значимыми предикторами злокачественного процесса. При этом была выявлена корреляция высокой силы между концентрацией С-реактивного белка, гемоглобина, стадией заболевания и содержанием IL-6 в крови пациентов. Степень злокачественности опухоли и уровень IL-6 оставались наиболее значимыми факторами общей и безрецидивной выживаемости. Изучение взаимодействия клеток остеосарком с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) микроокружения в модельных системах *in vitro* позволило установить, что IL-8, секретируемый малигнизированными клетками, выступает в роли паракринного фактора, стимулирующего МСК секретировать этот цитокин, в результате чего возникает перекрестный обмен сигналами, приводящий к активации инвазивных свойств клеток остеосаркомы и инициации метастатического процесса [715].

Нами был осуществлен также скрининг культур клеток солидных опухолей на предмет продукции спектра активных молекул, играющих роль во многих процессах, обеспечивающих жизнедеятельность и пролиферацию клеток в норме и патологии. Мы обнаружили значительную секреторную активность опухолевых клеток, превышающую таковую нормальных фибробластов человека, при этом наблюдали статистически значимые различия в продукции малигнизированными клетками из опухолей различного гистогенеза фоллистатина (FST), фактора роста гепатоцитов (HGF), остеопонтинина (OSTP) и пролактина (см. табл. 26, 27, рис. 57).

Культивируемые клетки МК и СМТ/ОС характеризовались ярко выраженной и сопоставимой продукцией FST: медиана 1,75 нг/мл (min 45,88 – max 36,39 нг/мл) – для культур МК и медиана 2,39 нг/мл (min 0 – max 123,71 нг/мл) – для культур СМТ/ОС ( $p=0,25$ ). Культуры опухолевых клеток эпителиального происхождения статистически значимо различались между собой по продукции FST ( $p=0,0112$ ): наиболее активной продукцией характеризовались культуры РЯ: медиана 920,2 пг/мл (min 270,7 – 1858,3 пг/мл), наименьшей продукцией FST характеризовались культуры РМЖ: медиана 61,3 пг/мл (min 24,2 – max 158,0 пг/мл). Для культур РП медиана составила 355,0 пг/мл (min 157,6 – max 1547,4 пг/мл).

Stove С. и соавт. (2004) обнаружили, что все линии клеток МК экспрессируют рецепторы активина [716]. В нормальных меланоцитах обработка активинном приводила к ингибированию роста и индукции апоптоза, процессам, которым противодействовало добавление FST. Обработка клеточных линий МК активинном также приводила к фосфорилированию молекул передачи сигнала SMAD. Секреция FST либо нативная, либо после ретровирусной трансдукции, эффективно предотвращала активацию SMAD, что указывало на участие FST в нейтрализации эффектов активина. FST является антагонистом активина, входящего

в суперсемейство TGF- $\beta$ , и FST с активинном действуют как система плейотропных факторов роста, которая участвует в пролиферации, дифференцировке и апоптозе ряда клеток, в том числе опухолевых [717]. Panagiotou G. и соавт. (2021) продемонстрировали увеличенную концентрацию FST в сыворотке крови пациентов с раком щитовидной железы и взаимосвязь со стадией TNM при постановке диагноза [718]. Аналогичные данные были получены при исследовании содержания FST в крови больных КРР и раком легкого [719; 720].

Фактор роста гепатоцитов (HGF) участвует в регуляции клеточной миграции, жизнеспособности и трехмерного морфогенеза, процессов, лежащих в основе опухолевой инвазии и метастазирования [721]. Плейотропная активность HGF опосредуется его рецептором, трансмембранной тирозинкиназой, кодируемой протоонкогеном *cMet*, тирозин-протеинкиназой MET. В целом считается, что аутокринная продукция HGF опухолевыми клетками наблюдается редко. Чаще HGF продуцируется в опухолевом микроокружении стромальными клетками, такими как опухолеассоциированные фибробласты, запускает активацию MET паракринным образом и способствует росту, выживанию, миграции малигнизированных клеток [722]. Индуцируя через выработку HGF эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток и активацию сигнальных путей, способствующих их выживанию, таких как ERK и АКТ, фибробласты участвуют в формировании резистентности злокачественных новообразований к лекарственной и таргетной терапии [723]. Известно, что передача сигналов HGF ответственна за развитие устойчивости к BRAF-ингибиторам при лечении МК [724].

Мы обнаружили, что практически все культивируемые клетки солидных опухолей продуцировали HGF: только в супернатантах культур МК в 6,89% случаев (2/29) не был выявлен этот фактор, медиана концентрации составила 80,98 пг/мл (min 0 – max 4761,32 пг/мл), что статистически значимо отличалось от культур СМТ/ОС: медиана 565,38 пг/мл (min 12,0 – max 10741,33 пг/мл),  $p=0,039$  (см. табл. 26, рис. 57). Культуры клеток ЭО также экскретировали разное количество HGF: РМЖ – медиана 48,3 пг/мл (min 36,4 – max 601,4 пг/мл), РП – медиана 349,2 пг/мл (min 14,9 – max 1219,2 пг/мл), РЯ – медиана 872,8 пг/мл (min 130,2 – max 1045,5 пг/мл),  $p=0,037$  (см. табл. 27; рис. 59). Таким образом, в нашем исследовании наиболее активными продуцентами HGF оказались культивируемые клетки РЯ и СМТ/ОС. Относительно недавно было показано, что HGF постоянно продуцируется более чем в 30% первичных опухолей толстой кишки и в клеточных линиях КРР вследствие мутаций, возникших в промоторной области гена, кодирующего HGF [725]. Подобные мутации в области промотора гена *HGF* встречаются и в клетках рака молочной железы [726]. Повышенная концентрация HGF была обнаружена в костном мозге пациентов с острым миелоидным лейкозом (AML) [727].

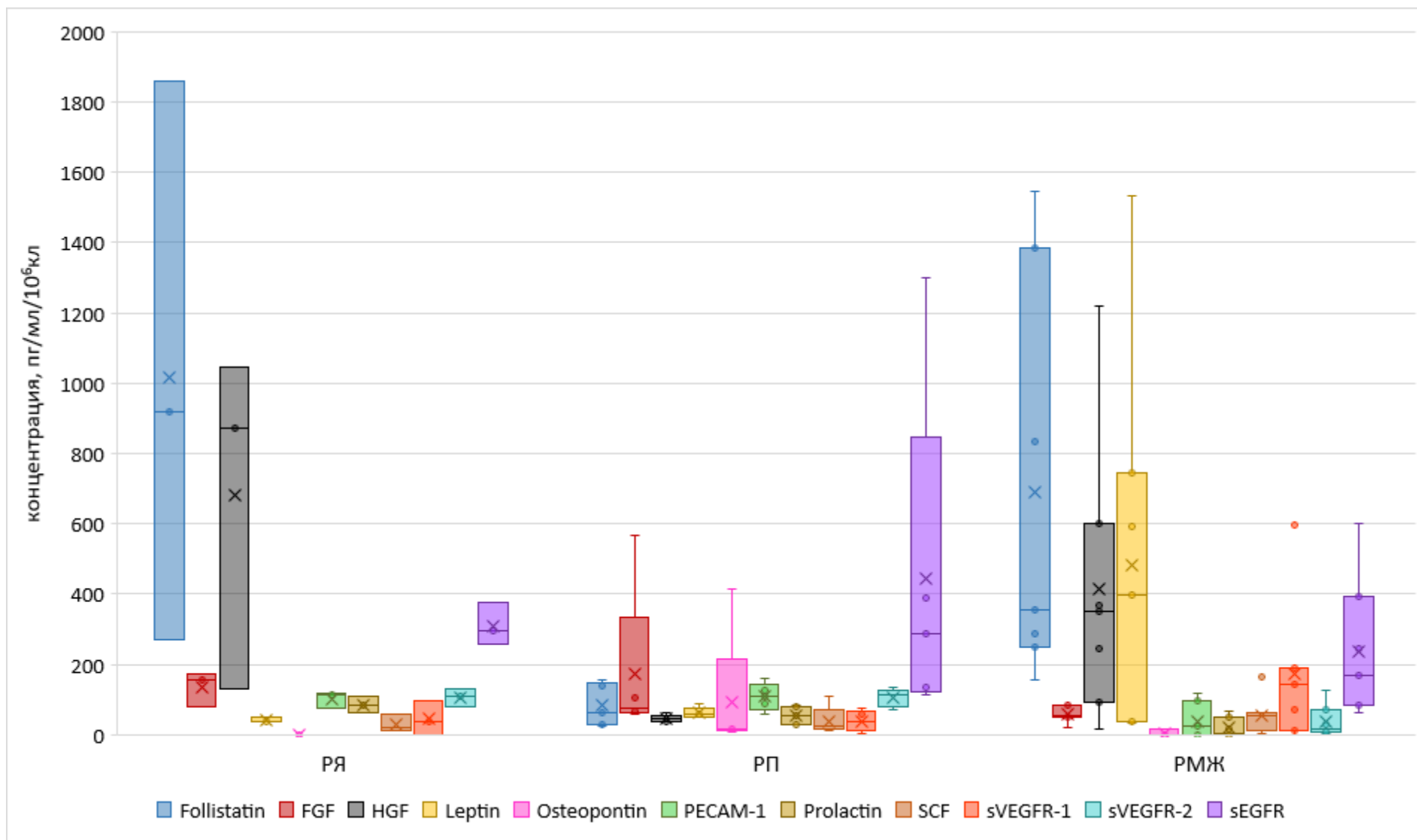


Рисунок 59 – Сравнительный анализ содержания факторов роста, инвазии, растворимых форм рецепторов факторов роста, факторов иммуносупрессии в супернатантах культур клеток РМЖ, РП, РЯ

Кроме того, было продемонстрировано, что около 50% первичных образцов и клеточных линий острого миелоидного лейкоза секретируют высокие уровни HGF, который активирует рецепторы MET аутокринным образом [735]. Интересно, что мутации HGF были обнаружены в 10,5% аденокарцином легкого и в 5,8% плоскоклеточных карцином легкого [736], тем не менее функциональное значение этих мутаций в настоящее время не изучено. Есть экспериментальные данные, что передача сигналов HGF/c-MET участвует в онкогенезе при различных типах сарком [737]. Taulli R. и соавт. (2006) показали, что клеточные линии, полученные из эмбриональных и альвеолярных рабдомиосарком, экспрессируют высокие уровни c-MET и HGF [738]. Другие группы исследователей обнаружили, что путь HGF/c-MET активируется при остеосаркоме, хондросаркоме и лейомиосаркоме [739], и повышенная экспрессия HGF/c-MET при синовиальной саркоме коррелировала с плохим прогнозом у пациентов [728].

В нашем исследовании была выявлена гиперпродукция OSTP культурами клеток МК: медиана 13257,26 пг/мл (min 67,56 – max 3257400,0 пг/мл), что было достоверно выше, чем для культур СМТ/ОС: медиана 361,82 пг/мл (min 18,93 – max 17179,0 пг/мл),  $p=1.2e-05$  (см. табл. 26, рис. 57). OSTP в высокой концентрации был обнаружен в супернатантах культур РМЖ: медиана 17590,0 пг/мл (min 6311,5 – max 414066,0 пг/мл), что статистически значимо отличалось от культур РП: медиана 758,2 пг/мл (min 207,8 – max 17084,9 пг/мл) и РЯ: медиана 502,8 пг/мл (min 152,5 – max 1714,7 пг/мл),  $p=0,0211$  (см. табл. 27, рис. 59).

OSTP экспрессируется многими типами клеток, такими как клетки костной ткани (остеобласты, остеокласты и остециты), клетки иммунной системы (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, макрофаги), нервные клетки, эпителиальные клетки, фибробласты, гладкомышечные клетки, эндотелиоциты и опухолевые клетки [729; 730]. Woźniak M. и соавт. (2020) провели иммуногистохимическое изучение первичных опухолей почки, которое продемонстрировало, что OSTP преимущественно экспрессируется на уровне белка в светлоклеточной почечно-клеточной карциноме по сравнению с другими типами опухолей [731]. OSTP играет ключевую роль в прогрессировании злокачественных новообразований, увеличивая пролиферацию, выживаемость, подвижность и инвазию опухолевых клеток при РМЖ, раке печени, РПЖ, КРР, раке легкого и МК [732]. Сверхэкспрессия OSTP была обнаружена в тканях опухоли и в крови пациентов, и уровень экспрессии коррелировал со стадией заболевания, что позволяет предложить OSTP в качестве диагностического и прогностического биомаркера для некоторых видов опухолей, например КРР [733]. Новые экспериментальные данные показывают, что ключевая роль OSTP – это уклонение опухоли от воздействия иммунной системы через регуляцию поляризации макрофагов, рекрутирование и ингибирование активации Т-лимфоцитов в микроокружении опухоли [734]. Следовательно, можно полагать, что в

дополнение к непосредственной протуморогенной функции OSTP также действует как иммунная «контрольная точка», регулятор иммуносупрессивного микроокружения.

Полученные нами данные по продукции пролактина культивируемыми клетками опухолей различного гистогенеза выявили в группе культур клеток опухолей эпителиального происхождения статистически значимые различия в продукции этого фактора: наибольшее количество пролактина выявили в супернатантах культур РЯ: медиана 82,85 пг/мл (min 61,66 – max 108,66 пг/мл) (см. табл. 27, рис. 59). Song H.J. и соавт. (2018) изучили 16 биомаркеров, обнаруживаемых в сыворотке крови пациентов с раком яичников, с целью выбрать оптимальный алгоритм, позволяющий минимизировать ошибки в постановке диагноза, и пришли к выводу, что пролактин является составляющей лучшей комбинации биомаркеров для выявления рака яичников [735].

### **3.3.5. Изменение секреторного профиля клеток солидных опухолей в трехмерной системе культивирования**

Солидные опухоли имеют сложную трехмерную пространственную организацию, включающую множество неопухолевых клеток и внеклеточный матрикс, которые в совокупности составляют микроокружение злокачественного новообразования [736]. В этих условиях опухолевые клетки, как правило, находятся в субоптимальных условиях роста, таких как гипоксия или сниженная концентрация питательных веществ, и на них влияют межклеточные контакты и/или различные сигналы, поступающие из микроокружения. В обычных двумерных однослойных культурах большинство этих «экологических» сигналов отсутствует, следовательно, отсутствует воздействие микроокружения опухоли, и биологические характеристики исходных злокачественных новообразований могут быть потеряны из-за клеточной адаптации, необходимой для выживания *in vitro* [737; 738]. Клетки, культивируемые на 2D-носителях, подвергаются воздействию однородной среды: факторов роста, питательных веществ, кислорода и определенного процентного содержания CO<sub>2</sub> [739]. И наоборот, клетки в солидных опухолях подвергаются воздействию различных градиентов биохимических молекул и биологических сигналов, которые могут способствовать как стимулирующему, так и тормозящему воздействию на прогрессирование опухоли [740].

Мы изучили, как меняются секреторные и инвазивные свойства клеток солидных опухолей при их культивировании в трехмерной клеточной системе, используя в качестве модели первичного опухолевого узла сфероиды (тумороиды).

В настоящее время хорошо известно, что, помимо возможной индукции химических градиентов в 3D-структурах, трехмерное межклеточное взаимодействие само по себе влияет на свойства малигнизированных клеток, такие как клеточная структура, адгезия,

механотрансдукция и передача сигналов в ответ на растворимые факторы, которые, в свою очередь, регулируют общую функцию клетки способами, резко отличающимися от традиционных форматов 2D-культивирования [741].

Многие исследователи считают, что кинетика роста опухолюидов *in vitro* сходна с кинетикой роста солидных опухолей. Начальный период роста солидных опухолей называют фазой бессосудистого роста, в этот период объем опухоли увеличивается в геометрической прогрессии, затем наступает состояние покоя, после которого следует фаза образования новых сосудов, вызванная действием ангиогенных факторов [742]. В процессе роста опухолюидов их объем экспоненциально увеличивается, далее по достижении размера 200–500 мкм в диаметре скорость роста уменьшается и выходит на плато, таким образом рост сфероидов соответствует начальной фазе роста опухолевого узла [743].

Мы провели сравнительный анализ секреторного спектра опухолевых клеток МК, СМТ/ОС, КРР, РМЖ, культивируемых в 2D- и 3D-системах, путем изучения супернатантов малигнизированных клеток на присутствие основных хемокинов, цитокинов, факторов пролиферации, инвазии, иммуносупрессии и обнаружили, что секреторная активность злокачественных клеток увеличивается при культивировании в 3D-формате независимо от гистогенеза опухоли.

Статистически значимые различия в секреторной активности клеток солидных опухолей в 2D- и 3D-системах наблюдали при исследовании уровня хемокина CCL2 (фактор хемотаксиса моноцитов в организме млекопитающих): в кондиционированной среде сфероидов его средняя концентрация составила 2090,49 пг/мл (min 150,74 – max 6316,8 пг/мл), в то время как в супернатанте монослойных культур концентрация составила 775,59 пг/мл (min 4,91 – max 1864,59 пг/мл);  $p=0,014$  (рис. 60 А). Также имели место статистически значимые различия в продукции CCL3 (макрофагальный воспалительный белок 1-альфа, участвующий при остром воспалении в рекрутинге и активации полиморфно-ядерных лейкоцитов посредством связывания с рецепторами CCR1, CCR4 и CCR5): 3,31 пг/мл (min 0,11 – max 20,24 пг/мл), по сравнению с 93,65 пг/мл (min 1,10 – max 1230,28 пг/мл), в монослое и опухолюидах соответственно ( $p=0,029$ ) (рис. 60 Б).

Статистически значимые закономерности были выявлены в отношении хемокина CCL15, который в норме оказывает хемотаксическое действие на нейтрофилы, моноциты, лимфоциты, эозинофилы и эндотелиальные клетки: в супернатантах монослойных культур его средняя концентрация составила 31,03 пг/мл (min 1,6 – max 139,57 пг/мл), в супернатантах сфероидов – 86,71 пг/мл (min 11,45 – max 580,73 пг/мл),  $p=0,031$  (рис. 60 В).

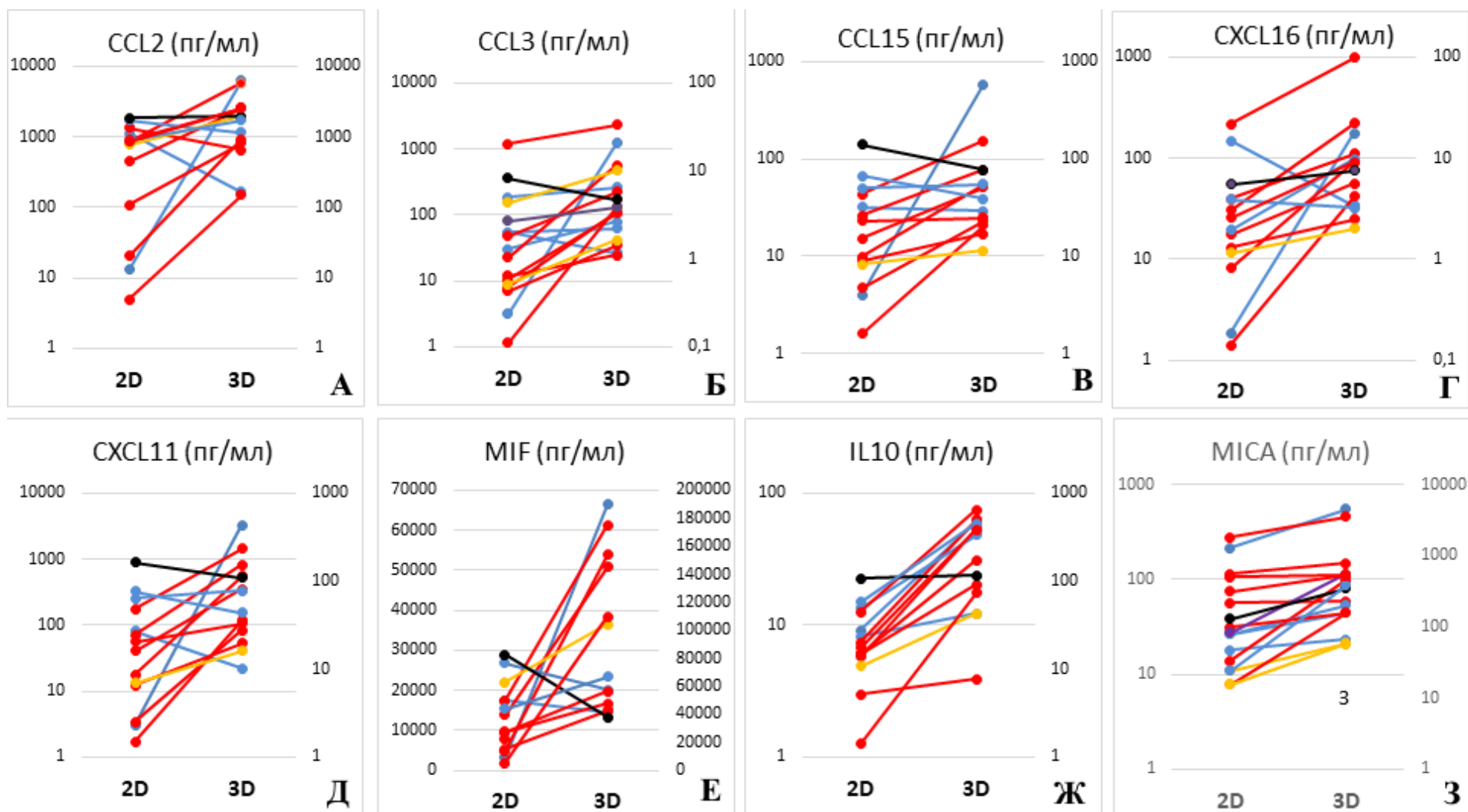


Рисунок 60 – Графическое изображение индивидуальных различий в продукции хемокинов и цитокинов клетками солидных опухолей, культивируемых в системах 2D и 3D. По оси абсцисс – условия культивирования (2D и 3D), по оси ординат – концентрация исследуемого вещества в супернатантах культур опухолевых клеток, пг/мл (логарифмическая шкала):

А – MCP-1/CCL2,  $p=0,014$ ; Б – MIP-1 $\alpha$ /CCL3,  $p=0,029$ ; В – CCL15,  $p=0,031$ ; Г – SCYB16/CXCL16,  $p=0,006$ ;  
 Д – CXCL11,  $p=0,011$ ; Е – MIF,  $p=0,007$ ; Ж – IL-10,  $p=0,00001$ ; З – MICA,  $p=0,024$ . ■ – МК; ■ – СМТ/ОС; ■ – КРР; ■ – РП; ■ – РМЖ



Для хемокина CXCL11 (интерферон-гамма-индуцируемый белок 9, хемоаттрактант для активированных Т-лимфоцитов) среднее содержание в супернатантах монослойных культур составило 33,62 пг/мл (min 1,5 – max 163,04 пг/мл), тогда как для сфероидов эти показатели были значительно выше: 306,22 пг/мл (min 10,16 – max 3327,24 пг/мл),  $p=0,011$  (см. рис. 60 Д). Растворимый CX3CL1 является сильным хемоаттрактантом для Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов, в то время как связанный с клетками хемокин способствует прочной адгезии лейкоцитов к активированным эндотелиальным клеткам, где он в первую очередь экспрессируется. Увеличение продукции CX3CL1 было выявлено преимущественно для сфероидов клеточных культур МК: 1799,82 пг/мл (min 529,37 – max 4952,4 пг/мл) против 639,53 пг/мл (min 140,31 – max 1240,49 пг/мл) в монослойной культуре,  $p=0,021$ .

Опухолевые клетки, растущие в монослойной культуре, продуцировали статистически значимо меньше CXCL16 (хемокин, привлекающий НКТ-клетки): 4,59 пг/мл (min 0,14 – max 21,54 пг/мл), по сравнению с клетками в составе тумороидов: 26,06 пг/мл (min 2,0 – max 177,51 пг/мл);  $p=0,006$  (см. рис. 60 Г). Секрция MIF (фактор ингибирования миграции макрофагов, эволюционно древний цитокин, регулирующий многие процессы в организме, в том числе процессы воспаления) также изменялась в зависимости от условий культивирования: 37,19 нг/мл (min 3,08 – max 82,66 нг/мл) в 2D-культурах до 82,02 нг/мл (min 37,69 – max 175,31 нг/мл) в сфероидах ( $p=0,007$ ) (см. рис. 60 Е).

Наблюдали статистически значимое увеличение продукции IL-10, играющего роль в процессах опухолеиндуцированной иммуносупрессии, в 3D-культуре, по сравнению с монослоем: 237,24 пг/мл (min 7,7 – max 649,19 пг/мл) и 27,92 пг/мл (min 1,42 – max 107,39 пг/мл),  $p=0,00001$  соответственно (см. рис. 60 Ж). Обнаружили статистически значимое увеличение продукции лиганда активационного рецептора цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток MICA в 3D-культурах: 514,13 пг/мл (min 57,68 – max 3537,5 пг/мл), по сравнению с монослоем: 250,16 пг/мл (min 15,63 – max 1818,5 пг/мл),  $p=0,024$  (см. рис. 60 З).

При изучении остальных анализов общих статистически значимых различий выявлено не было, однако индивидуальный анализ позволил продемонстрировать интересные особенности для опухолевых клеток отдельных пациентов. Среди всех исследованных культур опухолевых клеток сфероиды миксофибросаркомы #728 демонстрировали увеличение продукции практически всех гомеостатических и воспалительных хемокинов (табл. 29).

В частности, было обнаружено увеличение продукции хемокина CCL21, который в нормальных условиях является хемоаттрактантом для наивных Т-лимфоцитов, обладающих рецептором CCR7, почти в 4 раза в супернатантах сфероидов этой культуры (2D/3D – 246,61/891,25 пг/мл). Также увеличение концентрации CCL21 наблюдали в тумороидах культуры РП #291 (2D/3D – 357,76/428,64 пг/мл).

Таблица 29 – Содержание гомеостатических и воспалительных хемокинов/цитокинов в супернатантах индивидуальных двухмерных и трехмерных клеточных моделей СМТ и МК человека

Аналиты, пг/мл	Культуры солидных опухолей							
	МФС #728		РМС #862		МК #519		МК #916	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
CCL1	28,7	86,6 ↑	38,3	38,6 ↑	1,58	11,43 ↑	71,7	74,9 ↑
CCL2	37,9	6316,8↑	7338,5	2522,1	20,32	919,14↑	2618,1	2582,9
CCL3	9,1	1230,3↑	1,3	1,9 ↑	0,106	3,88 ↑	3,1	11,7 ↑
CCL7	33,3	358,1 ↑	702,2	4458,9↑	1,72	11,07 ↑	194,7	210,7 ↑
CCL8	0,58	3620,3↑	6302,6	158,6	0,035	0,35 ↑	2,5	2,7 ↑
CCL11	10,8	33,6 ↑	224,6	45,5	0,62	3,26 ↑	25,7	24,9
CCL13	67,4	117,7 ↑	379,1	273,6	1,06	2,04 ↑	106,6	71,9
CCL15	11,6	580,7 ↑	14,6	15,6 ↑	1,59	20,57	127,1	154,7 ↑
CCL17	7,1	57,3 ↑	15,03	16,1	0	0	26,1	27,8 ↑
CCL19	46,9	190,2 ↑	235,8	99,5	2,19	3,58 ↑	141,4	131,5
CCL20	11,8	6300,3↑	4,7	106,2 ↑	4,59	43,5 ↑	2177,8	3730,8↑
CCL21	246,6	891,3 ↑	446,5	468,4 ↑	15,87	155,7 ↑	743,9	767,9 ↑
CCL22	15,3	251,2 ↑	148,6	32,9	7,01	11,49 ↑	30,7	28,4
CCL23	4,3	24,5 ↑	8,6	9,3 ↑	0,146	0	19,3	19,3
CCL24	45,8	77,5 ↑	48,8	56,2 ↑	0,77	4,43 ↑	69,4	65,1
CCL25	103,7	906,4 ↑	222,4	328,7 ↑	6,62	77,15 ↑	639,6	705,3 ↑
CCL26	1040,8	28524 ↑	46,7	782,2 ↑	1,05	174,34↑	90,3	107,2 ↑
CCL27	8,5	47,3 ↑	18,36	15,3	0,17	0,42 ↑	24,1	22,3
CXCL1*	7,3	15,7 ↑	4,8	15,1 ↑	12,4	66,24 ↑	10,6	53,4 ↑
CXCL2	386,6	10328 ↑	86,4	1040,9↑	1,39	10,34 ↑	578,1	236,2
CXCL5	1394,3	15382 ↑	2026,6	2160,1↑	45,04	150,27↑	2702,7	2107,6
CXCL6	16,3	502,9 ↑	1038,8	6279,6↑	0,23	0	42,5	46,8 ↑
CXCL9	14,7	4773,6↑	37,9	41,7 ↑	0,75	0,73	72,03	69,05
CXCL10	22,2	16798 ↑	28,2	27,9	2,61	17,62 ↑	3099,3	4888,4↑
CXCL11	8,8	3320,2↑	3,07	4,09 ↑	1,49	36,1 ↑	141,8	235,8 ↑
CXCL12	316,4	6454,8↑	170,9	264,3 ↑	3,86	26,16 ↑	215,2	216,3 ↑
CXCL13	0,48	5,65 ↑	1,21	1,13	0,018	0,05 ↑	3,36	3,79 ↑
CXCL16	5,4	177,51↑	151,5	43,9	0,139	4,16 ↑	11,5	11,0
CX3CL1	71,4	3002,4↑	40,6	184,8 ↑	140,3	1031,2↑	3611,6	4952,4↑
GM-CSF	624,7	15277 ↑	37,9	24,5	1,61	9,08 ↑	68,4	68,8 ↑
IFN-γ	13,8	117,5 ↑	24,08	26,1 ↑	0,66	4,78 ↑	77,5	85,3 ↑
IL-1β	11,9	35,1 ↑	21,03	20,7	0,45	1,01 ↑	27,7	23,9
IL-2	3,5	29,02 ↑	6,4	7,2 ↑	0,07	1,01 ↑	19,9	23,8 ↑
IL-4	10,6	41,8 ↑	7,5	9,6 ↑	0,14	1,15 ↑	12,7	12,07
IL-6*	0,2	34,08 ↑	36,5	25,1	1,89	71,03 ↑	5,09	1,7
IL-8	2668,2	10128 ↑	8886,9	9589,8↑	113,03	135,26↑	9699,5	7426,1
IL-10	26,3	61,3 ↑	34,2	41,1 ↑	1,42	73,2 ↑	59,03	502,8 ↑
IL-16	19,05	187,5 ↑	52,4	59,2 ↑	1,16	6,59 ↑	131,8	130,6
TNF-α	9,2	111,06↑	17,6	17,9 ↑	0,508	5,77 ↑	46,07	54,26 ↑
MIF*	8,9	66,4 ↑	34,02	52,6 ↑	5,29	109,61↑	11,5	145,02↑
MICA	215,9	549,3 ↑	79,3	158,3 ↑	313,38	536,81↑	217,1	225,7 ↑
TGF-β1*	2,9	3,7 ↑	2,1	1,05	3,505	2,836	5,6	3,08

Примечание: МФС – миксофибросаркома, РМС – рабдомиосаркома, МК – меланома кожи; \* – нг/мл.

По интенсивности увеличения рассматриваемых специфических синтетических функций при переходе от монослойной культуры к тумороидам были отмечены образцы культур клеток рабдомиосаркомы #862, МК #519 и #916 (см. табл. 28). Все эти культуры малигнизированных клеток были получены из метастатических образований, опухолевый процесс носил агрессивный характер, клинически опухоли были резистентны к стандартным методам терапии, что привело к быстрой гибели пациентов.

Статистически значимого общего увеличения продукции TGF- $\beta_1$  в 3D-культуре, по сравнению с монослоем, для всех типов опухолей не наблюдали: 2,23 нг/мл (min 0,95 – max 4,17 нг/мл) для сфероидов против 2,54 нг/мл (min 0,59 – max 5,57 нг/мл) для монослойного варианта культивирования,  $p=0,540$ . Однако при индивидуальном анализе было обнаружено, что продукция TGF- $\beta_1$  увеличивалась в 3D-культуре клеток леймиосаркомы #699 в два раза по сравнению с 2D-культурой (1,53 и 0,69 нг/мл соответственно). Аналогичная тенденция была выявлена для клеток МК #912 – 3D/2D 3,82 и 2,47 нг/мл соответственно; для клеток миксофибросаркомы #728 – 3D/2D 2,91 и 3,73 нг/мл соответственно.

Обнаруженную нами гиперсекрецию ряда хемокинов в тумороидах можно расценивать как активацию злокачественного процесса в трехмерном пространстве. Клетки солидных опухолей усиливают секрецию факторов, способствующих формированию микроокружения, благоприятного для их пролиферации и диссеминации. Таким образом, для имитации реального спектра молекул, присутствующих в опухолевом микроокружении и участвующих в регуляции туморогенеза, необходимо воспроизводить среду обитания малигнизированных клеток, максимально приближая ее к естественной. Как известно, передача сигнала по оси CCL2–CCR2 связана с привлечением макрофагов и регуляторных Т-лимфоцитов в опухоль [744], что может способствовать опухолевой прогрессии. Кроме того, известна протуморогенная функция CCL2, способствующая онкогенезу и последующему метастазированию [745]. Установлено, что хемокин CCL3 играет роль в привлечении моноцитов, макрофагов, ДК, опосредует взаимодействие CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов с ДК, наивными CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами и способствует экстравазации малигнизированных клеток [746]. Известно также, что сигнальный путь CCL15–CCR1 приводит к рекрутизации и накоплению супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) в ткани опухоли [747]. CCL15 рассматривается как независимый предиктор плохого прогноза при КРР, его повышенный уровень в крови пациентов ассоциирован с метастатическим процессом [748].

Хемокин CXCL16 влияет на миграцию НКТ и незрелых лимфоидных клеток [749]. Сигнализация через ось CXCL12–CXCR4 способствует выживанию, пролиферации, метастазированию и приобретению лекарственной устойчивости опухолевых клеток [750]. Факт гиперэкспрессии CX3CL1 клетками МК в условиях трехмерного культивирования

интересен в свете исследований Schmall A. и соавт. (2015), которые установили, что при раке легкого посредством опухолеассоциированных хемокинов CX3CL1 и CCL2 происходит рекрутизация и накопление макрофагов в опухолевом микроокружении, которые, в свою очередь, продуцируют IL-10, опосредующий усиление экспрессии рецепторов CX3CR1, что усиливает чувствительность клеток, их несущих, к CX3CL1 [751]. Zhou B. и соавт. (2016) обнаружили клинически корреляцию уровня этого хемокина со стадией заболевания у больных раком легкого [752]. Ранее Izraely S. и соавт. (2010) провели работу по анализу рецепторного аппарата на культивируемых клетках МК и показали, что клетки МК, ведущие свое происхождение из метастатических очагов головного мозга больных, имеют повышенную экспрессию CCR4 и мембранного CX3CL1 [753]. CXCL11 экспрессируется многими солидными опухолями и участвует в регуляции процессов опухолевого роста, метастазирования, лимфоидной инфильтрации [754].

Взаимодействие лиганда MICA на опухолевых клетках с активационным рецептором NKG2D на NK-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах приводит к их активации с последующей элиминацией опухолевых клеток. Однако, как уже указывалось ранее, для большинства опухолей характерна гиперпродукция этого лиганда с последующим «слушиванием» стресс-индуцированных молекул MICA с поверхности малигнизированных клеток. Взаимодействие клеток иммунной системы с такой растворимой формой молекулы ведет к потере их эффекторных функций [610].

В трехмерной системе культивирования злокачественных клеток этот механизм активируется. Мы наблюдали увеличение продукции IL-10, который способствует привлечению и активации регуляторных Т-лимфоцитов, приобретению ДК толерогенного фенотипа и уменьшению их подвижности, подавлению активности CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов и NK-клеток [19].

Находясь в трехмерном пространстве, опухолевые клетки усиливали также продукцию фактора ингибирования миграции макрофагов MIF, который известен как важный медиатор в создании иммуносупрессивного микроокружения опухоли [755].

Введение в трехмерную систему фибробластов легкого эмбриона человека FLECH для имитации стромального компонента опухолевого узла оказывало различное воздействие на инвазивные свойства опухолевых клеток. При сравнении скорости распространения в матрикеле гомо- и гетеросфероидов, включающих клетки опухолей различного гистогенеза, наблюдали существенные различия. Мы проанализировали секреторный профиль культуры фибробластов FLECH и обнаружили, что FLECH по своему секреторному профилю приближаются к свойствам опухолеассоциированных фибробластов (CAF) и продуцируют значительные количества IL-6, IL-8, MIF, HGF, FGF, SCF и ряд хемокинов (табл. 30).

Таблица 30 – Продукция хемокинов и цитокинов фибробластами легкого эмбриона человека  
FLECH

Исследуемые вещества	Концентрация вещества в супернатанте клеточной культуры, пг/мл	Исследуемые вещества	Концентрация вещества в супернатанте клеточной культуры, пг/мл
6Ckine/CCL21	182,11	MIF	127713,97
BCA-1/CXCL13	0,06	MIG/CXCL9	5,48
STACK/CCL27	1,02	MIP-1 $\alpha$ /CCL3	2,97
ENA-78/CXCL5	284,27	MIP-1 $\beta$ /CCL15	18,13
Eotaxin/CCL11	6,38	MIP-3 $\alpha$ /CCL20	4
Eotaxin-2/CCL24	9,09	MIP-3 $\beta$ /CCL19	414,95
Eotaxin-3/CCL26	8,73	MPIF-1/CCL23	0
Fractalkine/CX3CL1	40,01	SCYB16/CXCL16	3,93
GCP-2/CXCL6	10,25	SDF-1 $\alpha\beta$ /CXCL12	245,67
GM-CSF	28,02	TARC/CCL17	0
Gro-a/CXCL1	192,78	TECK/CCL25	89,04
Gro-b/CXCL2	14,34	TNF- $\alpha$	4
I-309/CCL1	12,06	HGF	2683,65
IFN- $\gamma$	3,75	FGF	72,32
IL-1 $\beta$	3,51	SCF	47,68
IL-2	0,44	TGF $\beta$ <sub>1</sub>	934,2
IL-4	0,27	MCP-3/CCL7	16,09
IL-6	409,78	MCP-4/CCL13	10,05
IL-8/CXCL8	1598,08	MDC/CCL22	12,86
IL-10	16,24	I-TAC/CXCL11	14,31
IL-16	5,32	MCP-1/CCL2	997,22
IP-10/CXCL10	799,26	MCP-2/CCL8	0,52

В других исследованиях установлено, что CAF стимулируют миграцию малигнизированных клеток посредством паракринной передачи сигналов IL-6, IL-8, инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), CCL2, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 [768; 769]. В то же время было продемонстрировано, что клетки рабдомиосаркомы в условиях гипоксии секретируют повышенное количество IL-8, который является сильным хемоаттрактантом для фибробластов [770]. Есть данные, полученные на клеточных линиях рабдомиосаркомы, что MIF, находясь в высокой концентрации в микроокружении, ингибирует хемотаксис стромальных клеток к различным хемоаттрактантам, включая IL-8, то есть секретируемый опухолевыми клетками MIF может эффективно противодействовать эффекту IL-8 и ингибировать рекрутирование CAF в разрастающуюся опухоль [756]. Ряд исследователей отмечает не только проопухолевую, но и противоопухолевую активность CAF, связанную с продукцией целого ряда иммуномодулирующих цитокинов, таких как IL-10, TGF- $\beta$ , TNF, IFN- $\gamma$ , способствующих вербовке и поляризации макрофагов, Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [757].

Гетеросфероиды, полученные из клеток КРР #485, были более стабильны, чем гомосфероиды: через 24 часа гомосфероиды КРР #485 увеличивали занимаемую ими площадь в матригеле с  $79 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $580 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>, тогда как гетеросфероиды увеличивали первоначально занимаемую ими площадь с  $79 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $199 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> (рис. 61 А). Такую же тенденцию наблюдали для сфероидов РП #291. Введение в клеточную конструкцию фибробластов влияло различным образом на скорость распространения клеток МК в матригеле: для трех культур из пяти скорость практически не менялась (рис. 61 Б, В). Гетеросфероиды культуры МК #226 распространялись с большей скоростью, а для культуры МК #311 была наибольшей скорость распространения гомосфероида в матригеле. Усиление инвазивных характеристик гетеросфероидов было продемонстрировано для культур СМТ/ОС: гомосфероиды остеогенной саркомы #793 через 24 часа увеличивали занимаемую ими площадь с  $31 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $289 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>, а уже через 48 часов – до  $321 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> (рис. 61 Д). Присутствие фибробластов в гетеросфероиде через 24 часа способствовало увеличению занимаемой площади с  $25 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $521 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>, а через 48 часов – до  $663 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>. Подобный эффект усиления инвазивных характеристик наблюдали для клеток культуры синовиальной саркомы #716 (рис. 61 Г).

Через 48 часов от начала культивирования в матригеле наблюдали увеличение площади гомосфероидов с  $55 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $298 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>, тогда как для гетеросфероидов площадь увеличивалась с  $59 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> до  $160 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup>. В то же время скорость распространения в матригеле гомо- и гетеросфероидов миксофибросаркомы #982 оставалась практически неизменной (рис. 61 Е). Скорость распространения гомосфероидов в трехмерной среде коррелировала с продукцией культивируемыми клетками целого спектра биологически активных веществ: наблюдали наличие положительной двухсторонней корреляции высокой силы с присутствием в супернатантах культур опухолевых клеток IL-8 ( $\rho=0,636$ ,  $p=0,035$ ), HGF ( $\rho=0,850$ ,  $p=0,004$ ), SCF ( $\rho=0,857$ ,  $p=0,014$ ), FST ( $\rho=0,685$ ,  $p=0,029$ ), Prolactin ( $\rho=0,810$ ,  $p=0,015$ ), PECAM-1 ( $\rho=0,788$ ,  $p=0,004$ ) (табл. 31). Коэффициент скорости инвазии (KS) опухолевых клеток, представляющий собой соотношение скорости движения опухолевых клеток в гомосфероиде к таковой в гетеросфероиде, выраженное в процентах, также был ассоциирован с присутствием в микроокружении вышеназванных факторов. Опухолевые клетки, составляющие гетеросфероиды, которые характеризовались высокими значениями KS, секретировали большое количество цитокинов и факторов инвазии, что позволяет предполагать наличие аутокринного типа регуляции процессов миграции и инвазии, поэтому присутствие FLECN не оказывало существенного воздействия на подвижность злокачественных клеток, в то время как в гетеросфероидах, включающих опухолевые клетки с низкой секреторной активностью, регуляция могла осуществляться по паракринному пути.

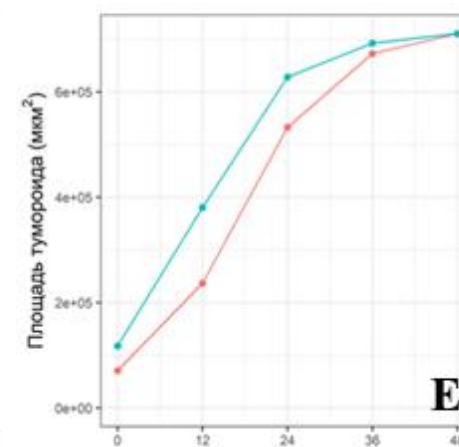
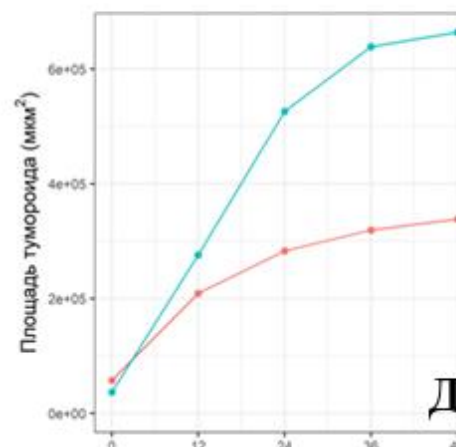
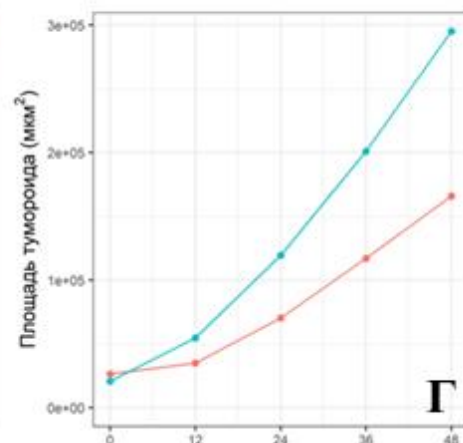
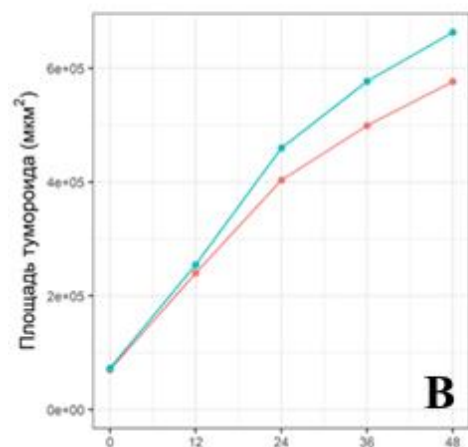
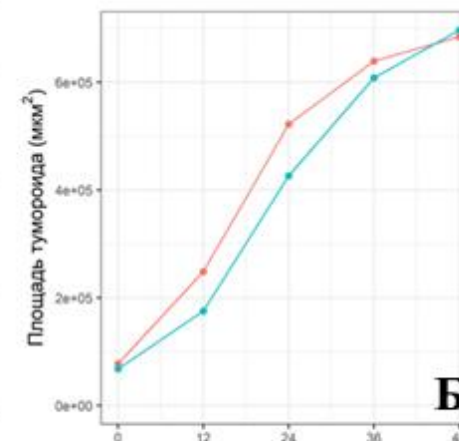
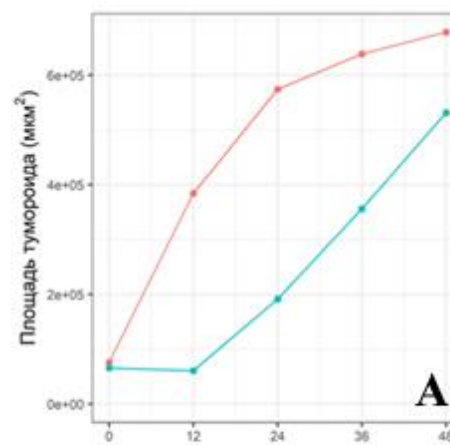
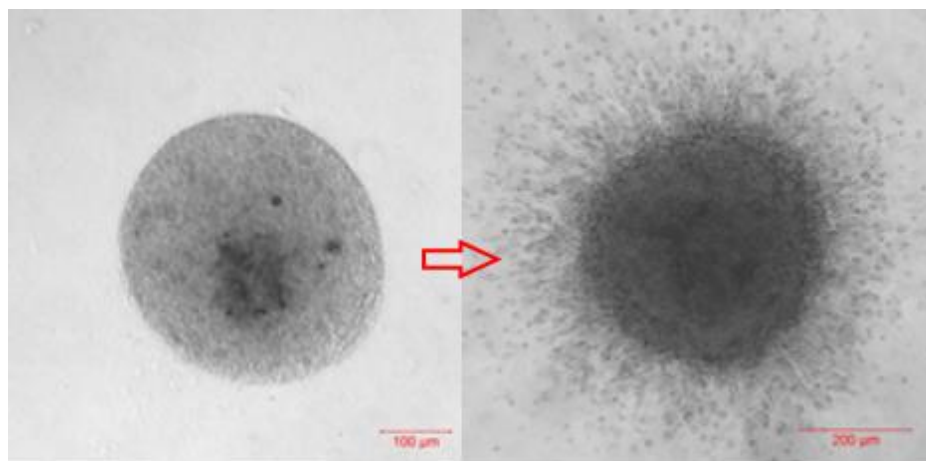


Рисунок 61 – Графическое изображение индивидуальных различий в динамике распространения в матригеле гомо- и гетеросфероидов, полученных из опухолей различного гистогенеза:

А – #485 КРР; Б – #519 МК; В – #916 МК; Г – #716 синовиальная саркома; Д – #793 остеогенная саркома; Е – #982 миксофибросаркома.

Красной линией обозначена кривая изменения площади гомосфероидов, синей линией – изменения площади гетеросфероидов.

Общее время наблюдения – 48 часов

Таблица 31 – Корреляционные связи между скоростью инвазии клеток солидных опухолей в трехмерной системе и продукцией факторов, ассоциированных с метастазированием

Кульгура	$S_{\text{гомо}}$	KS	IL-6	IL-8	HGF	SCF	MIF	VEGF	FST	OSTP	Leptin	PECAM-1	Prolactin
	$\cdot 10^3$ МКМ <sup>2</sup> /ч	%	пг/мл										
485	20,8	416,0	362,37	3727,83	575,25	68	82662,24	8256,8	8629,23	7230,5	–	–	–
291	18,86	463,0	412,56	5328,5	238,44	72,45	–	1796,98	3157,96	6311,45	68,05	128,57	80,08
512	6,98	54,59	2381,5	10,452	369,43	12,92	62795,39	6548	157,56	518,82	48,36	0	15,75
519	13,16	110,0	87,9	2934,9	147,51	13,85	5285,021	185,74	11258,75	13818,69	66,97	104,32	40,97
916	13,55	110,3	274,8	3434,9	–	–	39426,1	2887,5	28295,73	–	–	–	–
226	3,76	29,54	27,734	1269,65	52,95	5,02	27654	5091	0,24	15398,56	34,17	21,33	0
311	19,15	336,6	4,45	922,65	1357,74	64,7	–	418,77	3853,18	17221,46	296,95	746,11	393,69
826	6,50	86,84	1,617	2177,55	118,85	1,96	14059,45	9022,5	1403,81	21802,48	16,64	0	24,91
793	6,04	45,44	181,33	1162,2	–	–	43863,75	5478,92	–	–	619,07	91,06	4,78
716	2,10	41,5	4,371	4,429	33,42	–	–	315,82	395,81	1076,29	62,1	60,19	19,41
982	12,56	90,88	379,32	2677,5	65,38	–	76766,99	1653,5	219,98	1314,89	–	–	–
rho*				0,718	0,7	0,893			0,721			0,797	0,905
p**				0,013	0,036	0,003			0,019			0,003	0,002

Примечание:  $S_{\text{гомо}}$  – скорость распространения гомосфероида в матрикеле; KS – коэффициент скорости инвазии; OSTP – остеопонтин.

\* – критерий Спирмана. \*\* – точная значимость критерия.



Поэтому присутствие фибробластов индуцировало миграцию клеток опухолей. Факт тесного взаимодействия и реципрокного влияния CAF и малигнизированных клеток хорошо известен [758]. Механизмы, лежащие в основе CAF-опосредованного контроля прогрессирования опухоли и устойчивости к терапии, включают индукцию эпителиально-мезенхимального перехода, активацию сигнальных путей, связанных с выживанием злокачественных клеток, обеспечивающих их пластичность и метаболическое перепрограммирование [759].

Онкологическое заболевание представляет собой сложный процесс, при котором гетерогенность опухолевых клеток и реципрокное взаимодействие между опухолевыми клетками, окружающими стромальными клетками и внеклеточным матриксом, являются ключевыми детерминантами в развитии опухоли и реакции на терапию.

Туморогенез ассоциирован с процессами, при которых связь между клетками контролируется разнообразными биологически активными молекулами, действующими посредством аутокринных, паракринных или юкстакринных механизмов.

Опухолевые клетки способны сами синтезировать факторы, стимулирующие пролиферацию, ангиогенез, миграцию, инвазию, привлекающие клетки иммунной системы в ложе опухоли и ингибирующие их противоопухолевую активность. И, как правило, усиление васкуляризации опухоли и гиперэкспрессии опухолевыми клетками факторов, индуцирующих вышеописанные процессы, приводит к формированию микроокружения, благоприятствующего активации злокачественного процесса, что, по данным некоторых исследователей, клинически ассоциировано с диссеминированной стадией онкологического заболевания и плохим прогнозом.

В результате проведенной работы по анализу продукции культивируемыми опухолевыми клетками ИСФ нами было обнаружено, что клетки солидных опухолей в системе *in vitro* способны синтезировать и выделять в межклеточные пространства значительные количества этих молекул, при этом длительное пассирование приводило к статистически значимому увеличению их синтеза и секреции в окружающую среду.

Активная продукция клетками солидных опухолей в экспериментальной системе *in vitro* целого спектра факторов, обладающих иммуностимулирующим и иммуносупрессивным действием, обеспечивающих пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, соответствует наблюдаемой клинической картине у пациентов с повышенной концентрацией этих факторов в крови.

Большинство опубликованных исследований указывает на прогностический эффект уровня цитокинов, факторов роста, пролиферации, инвазии в крови больных, поскольку высокие сывороточные концентрации MICA, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF и др. связаны с негативным

прогнозом при различных типах опухолей. Малигнизированные клетки защищаются от воздействия иммунной системы с помощью опосредованной цитокинами локальной иммуносупрессии, и цитокины, продуцируемые опухолями, играют ключевую роль в этом процессе.

Пространственная организация клеточной модели *in vitro* оказывает влияние на метаболические и секреторные функции культивируемых клеток солидных опухолей, вызывая активацию процессов туморогенеза, связанных с формированием микроокружения, благоприятного для пролиферации и метастазирования: при переходе от 2D- к 3D-формату культивирования наблюдается увеличение продукции хемокинов CCL2, CCL3, CCL15, CX3CL1, CXCL11, CXCL16, цитокинов IL-10, MIF, лиганда активационного рецептора NKG2D НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов MICA. Зависимость изменения скорости распространения опухолевых клеток в модельной системе, включающей стромальный компонент, от продукции факторов IL-8, HGF, SCF, FST, Prolactin, PECAM-1 подтверждает наличие альтернативных сигнальных путей регуляции опухолевого роста.

Таким образом, можно предполагать, что онкоспецифическая и независимая от типа злокачественного новообразования повышенная продукция ряда ИСФ является одним проявлений патогенетического механизма, связывающего стадию онкологического процесса, прогноз заболевания с функциональным состоянием иммунной системы.

#### **3.4. Сравнительная характеристика пролиферативного и метастатического потенциала культивируемых клеток солидных опухолей**

Миграция клеток – эволюционно консервативный, многогранный процесс, который позволяет отдельным клеткам и их группам менять положение в трехмерном пространстве. Клеточная миграция является неотъемлемой частью процессов формирования тканей и органов при эмбриональном развитии, поддержания гомеостаза и регенерации [760]. Фактически любая клетка, содержащая ядро, в состоянии мигрировать после получения определенных промиграционных стимулов, это справедливо в том числе для стволовых, эпителиальных, эндотелиальных, стромальных клеток, нейронов и лейкоцитов [761].

В процессе опухолевой прогрессии малигнизированные клетки могут приобрести способность к миграции, в результате чего сначала меняется их локализация в ткани опухоли, а затем они способны выйти за ее пределы. Миграция опухолевых клеток характеризуется пластичностью с большими адаптационными возможностями и объединяет динамические изменения клеточного цитоскелета, клеточного и внеклеточного матрикса, клеточную адгезию, периклеточный протеолиз и тканевое ремоделирование [762]. Движущиеся малигнизированные клетки вынуждены приспосабливаться к внешним стимулам микроокружения, таким как архитектура окружающей ткани, структура и тип субстрата, в котором они осуществляют

движение, молекулярные триггеры, в частности, компоненты экстрацеллюлярного матрикса, цитокины и хемокины [763].

В ответ на химические и физические сигналы, поступающие из опухолевого микроокружения в ходе метастатической диссеминации, злокачественные клетки реализуют универсальный репертуар механизмов инвазии, включающий функциональные программы как минимум двух уровней: на уровне одной клетки и популяционные. Генетическая гетерогенность опухолевых клеток приводит к формированию разнообразия механизмов миграции, что лежит в основе их адаптации к терапевтическим воздействиям.

Миграция и инвазия опухолевых клеток, безусловно, являются критическими процессами в метастатическом каскаде. Механизмы этих явлений многообразны, пластичны, имеют сходство с механизмами перемещения клеток в ходе эмбриогенеза, которые реализуются злокачественными клетками и микроокружением опухоли [764]. Прогресс в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе миграции и инвазии малигнизированных клеток в экспериментальных системах, должен быть дополнен пониманием реальных процессов, происходящих в организме онкологических больных.

В настоящее время этот разрыв между клинико-патологическими и экспериментальными наблюдениями в основном связан с отсутствием соответствующих маркеров и комплексной модели *in vivo*, которая надлежащим образом повторяла бы стохастический канцерогенез у человека. В этой ситуации решением проблемы могут быть текущие клеточные биологические исследования *in vitro* по миграции опухолевых клеток, которые будут способствовать разработке методов улучшенной диагностики, прогноза и в конечном итоге инновационных методов лечения.

В нашем исследовании были изучены в условиях *in vitro* параметры пролиферации, миграции и инвазии культивируемых клеток солидных опухолей человека в связи с продукцией этими клетками спектра молекул, ассоциированных с инвазией и метастазированием.

Мы изучили четыре основных параметра миграции и инвазии культивируемых клеток солидных опухолей человека: инвазивный потенциал (IP), представляющий собой соотношение количества инвазивных клеток к мигрирующим клеткам, выраженное в процентах; скорость миграции опухолевых клеток (MS), соответствующая скорости зарастания «экспериментальной раны», определяемой с помощью системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ; Slope миграции (Slope<sub>Migr</sub>) и инвазии (Slope<sub>Inv</sub>), параметры, характеризующие скорость инвазии и миграции малигнизированных клеток, вычисляемых с помощью клеточного анализатора xCelligence в режиме реального времени. Все исследованные клеточные культуры солидных опухолей, полученные от разных больных, проявляли инвазивные свойства и демонстрировали различный IP (табл. 32, рис. 62).

Таблица 32 – Характеристики миграционных и инвазивных свойств культивируемых клеток солидных опухолей

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

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

Сравнительный анализ миграционных свойств клеток МК и СМТ/ОС показал, что в целом клетки СМТ/ОС обладали большей MS, определяемой по времени зарастания «экспериментальной раны»: для клеток МК MS составила 25,3 мкм/ч, для клеток СМТ/ОС – 39,33 мкм/ч ( $p < 0,05$ ). IP МК и СМТ/ОС, отражающий количество клеток, проникающих через трехмерную среду матригель за определенный промежуток времени (48 ч), составил 53,16% и 43,96% соответственно.

Наибольшим IP характеризовались клетки РП: 72,92 и 74,67%. Средняя скорость инвазии, определяемая по параметру Slope, была статистически значимо выше у клеточных культур СМТ/ОС, чем у клеточных культур МК:  $95,32e^{-3}$  и  $59,82e^{-3}$  соответственно ( $p < 0,05$ ). Статистически значимых различий скорости миграции и инвазии от длительности культивирования клеток (числа пассажиров) выявлено не было. Согласно методу Краскела–Уоллиса обнаружены различия в величине IP опухолевых клеток в зависимости от источника происхождения культивируемых клеток СМТ/ОС (первичная опухоль, рецидив, метастаз):  $18,11 \pm 3,05\%$ ,  $25,75 \pm 5,57\%$ ,  $52,97 \pm 5,64\%$  соответственно,  $p < 0,05$  (рис. 63 А). Для культур МК данный анализ провести не удалось, так как использованные в экспериментах злокачественные клетки были получены в основном из метастатических образцов.

Как известно, миграция опухолевых клеток представляет собой адаптивный процесс, который связан с особенностями клеточной адгезии и перестройки цитоскелета, взаимодействием клеток с межклеточным матриксом и его ремоделированием, и является основой для инвазии и метастатической диссеминации [762].

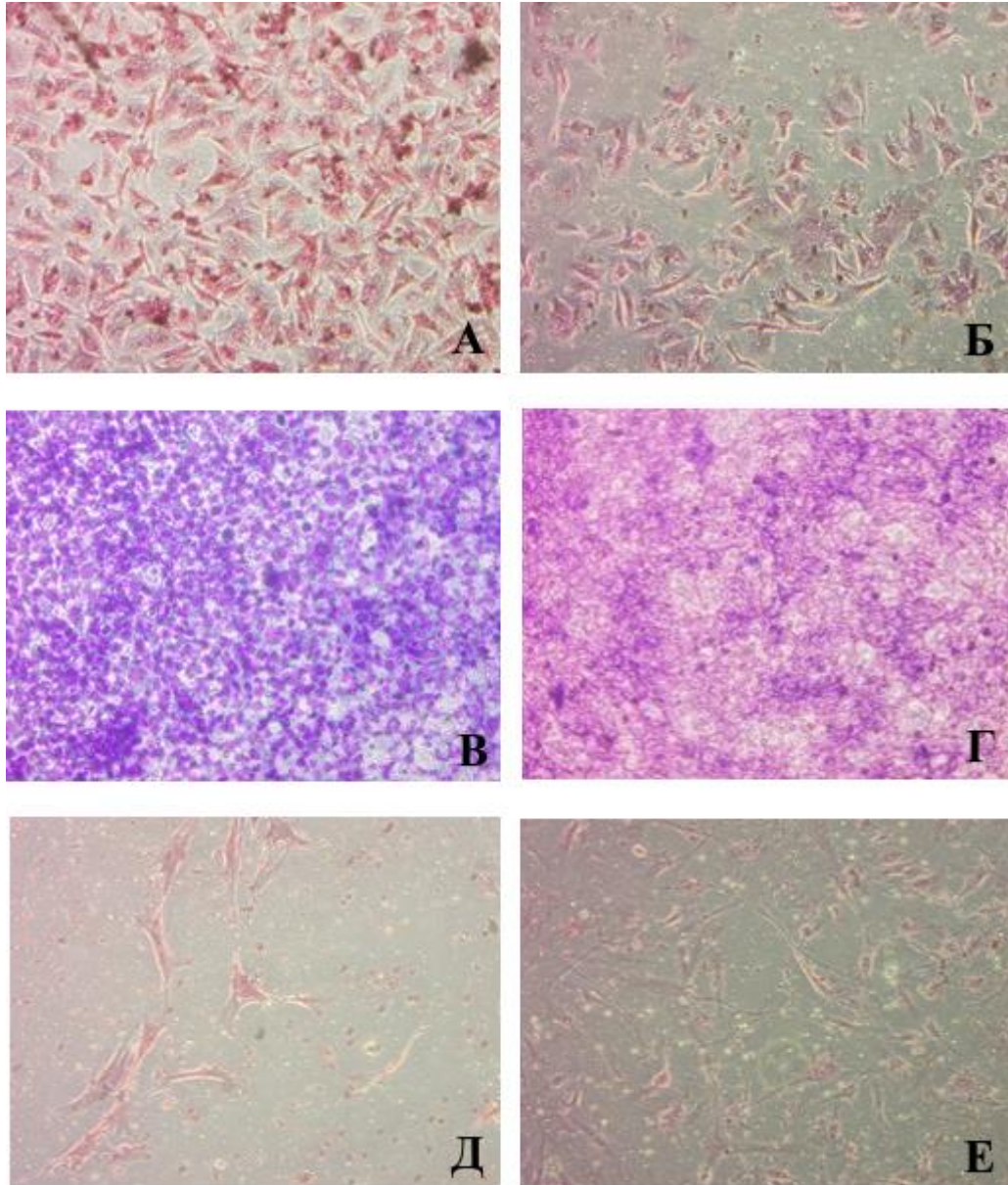


Рисунок 62 А–Е – Цитологические препараты опухолевых клеток, полученные в процессе миграции и инвазии с использованием технологии культивирования на пористой мембране с/без матригеля в течение 48 часов:

А, Б – культура МК #686, 31 пассаж, ИР 51,25%;

В, Г – культура МК #520, 106 пассаж, ИР 72,92%;

Д, Е – культура рабдомиосаркомы #862, 12 пассаж, ИР 17,34%.

А, В, Д – миграция клеток; Б, Г, Е – инвазия клеток.

Окраска по Гимзе, инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

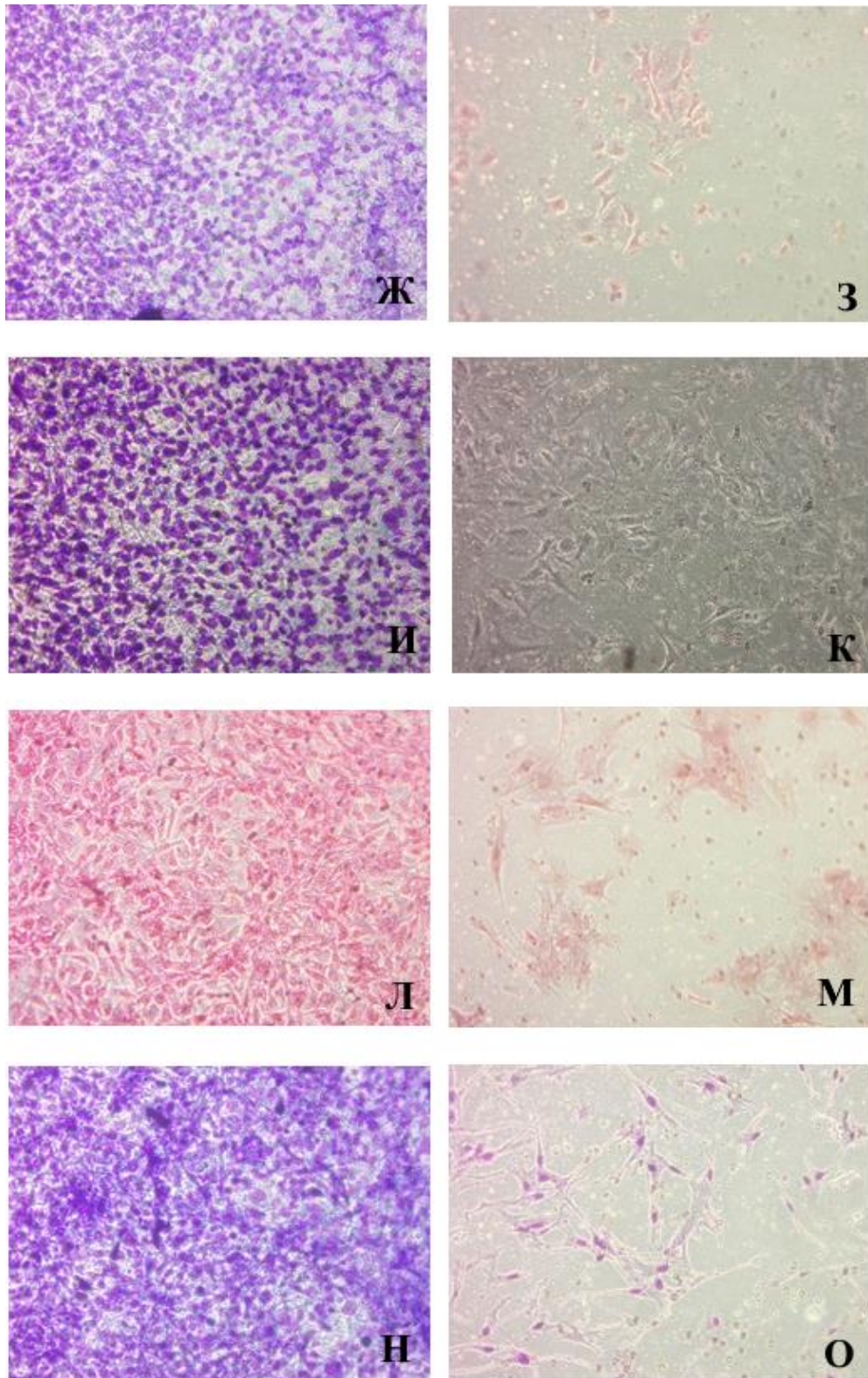


Рисунок 62 Ж–О – Цитологические препараты опухолевых клеток, полученные в процессе миграции и инвазии с использованием технологии культивирования на пористой мембране с/без матригеля в течение 48 часов:

**Ж, З** – клеточная культура КРР #485, 56 пассаж, ИР 5,16%; **И, К** – культура МК #860, 20 пассаж, ИР 16,23%; **Л, М** – культура дерматофибросаркомы #705, 10 пассаж, ИР 1,96%; **Н, О** – культура рака почки #584, 35 пассаж, ИР 74,67%. **Ж, И, Л, Н** – миграция клеток. **З, К, М, О** – инвазия клеток. Окраска по Гимзе, инвертированный микроскоп, ув.  $\times 100$

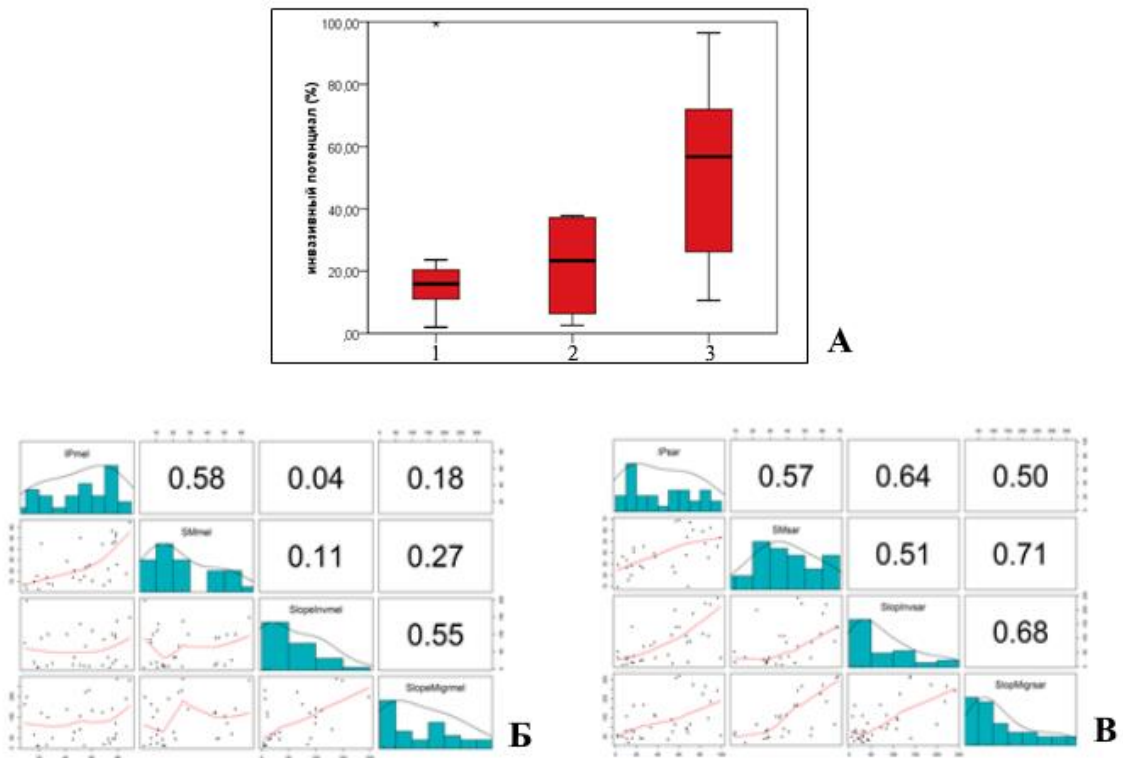


Рисунок 63 – Графическое изображение статистических закономерностей, связанных с процессами миграции и инвазии опухолевых клеток:

- А** – различия инвазивного потенциала в зависимости от источника происхождения культивируемых клеток СМТ/ОС (1 – первичная опухоль, 2 – рецидив, 3 – метастаз);
- Б** – корреляция между инвазивным потенциалом и скоростью миграции клеток МК;
- В** – корреляция между инвазивным потенциалом и скоростью миграции клеток СМТ/ОС

В нашей работе клетки СМТ/ОС демонстрировали более высокую MS и более высокий  $Slope_{Inv}$  по сравнению с культивируемыми клетками МК. Точечные измерения, которые удалось провести в отношении клеток МК, РП, КРР и СМТ и ОС также показали, что СМТ/СО характеризуются более высокими инвазивными способностями. Это гетерогенная группа злокачественных опухолей, происходящих из трансформированных клеток мезенхимального происхождения, которые характеризуются агрессивным течением и метастатическими процессами, затрагивающими жизненно важные органы. Недавно стало очевидно, что инвазия и метастазирование сарком ассоциированы с разнообразными стимулами опухолевого микроокружения, связанными с ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса, модуляцией жесткости клеточного цитоскелета, взаимодействием клеток с матриксом, влиянием многих сигнальных факторов и пространственных молекулярных градиентов [765]. В то же время вероятно, метастатический потенциал злокачественных клеток генетически детерминирован, на что указывают статистически значимые результаты по различию IP, определяемого в экспериментальных условиях *in vitro* для образцов СМТ/ОС, полученных из первичного

опухолевого очага, рецидива и метастатических образований, при этом наиболее высоким инвазивным потенциалом характеризовались именно метастатические клетки.

Известно, что хемокины и факторы роста являются ключевыми факторами опухолевой инвазии и облегчают интра- и экстравазацию малигнизированных клеток, инициируя образование метастазов. Опухолевые клетки продуцируют множество хемоаттрактантов для макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток, которые, в свою очередь, продуцируют вещества, стимулирующие миграцию злокачественных клеток [766].

Мы провели анализ корреляционных связей между параметрами миграции и инвазии клеток солидных опухолей человека и продукцией ими иммуносупрессивных факторов, факторов, ассоциированных с метастазированием, а также экспрессией хемокиновых рецепторов, который позволил установить прямую корреляцию высокой силы между MS и количеством клеток МК, несущих рецепторы CCR10 ( $\rho=0,682$ ,  $p=0,007$ ), а также продукцией PLGF ( $\rho=0,772$ ,  $p=0,009$ ) (рис. 64 А).

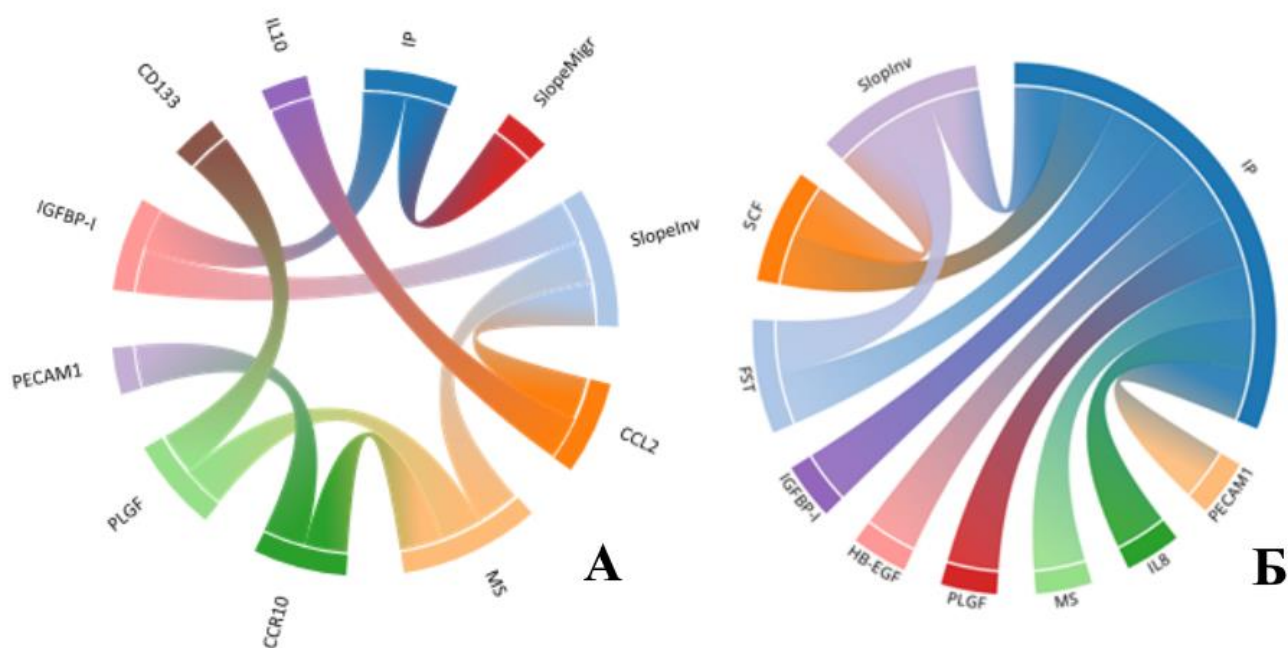


Рисунок 64 – Схематическое изображение выявленных корреляционных связей между параметрами миграционных, инвазивных свойств культивируемых клеток солидных опухолей человека и количественным содержанием секретируемых опухолевыми клетками активных молекул:

А – культивируемые клетки МК; Б – культивируемые клетки СМТ/ОС.

IP – инвазивный потенциал, MS – скорость миграции опухолевых клеток, Slope<sub>Inv</sub> – параметр, отражающий скорость инвазии

Скорость инвазии клеток МК, определяемая Slope<sub>Inv</sub>, коррелировала с MS ( $\rho=0,541$ ,  $p=0,002$ ), продукцией IGFBP ( $\rho=0,717$ ,  $p=0,03$ ). Обратная корреляция средней силы



наблюдалась для  $Slope_{Inv}$  и продукции хемокина CCL2 ( $\rho=-0,550$ ,  $p=0,018$ ). Кроме того, процентное содержание CCR10<sup>+</sup>-клеток было ассоциировано с продукцией PECAM-1 ( $\rho=0,782$ ,  $p=0,004$ ), а продукция PLGF оказалась связана с количеством CD133<sup>+</sup>-клеток ( $\rho=0,705$ ,  $p=0,023$ ). Количественное содержание CCL2, определяемое в супернатантах клеточных культур МК, коррелировало с продукцией клетками МК иммуносупрессивного фактора IL-10 ( $\rho=0,665$ ,  $p=0,029$ ). )

IP клеток CMT/OC коррелировал с MS, определяемой по скорости зарастания «экспериментальной раны» ( $\rho=0,600$ ,  $p=0,000$ ), с  $Slope_{Inv}$  ( $\rho=0,588$ ,  $p=0,000$ ) и  $Slope_{Migr}$ , скоростью миграции, определяемой с помощью прибора xCelligence ( $\rho=0,532$ ,  $p=0,001$ ) (см. рис. 64 Б). Для клеток CMT/OC обнаружили также положительную корреляцию высокой силы между IP и продукцией факторов HB-EGF ( $\rho=0,643$ ,  $p=0,010$ ), IGFBP-I ( $\rho=0,857$ ,  $p=0,014$ ), PLGF ( $\rho=0,786$ ,  $p=0,036$ ), PECAM-1 ( $\rho=0,882$ ,  $p=0,000$ ), FST ( $\rho=0,685$ ,  $p=0,014$ ), IL-8 ( $\rho=0,733$ ,  $p=0,025$ ) и SCF ( $\rho=0,883$ ,  $p=0,002$ ).  $Slope_{Inv}$  коррелировал с количественным содержанием FST в супернатантах культивируемых клеток CMT/CO ( $\rho=0,678$ ,  $p=0,015$ ) и SCF ( $\rho=0,767$ ,  $p=0,016$ ). Выявленные статистические закономерности указывают на наличие сложных реципрокных коррелятивных взаимодействий, позволяющих опухолевым клеткам реализовывать свой инвазивный и метастатический потенциал.

Согласно данным измерения электрического импеданса на приборе xCelligence, в большинстве случаев наблюдали «скачкообразный переход» малигнизированных клеток через поры мембраны (миграция) и через матригель (инвазия) (рис. 65 А1, Б1, В1, Г1). В диапазоне времени 20–40 часов большая часть клеток перемещалась через пористую мембрану и распластывалась на ее обратной поверхности, покрытой электродами, что нашло выражение в резком, скачкообразном изменении CI, который в дальнейшем практически не менялся с течением времени. По данным измерений  $Slope$  в трех временных периодах (5–20 ч, 20–40 ч, 40–48 ч), быстрое массовое перемещение клеток соответствовало значительному увеличению этого параметра (рис. 65 А2, Б2, В2, Г2).

Среди культур клеток солидных опухолей, исследованных на предмет экспрессии РТА, только четыре культуры CMT/OC были негативны и исключены из поиска возможных корреляционных связей между экспрессией РТА и параметрами миграции и инвазии культивируемых малигнизированных клеток. В случае МК была обнаружена положительная корреляция средней силы между количественным выражением интенсивности экспрессии гена *PRAME* и величиной  $Slope_{Migr}$  ( $r=0,485$ ,  $p=0,048$ ), а также обратная корреляция средней силы между экспрессией гена *PASD1* и  $Slope_{Inv}$  ( $r=-0,486$ ,  $p=0,048$ ). Для клеток CMT/OC была обнаружена взаимосвязь между интенсивностью экспрессии *SSX1* и  $Slope_{Inv}$  ( $r=0,469$ ,  $p=0,043$ ).

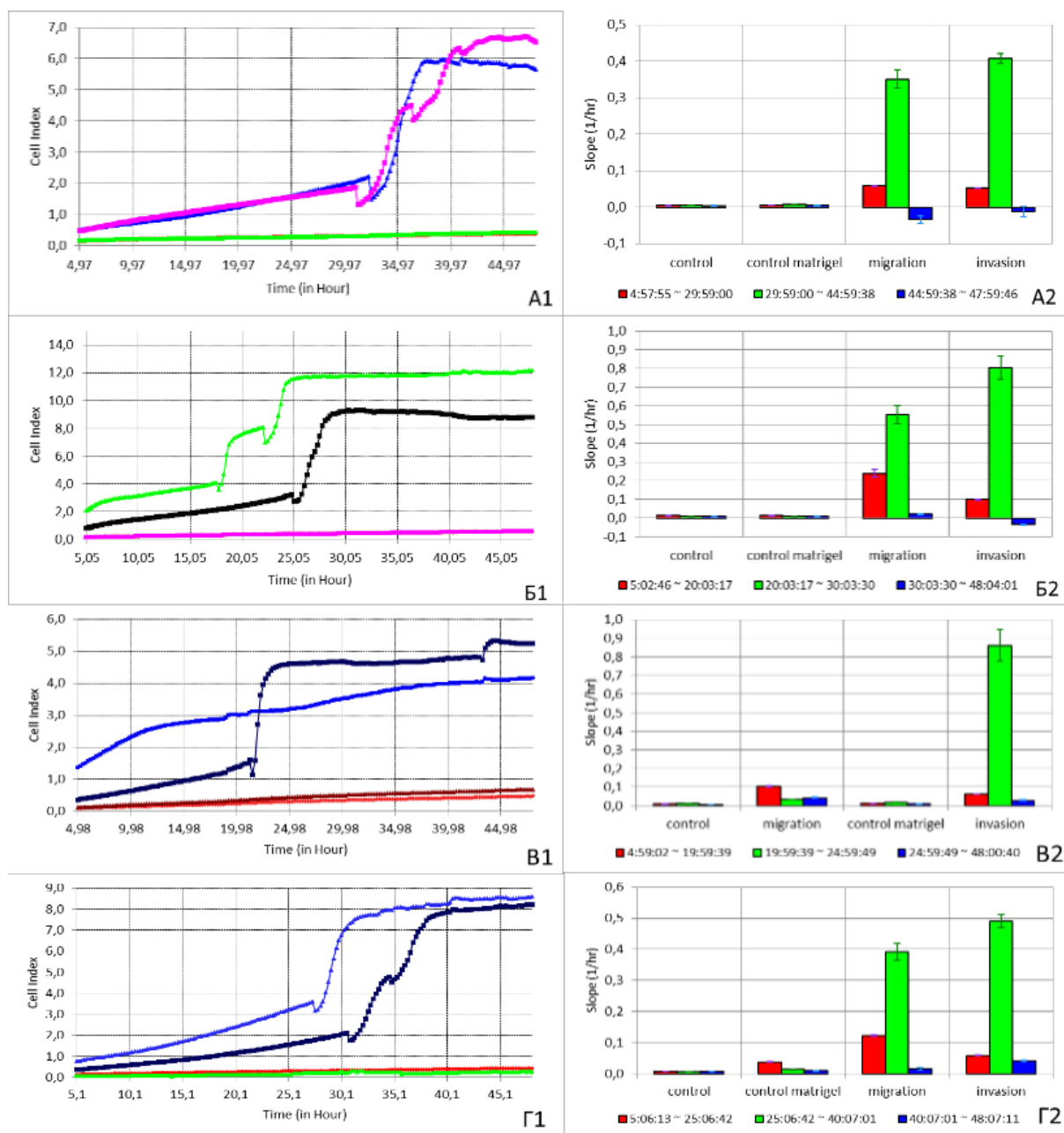


Рисунок 65 – Графическое изображение динамики CI и Slope в процессе миграции и инвазии культивируемых клеток солидных опухолей:

**A1, A2** – клеточная культура МК #283, 40 пассаж; **B1, B2** – клеточная культура рабдомиосаркомы #919, 10 пассаж; **B1, B2** – клеточная культура КРР #485, 30 пассаж; **Г1, Г2** – клеточная культура леймиосаркомы #699, 20 пассаж

При изучении методом проточной цитометрии состава популяции культивируемых клеток солидных опухолей человека, для которых были определены параметры миграции и инвазии, было обнаружено, что 65,3% (17 из 26) клеточных культур МК и 72,7% (8 из 11) СМТ/ОС распались по размеру клеток и их гранулярности на две субпопуляции, которые различались по пролиферативной активности (Ki-67), характеру экспрессии маркеров стволовых клеток CD133, CD338, хемокиновых рецепторов CCR7, CCR10 и нейропилина-1 (Nrp-1) (CD304) (рис. 66).

При этом, в целом, наблюдали статистически значимые различия между выявленными субпопуляциями в количестве CD133<sup>+</sup>-, CCR10<sup>+</sup>-, CCR7<sup>+</sup>-клеток и в количестве клеток, позитивных по Ki-67 ( $p < 0,05$ ). Количество опухолевых клеток, формирующих данные субпопуляции в случае СМТ/ОС, было одинаковым, но наблюдали статистически значимые различия между ними по относительному количеству CD133<sup>+</sup>-клеток ( $13,63 \pm 2,63\%$  и  $4,66 \pm 1,73\%$ , соответственно) и CCR10<sup>+</sup>-клеток ( $11,95 \pm 1,44\%$  и  $48,52 \pm 9,50\%$  соответственно,  $p < 0,05$ , согласно методу Манна–Уитни). В то же время среди клеточных культур МК можно было выделить две группы, где количественное соотношение этих субпопуляций было различным: в 64,7% (11 из 17) клеточных культур МК та популяция, которая преобладала численно (P1), имела большее количество CD133-позитивных клеток, в то время как менее численная популяция (P2) характеризовалась повышенным пролиферативным потенциалом и имела большее количество клеток, несущих хемокиновые рецепторы CCR10, CCR7, CCR4, а также молекул нейропилина-1 (Nrp-1) ( $p < 0,05$ , согласно критерию Манна–Уитни) (табл. 33). В 35,3% клеточных культур МК (6 из 17) соотношение между числом клеток в популяциях P1 и P2 было обратным, однако выявленные статистически значимые различия между популяциями сохранялись.

Интересно заметить, что в клеточной популяции двух культур МК были выявлены CCR10<sup>+</sup>-клетки, которые имели различную плотность данных рецепторов и разделялись на две субпопуляции по интенсивности флуоресценции: CCR10<sup>bright+</sup> и CCR10<sup>dim+</sup>. Дальнейшее гейтирование по субпопуляции CCR10<sup>bright+</sup> позволило обнаружить, что эта субпопуляция опухолевых клеток характеризуется более высоким содержанием CD338<sup>+</sup>- и CD304<sup>+</sup>-клеток, в то время как пролиферативный потенциал, определяемый по экспрессии Ki-67, был выше в субпопуляции CCR10<sup>dim+</sup> (рис. 67).

Таким образом, в нашем исследовании был выявлен целый спектр корреляционных связей между параметрами миграции и инвазии клеток солидных опухолей в системе *in vitro* и опухолеассоциированными факторами, способствующими иммуносупрессии, метастазированию, пролиферации малигнизированных клеток, при этом для клеток МК, СМТ/ОС этот спектр были несколько различным: MS, определенная в культурах МК, коррелировала с относительным количеством CCR10<sup>+</sup>-опухолевых клеток. Murakami T. и соавт. (2004) получили данные относительно селективности процессов формирования метастазов на животной модели, ассоциированной с экспрессией хемокиновых рецепторов CCR4, CCR7, CCR 10 [767]. Kühnelt-Leddihn L. и соавт. (2012) определили прогностические факторы, связанные с гиперэкспрессией хемокиновых рецепторов CCR7 и CCR10 при МК [768]. Обнаружено, что избыточная экспрессия этих рецепторов связана с неблагоприятным течением заболевания независимо от толщины опухоли по Бреслоу и уровня инвазии по Кларку.

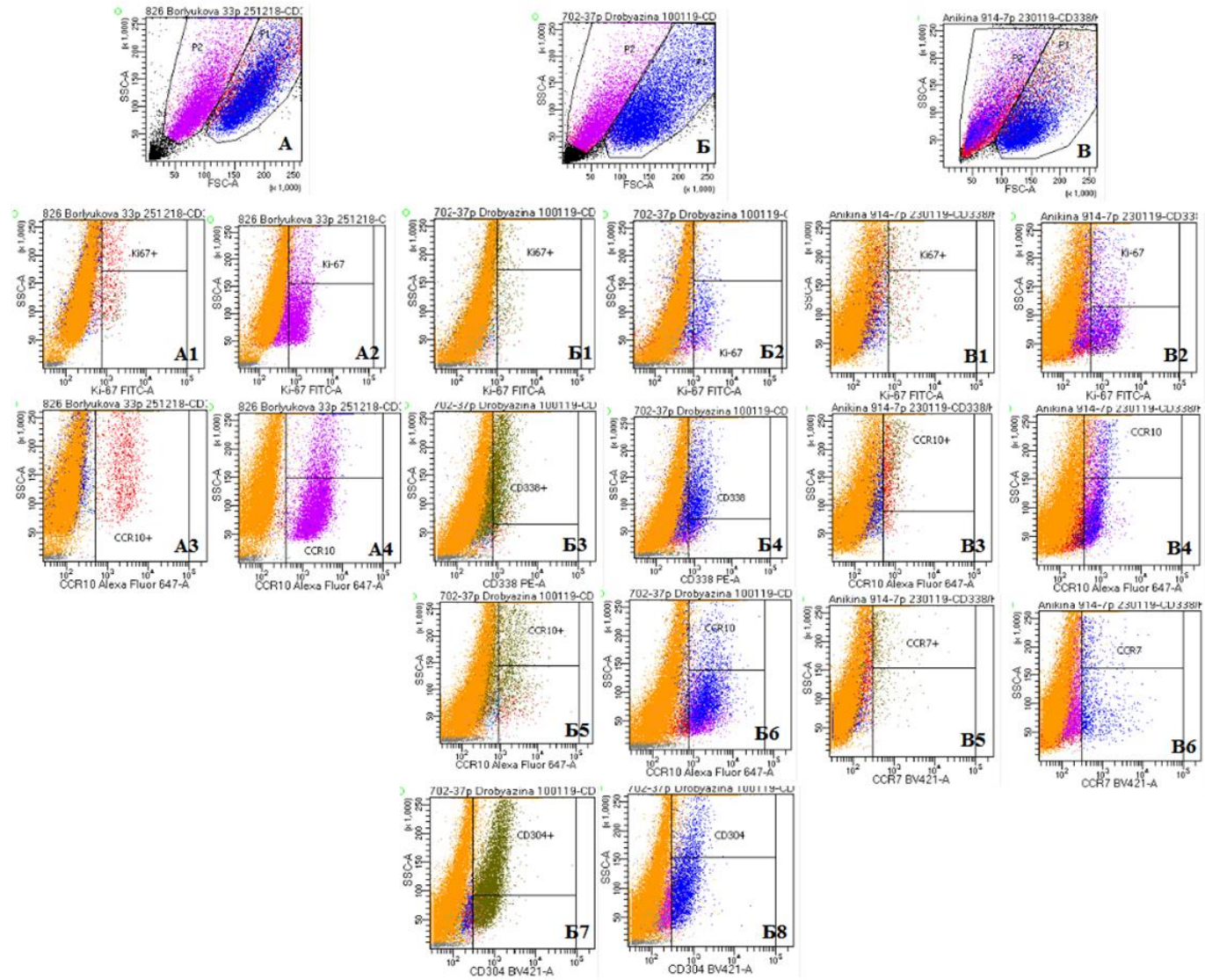


Рисунок 66 – Выявление особенностей популяции культивируемых клеток солидных опухолей методом проточной цитометрии

*Примечание к рис. 66:* **А** – две субпопуляции P1 и P2 в клеточной культуре МК #826, 30 пассаж; **А1, А2** – экспрессия Ki-67 в популяциях P1 и P2 культуры #826; **А3, А4** – экспрессия CCR10 в популяциях P1 и P2 культуры #826; **Б** – две субпопуляции P1 и P2 в клеточной культуре липосаркомы #702, 37 пассаж; **Б1, Б2** – экспрессия Ki-67 в популяциях P1 и P2 культуры #702; **Б3, Б4** – экспрессия CD338 в популяциях P1 и P2 культуры #702; **Б5, Б6** – экспрессия CCR10 в популяциях P1 и P2 культуры #702; **Б7, Б8** – экспрессия CD304 в популяциях P1 и P2 культуры #702; **В** – две субпопуляции P1 и P2 в клеточной культуре синовиальной саркомы #914, 7 пассаж; **В1, В2** – экспрессия Ki-67 в популяциях P1 и P2 культуры #914; **В3, В4** – экспрессия CCR10 в популяциях P1 и P2 культуры #914; **В5, В6** – экспрессия CCR7 в популяциях P1 и P2 культуры #914.

Таблица 33 – Анализ состава клеточных популяций в культурах МК, выявленных методом проточной цитофлуорометрии

Кол-во образцов, n (%)	Популяции	Число клеток, %	Ki-67, %	CD133, %	CD338, %	CCR10, %	CCR7, %	CCR4, %	CD304, %
11 (64,7)	P1	70,85±3,92*	12,97±3,38*	3,78±1,20*	3,69±1,98	6,93±2,16*	4,83±1,74*	0,81±0,42	3,22±1,09
	P2	20,81±3,52*	49,5±5,64*	1,05±0,30*	15,0±5,38	70,65±3,78*	24,3±4,45*	2,8±0,89	21,84±11,7
6 (35,3)	P1	18,23±2,51**	7,16±3,42**	14,68±4,22**	4,01±1,70	18,26±5,04**	3,72±1,66**	3,3±0,64**	10,38±3,44**
	P2	53,55±6,13**	33,9±5,46**	1,06±0,36**	2,13±1,56	51,88±10,00**	25,42±3,85**	16,16±2,57**	31,66±7,59**

*Примечание:* \* – p<0,05; \*\* – p<0,05 (согласно критерию Манна–Уитни).

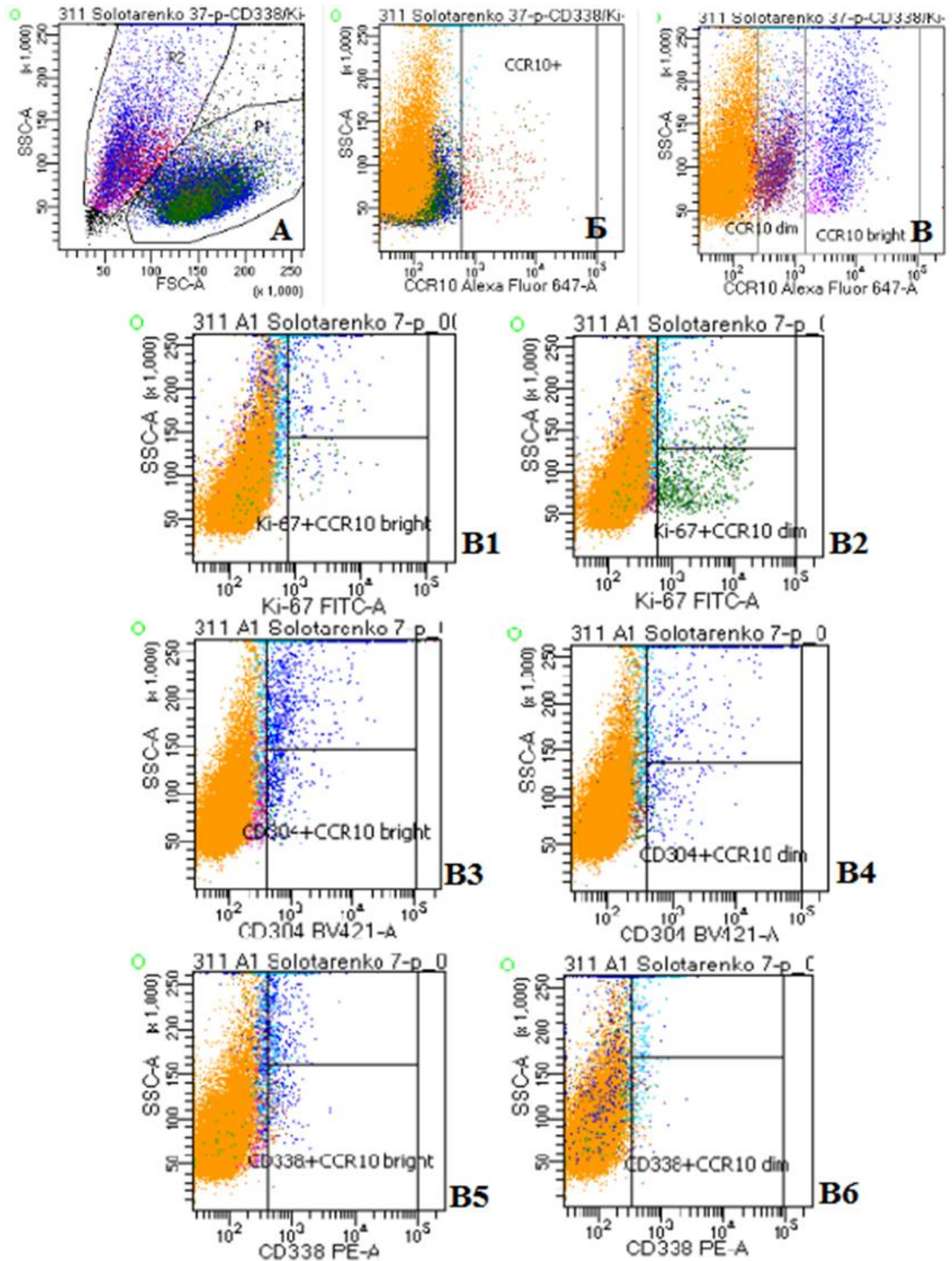


Рисунок 67 – Выявление особенностей популяции культивируемых клеток МК #311 методом проточной флуориметрии:

- А – выявление двух субпопуляций по размеру и гранулярности P1 и P2;
- Б – экспрессия CCR10 в субпопуляции P1; Б' – экспрессия CCR10 в субпопуляции P2;
- Б1, Б2 – выявление Ki-67 в субпопуляциях CCR10<sup>bright</sup> и CCR10<sup>dim</sup>;
- Б3, Б4 – выявление CD304 в субпопуляциях CCR10<sup>bright</sup> и CCR10<sup>dim</sup>;
- Б5, Б6 – выявление CD338 в субпопуляциях CCR10<sup>bright</sup> и CCR10<sup>dim</sup>

Корреляция количества клеток МК, несущих рецепторы CCR10, с продукцией ими PECAM-1, а также корреляция IP клеток СМТ и количественного содержания в их клеточных супернатантах PECAM-1, подтверждает факт участия этого фактора в прогрессии солидных опухолей, который был выявлен ранее [769].

При исследовании механизмов иммуносупрессии у больных СМТ/ОС было установлено, что клетки метастатических СМТ/ОС способны продуцировать высокие уровни хемокина CCL2, количество которого находится в прямой зависимости от содержания в периферической крови больных CCR4<sup>+</sup>-регуляторных Т-лимфоцитов [770]. В этой связи интересен факт обнаружения нами обратной корреляции между продукцией клетками МК CCL2 и Slope<sub>Inv</sub>. Можно предполагать, что опухоль представлена несколькими субпопуляциями злокачественных меланоцитов, обладающих разными потенциями, что подтверждается данными, полученными в процессе анализа культивируемых клеток МК и СМТ/ОС с помощью проточной цитофлуорометрии. Наличие среди культивируемых клеток МК и СМТ/ОС как минимум двух субпопуляций, статистически значимо различающихся по экспрессии маркера стволовых клеток CD133, маркера пролиферации Ki-67, хемокиновых рецепторов CCR10, CCR7 и нейропилина-1 (Nrp-1), позволяет предполагать наличие группы опухолевых клеток с выраженным метастатическим потенциалом и группы покоящихся злокачественных клеток, несущих «зародышевый» потенциал и формирующих иммуносупрессивное микроокружение, тем более что была обнаружена корреляция между продукцией клетками МК CCL2 и IL-10.

Недавнее исследование, предпринятое Giri J. и соавт. (2020) в отношении возможностей терапии воспалительных заболеваний с помощью мезенхимальных стволовых клеток, продемонстрировало, что хемокины CCL2 и CXCL12 взаимодействуют как гетеродимер, усиливая экспрессию IL-10 в CCR2<sup>+</sup>-макрофагах *in vitro*, приводя к их поляризации [771]. Возможно, что подобный механизм реализуется клетками МК для создания иммуносупрессивного микроокружения. Заслуживает внимания работа Ноек К.S. и соавт. (2006), которые провели полногеномный анализ экспрессии почти 100 клеточных линий МК человека и выявили две группы с очень разными профилями экспрессии генов, связанными с различными формами поведения *in vitro*: первая группа характеризовалась высокой экспрессией маркеров меланоцитарной дифференцировки и демонстрировала малоинвазивный фенотип с высокой степенью пролиферации, тогда как другая группа имела выраженную экспрессию ряда генов, ассоциированных с TGF-β, и высокоинвазивным фенотипом с низкой скоростью пролиферации [772].

В нашем исследовании содержание PLGF в надосадочной жидкости культур МК и СМТ/СО было ассоциировано с MS клеток МК и IP клеток СМТ/ОС. Как уже обсуждалось, PLGF относится к семейству сосудистого эндотелиального фактора роста и играет важную роль

в неоангиогенезе, находясь в сложном скоординированном взаимодействии с другими факторами этого семейства [296]. Song N. и соавт. (2016) показали, что избыточная экспрессия PLGF значительно увеличивала инвазивность культивируемых клеток рака яичников через активацию транскрипционного фактора ZEB2, ответственного, наряду с другими факторами, за индукцию эпителиально-мезенхимального перехода и поддержания адаптированного мезенхимального фенотипа злокачественных клеток [773].

Важно отметить, что в исследованиях ряда авторов для некоторых опухолей отмечена высокая экспрессия HB-EGF, лиганда рецептора эпидермального фактора роста, например, для клеточных культур и ткани рака яичников [774]. Было доказано, что HB-EGF играет важную роль в онкогенезе рака яичников и может служить прогностическим маркером [775]. В нашем исследовании мы обнаружили, что клетки CMT/OC, демонстрировавшие высокий IP, продуцировали значительные количества HB-EGF.

Также нами были получены данные о том, что клетки CMT/OC с гиперпродукцией FST демонстрировали высокий IP и Slope<sub>Inv</sub>. FST способен связывать димеры активина с высокой аффинностью, реализуя эндогенный селективный механизм ингибирования передачи сигналов активина [776]. Его роль, как и активина, в онкогенезе и метастазировании остается до конца нерешенной [777]. Однако среди противоречивых данных есть сведения, указывающие на прогностическую роль секреции FST при злокачественных новообразованиях. Так, повышенный уровень этого белка в сыворотке крови пациентов с раком предстательной железы коррелировал с наличием костных метастазов и увеличенным уровнем PSA, что позволило исследователям предложить фоллистатин как терапевтическую мишень при этом заболевании [778]. При раке молочной железы Zabkiewicz C. и соавт. (2017) выявили противоположную тенденцию: сверхэкспрессия FST *in vitro* снижала инвазивные свойства клеток РМЖ, и клинически наблюдали обратную корреляцию между уровнем FST в периферической крови пациентов и общей выживаемостью [779]. Вероятно, регуляторный характер функционирования молекулярной системы FST/активин зависит от типа малигнизированных клеток и от структуры опухолевого микроокружения [717; 779].

Представляет интерес обнаруженная нами корреляция между Slope<sub>Inv</sub> клеток CMT/CO и продукцией ими фактора стволовых клеток SCF, который является мультифункциональным цитокином, участвующим в прогрессировании опухоли [780]. Было продемонстрировано, что система SCF/c-kit выполняет важные функции в неоангиогенезе, пролиферации и инвазии злокачественных клеток [781]. Активация сигнального пути SCF/c-kit приводила к усилению пролиферации, миграции, эпителиально-мезенхимального перехода в культивируемых клетках KPP [782]. Gao C. и соавт. (2015) показали, что уровень SCF коррелировал со стадией метастазирования (pTNM) при раке поджелудочной железы [783]. Группа пациентов с высокой



экспрессией SCF имела значительно более низкие показатели выживаемости по сравнению с больными, которые имели низкую экспрессию SCF.

Анализ экспрессии РТГ продемонстрировал, что для культивируемых клеток МК существует положительная корреляция между активностью гена *PRAME* и величиной  $Slope_{Migr}$  и обратная корреляция между экспрессией гена *PASDI* и  $Slope_{Inv}$ . Для клеток СМТ/ОС была обнаружена взаимосвязь между интенсивностью экспрессии *SSX1* и  $Slope_{Inv}$ . Эти данные согласуются с имеющим место представлением о способности малигнизированных клеток реализовать программы функционирования аномально экспрессируемых генов для формирования инвазивного фенотипа. В частности, показано, что такие РТГ, как *SPANX-A/C/D* и *CTAG2*, регулируют различные аспекты инвазивного поведения клеток рака молочной железы [140]. Wang D. и соавт. (2016) обнаружили, что активация гена *MAGEA1* ассоциирована с пролиферацией, миграцией и метастазированием клеток МК [784].

Недавние исследования продемонстрировали, что в 90% синовиальных сарком функционируют слитые гены *SS18-SSX1/SSX2*, продукты которых участвуют в регуляции клеточного роста и пролиферации, ремоделирования хроматина, способствуя онкогенезу [785]. Ху Z.S. и соавт. (2016) показали, что сверхэкспрессия *PASDI* активировала транскрипционный фактор STAT3, регуляция функционирования которого тесно связана с такими физиологическими процессами, как пролиферация клеток, выживание и дифференцировка, и потенцировала IL-6-индуцированную активацию STAT3, тогда как нокдаун по *PASDI* давал противоположный эффект [786]. Al-Khadairi G. и соавт. (2019) обнаружили, что *PRAME* индуцирует миграцию и инвазию клеток трижды негативного РМЖ через изменение экспрессии основных маркеров эпителиально-мезенхимального перехода E-кадгерина, N-кадгерина, виментина и ZEB1 [604].

Инвазивный потенциал клеток солидных опухолей человека ассоциирован с экспрессией спектра факторов, обеспечивающих их подвижность, а также воздействующих на другие клеточные компоненты опухолевого микроокружения, в том числе на клетки иммунной системы. Биологически «агрессивный» фенотип культивируемых клеток МК и СМТ/ОС связан с экспрессией раково-тестикулярных генов *PRAME*, *PASDI*, *SSX1*, продукцией HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8, которые возможно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

### **3.5. Экспериментальное моделирование влияния супрессивного опухолевого микроокружения на функции дендритных клеток**

Клеточная организация опухолевого микроокружения представляет собой сложную живую систему с комплексом различных стимулов, которые влияют на все аспекты биологии ДК и, таким образом, управляют их функционированием и жизнеспособностью [787]. ДК – это

специализированная группа антигенпрезентирующих клеток с высокой функциональной пластичностью, которые способны проявлять свой иммуностимулирующий или иммунодепрессивный потенциал, в зависимости от последовательности и комбинации стимулов микроокружения, определяющих их дифференциацию, созревание, активацию и поляризацию. Незрелые или созревающие ДК могут обнаруживаться в различных нелимфоидных тканях и органах, но после активации они мигрируют к лимфоидным тканям, чтобы взаимодействовать с Т-лимфоцитами и индуцировать иммунные реакции [788]. Для незрелых ДК характерен низкий уровень экспрессии антигенов МНС и костимулирующих молекул, они не способны эффективно активировать Т-лимфоциты, хотя обладают способностью к эндоцитозу в высокой степени [191; 788]. Активация ДК под воздействием различных стимулов созревания связана с развитием повышенной экспрессии разнообразных внутриклеточных и поверхностных молекул, обеспечивающих миграцию ДК к вторичным лимфоидным тканям и взаимодействие с Т-лимфоцитами. Однако активация и созревание ДК зависят от их микроокружения и могут быть заблокированы специфическими факторами или их комбинациями, приводящими к формированию субпопуляций ДК с толерогенной и иммунодепрессивной активностью [789].

Экспериментальные исследования Hargadon К.М. и соавт. (2016) продемонстрировали на модели меланомы мыши влияние факторов, продуцируемых злокачественными меланоцитами, на созревание и последующую активацию дифференцированных ДК селезенки и легких [790]. Рядом исследователей установлены факты нарушений биофизических свойств ДК, в частности, их способности к изменению формы клетки, под влиянием иммуносупрессивных молекул, экспрессируемых опухолью, таких как IL-10, TGF- $\beta_1$ , VEGF [452; 453; 791].

Использование противоопухолевых дендритно-клеточных вакцин базируется на способности ДК, специфически активированных *in vitro*, мигрировать для презентации антигенов Т-лимфоцитам, поэтому изучение компонентов опухолевого микроокружения, формирующих системную и локальную иммунодепрессию в организме больного, способных модифицировать свойства ДК и, таким образом, снижать клиническую эффективность иммунотерапии, представляется весьма актуальным.

Для изучения особенностей подвижности созревающих ДК под влиянием продуктов, синтезируемых опухолевыми клетками, нами была создана система *in vitro* кокультивирования с клеточными культурами МК, полученными от разных больных, позволяющая оценивать скорость, траекторию и направление движения ДК. В каждом поле зрения фиксировали не менее 10 ДК, за которыми вели наблюдение с помощью автоматической системы контроля живых клеток Cell-IQ. Характер движения ДК определяли по пройденной ими дистанции за период наблюдения, по длине траектории, скорости прохождения траектории в выбранный

период времени и по углу движения клеточной популяции, определяющему общее направление движения ДК (табл. 34). Наблюдали большую вариабельность всех параметров: средняя скорость прохождения траектории была минимальной при кокультивировании с культурой #311 ( $16,1 \pm 1,05$  мкм/ч) и максимальной в присутствии культуры #226 ( $88,3 \pm 1,79$  мкм/ч). Угол движения популяции ДК, кокультивируемых с клетками меланомы #226 был наименьшим и составил  $51,6 \pm 3,45$  °, в то время как в присутствии клеток меланомы #311 этот показатель определялся как  $343,6 \pm 3,35$  °. Для того чтобы выявить факторы, имеющие наибольшее воздействие на миграцию ДК, был проведен анализ зависимости средней скорости движения ДК от ИСФ, обнаруживаемых в супернатантах культур малигнизированных клеток. Было выявлено наличие обратной корреляции высокой силы между этим показателем подвижности ДК и количеством ИСФ в супернатантах культур МК, а именно для TGF- $\beta_1$ , IL-10, VEGF-A, EGF, FGF, HGF, sFASL ( $p < 0,01$ ) (табл. 35). Под влиянием ИСФ менялась не только скорость движения ДК, но и характер движения, которое становилось более хаотичным и разнонаправленным. Чтобы проверить гипотезу возможной зависимости направленности движения ДК от выраженности экспрессии дифференцировочных ОАА и РТА на опухолевых клетках, был проведен корреляционный анализ, который выявил наличие обратной зависимости высокой силы угла движения популяции ДК от экспрессии таких антигенов, как Melan A, тирозиназа, семейств MAGE, BAGE, NY-ESO-1 ( $p > 0,01$ ) (табл. 36).

Для того чтобы выявить более полно характер воздействия отдельных ИСФ, синтезируемых опухолью, на подвижность ДК, в изучаемую систему дополнительно вводили определенные концентрации IL-10 (1 нг/мл), TGF- $\beta_1$  (10 нг/мл), VEGF-A (50 нг/мл). Результаты анализа движения ДК в различных условиях в системе кокультивирования с клетками МК #894 представлены в таблице 37. Наибольшим воздействием обладал IL-10, в присутствии которого средняя скорость движения ДК снизилась почти в три раза (с  $30,10 \pm 2,23$  до  $10,45 \pm 0,52$  мкм/ч). Также в присутствии ИСФ значительно сокращались дистанция между началом и концом фиксации движения и длина пройденной траектории, но не было выявлено влияние на угол движения клеточной популяции, так как не было обнаружено статистически значимых различий этого параметра под воздействием изучаемых ИСФ (см. табл. 37; рис. 68). Тем не менее метод центрирования траекторий ДК позволил определить более точно направленность движения популяций ДК и выявить определенные закономерности: в контрольных образцах ДК мигрировали преимущественно в сторону популяции клеток МК, в присутствии TGF- $\beta_1$  и VEGF-A траектории ДК сокращались, но общее направление движения сохранялось (рис. 69 Б, Г; 70 Б, Г). Под воздействием IL-10 дистанция, пройденная ДК, была минимальной, и процентное распределение клеток по протяженности траектории показало снижение двигательной активности ДК и нарастание хаотичности движения (рис. 69 В, 70 В).

Таблица 34 – Параметры траекторий движения незрелых ДК, кокультивируемых с клетками МК,  
полученных от разных больных

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

Таблица 35 – Зависимость средней скорости движения незрелых ДК от продукции иммуносупрессивных факторов культивируемыми клетками МК

# культуры	TGF- $\beta_1$ , нг/мл	IL-10, пг/мл	VEGF-A, нг/мл	IL-6, пг/мл	IL-8, нг/мл	Follistatin, нг/мл	PLGF, пг/мл	Angiopoetin, пг/мл	EGF, пг/мл	SCF, пг/мл	
226	0,73	1,53	0,79	0	0,37	0,24	116,90	0	0,43	5,02	
283	23,15	48,15	5,59	8,04	0,94	2,09	632,41	538,89	419,56	2,65	
311	19,84	40,70	10,05	17233,50	0,92	3,85	242,98	683,42	358,38	64,70	
643	5,42	16,06	3,60	29,56	20,28	36,39	263,21	541,99	9,7	18,40	
686	3,89	1,51	0,84	32,48	0,84	17,38	5266,42	12367,14	22,26	24,19	
694	3,00	10,08	4,55	109,02	11,70	0,49	278,78	4999,91	191,00	22,32	
685	2,43	36,67	12,70	89,86	11,01	5,17	46,53	16097,05	2,11	9,63	
894	4,57	12,25	1,50	4,45	23,07	0,11	310,30	5943,86	134,00	11,87	
Критерий Спирмана, rho	-0,857	-0,857	-0,833	-0,262	-0,381	-0,143	-0,095	-0,429	-0,714	-0,095	
p	0,01	0,007	0,037	0,531	0,352	0,736	0,823	0,289	0,047	0,823	
# культуры	Endoglin, пг/мл	HB-EGF, пг/мл	IGFBP-1, пг/мл	PAI-1, пг/мл	uPA, пг/мл	FGF, пг/мл	HGF, пг/мл	Leptin, пг/мл	Osteoponin, нг/мл	Prolactin, пг/мл	sFASL, пг/мл
226	0	0	0	39,16	0	40	52,05	34,17	0,47	15,75	0
283	3,00	0	18,30	4228,8	0,13	84,52	118,85	16,64	18,99	24,91	221,5
311	8,50	0	5,80	66,11	0	138,62	1353,74	296,95	17,22	393,69	368,93
643	10,70	262,56	0	1606,96	0	112,62	506,36	55,00	0,38	4,33	0
686	198,42	135,61	62,82	7096,80	54,42	60,75	38,44	104,97	1,82	59,36	3,5
694	17,27	214,45	4,34	4469,30	0	42,47	38,19	24,70	14,24	13,00	4,34
685	15,68	79,20	16,39	5187,17	5,41	26,8	13,48	30,66	3,95	26,28	3,54
894	50,29	20,62	4627,00	5206,00	9433,00	91,52	73,35	21,65	1,13	0	63,29
Критерий Спирмана, rho	0,167	0,317	-0,287	0,119	-0,038	-0,738	-0,690	0,119	-0,500	-0,095	-0,790
p	0,693	0,444	0,49	0,779	0,929	0,037	0,05	0,779	0,207	0,823	0,02

Таблица 36 – Зависимость направления движения незрелых ДК от экспрессии ОАА культивируемыми клетками МК  
(% антиген-позитивных клеток, согласно данным метода проточной цитофлуорометрии)

# культуры	Melan A	Tyros	S100	gp100	MITF	MAGE	BAGE	GAGE	NY-ESO1
226	49,6	97,6	68,7	99,6	21,7	89,7	94,8	99,4	79,1
283	2,5	8,7	1,2	12,6	0	0,6	0,4	1,4	6,3
311	0	28,0	5,2	87,6	49,5	18,1	4,4	92,2	11,1
643	76,8	66,6	1,0	94,1	66,5	60,5	74,5	95,8	61,7
685	40,4	75,6	0	61,6	40,2	30,3	52,5	8,8	47,9
686	11,9	60,9	3,1	77,2	73,1	18,2	24,5	48,6	67,8
694	23,0	0	59,3	90,6	5,9	0	6,8	13,8	0
894	0,7	0	5,8	99,9	0	0	0	7,6	0
Критерий Спирмана, rho	-0,810	-0,707	-0,024	-0,405	-0,383	-0,755	-0,810	-0,571	-0,755
p	0,015	0,050	0,955	0,320	0,349	0,031	0,015	0,139	0,031

Таблица 37 – Параметры траекторий движения незрелых ДК, кокультивируемых с клетками МК #894, оцениваемых в различных условиях

Клеточная система	Время наблюдения, ч	Кол-во полей зрения, n	Кол-во тестируемых клеток, min-max	Пройденная дистанция, мкм	Длина траектории, мкм	Средняя скорость прохождения траектории, мкм/ч	Угол движения клеточной популяции, °
Контроль, без воздействия	47	8	12–15	291,75±31,07	1423,25±105,21	30,10±2,23	324,50±18,30
TGF-β <sub>1</sub> (10 нг/мл)	47	8	15–18	136,0±7,32	676,0±20,46	14,32±0,42	234,0±3,85
p				0,042	0,009	0,009	0,051
IL-10 (1 нг/мл)	47	8	11–15	44,45±1,84	224,25±10,76	10,45±0,52	254,25±11,01
p				0,004	0,001	0,002	0,066
VEGF (50 нг/мл)	47	6	10–17	176,5±32,54	881,4±88,90	18,7±1,89	289,1±35,55
p				0,068	0,005	0,006	0,067

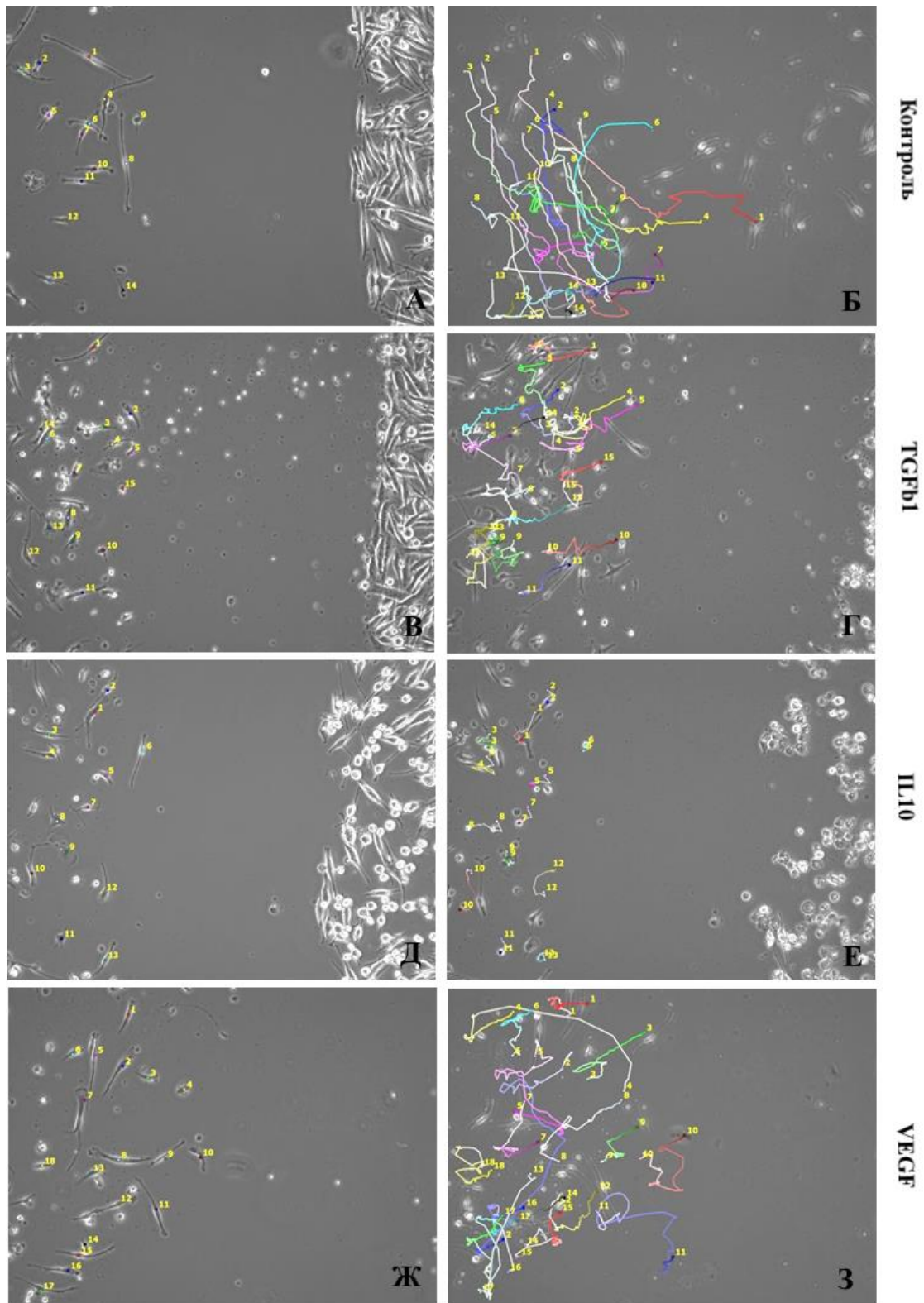


Рисунок 68 – Анализ изображений траекторий движения незрелых ДК в присутствии клеток МК #894:

**А** – начало фиксации движения ДК; **Б** – конец фиксации движения ДК в стандартных условиях культивирования; **В** – начало фиксации движения ДК; **Г** – конец фиксации движения ДК в присутствии  $TGF-\beta_1$  (10 нг/мл); **Д** – начало фиксации движения ДК; **Е** – конец фиксации движения ДК в присутствии IL-10 (1 нг/мл); **Ж** – начало фиксации движения ДК; **З** – конец фиксации движения ДК в присутствии VEGF (50 нг/мл). Период наблюдения 47 часов

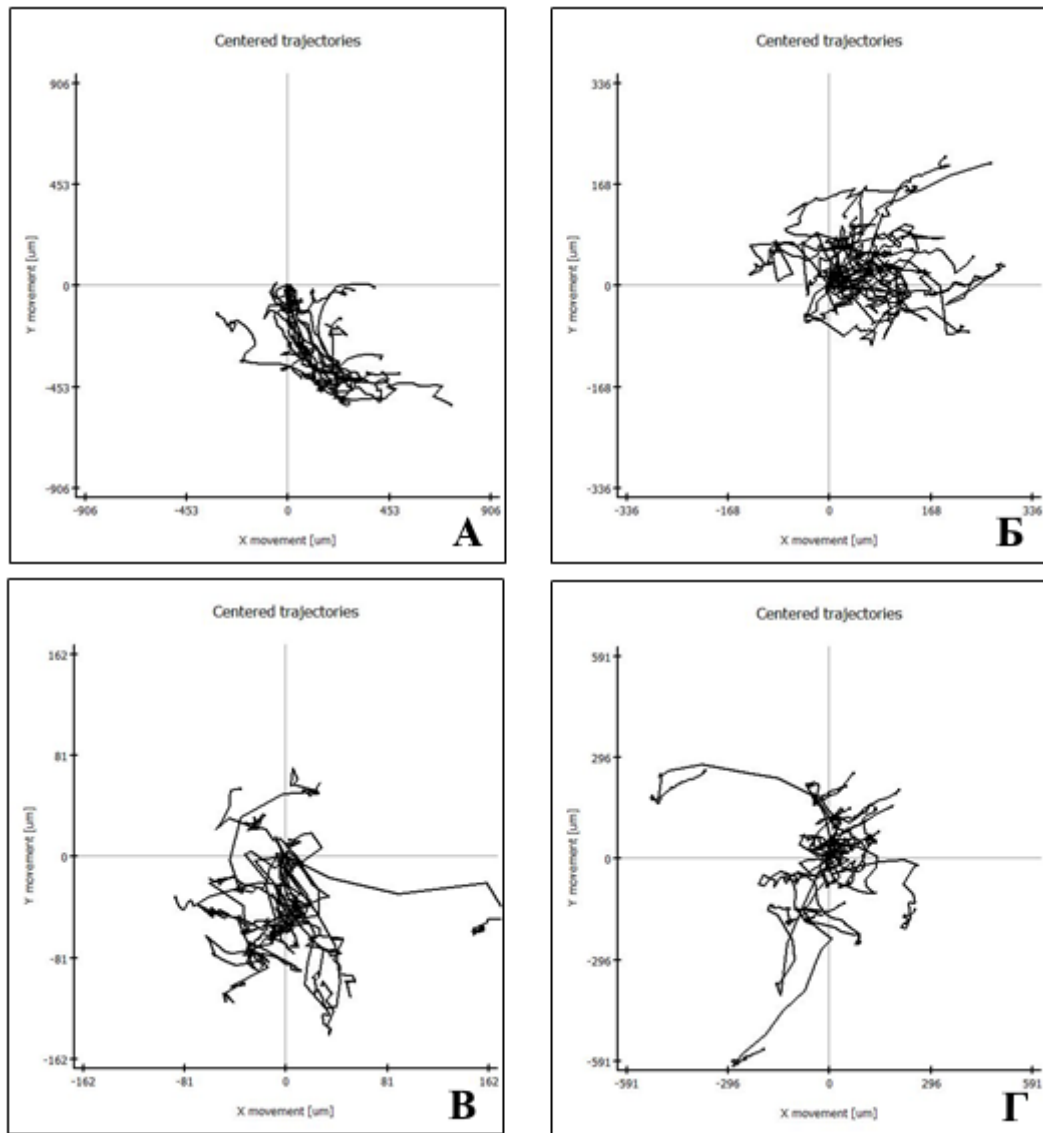


Рисунок 69 – Центрирование траекторий движения незрелых ДК в присутствии клеток МК # 894:

**А** – в стандартных условиях; **Б** – в присутствии TGF- $\beta_1$  (10 нг/мл);  
**В** – в присутствии IL-10 (1 нг/мл); **Г** – в присутствии VEGF (50 нг/мл)

Оценка характера движения ДК с учетом количества клеток, преодолевших данную дистанцию в определенный момент времени, позволила установить, что все изучаемые ИСФ оказывали сходное ингибирующее воздействие на подвижность ДК, причем эффект IL-10 был максимальным (рис. 71).

ДК как высокоспециализированные антигенпрезентирующие клетки являются эффективными индукторами реакций Т-лимфоцитов и традиционно рассматриваются как решающий компонент противоопухолевого иммунного ответа [792; 793]. ДК обнаруживаются в ткани опухоли при самых разнообразных нозологиях, таких как рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, легкого, желудка, мочевого пузыря.



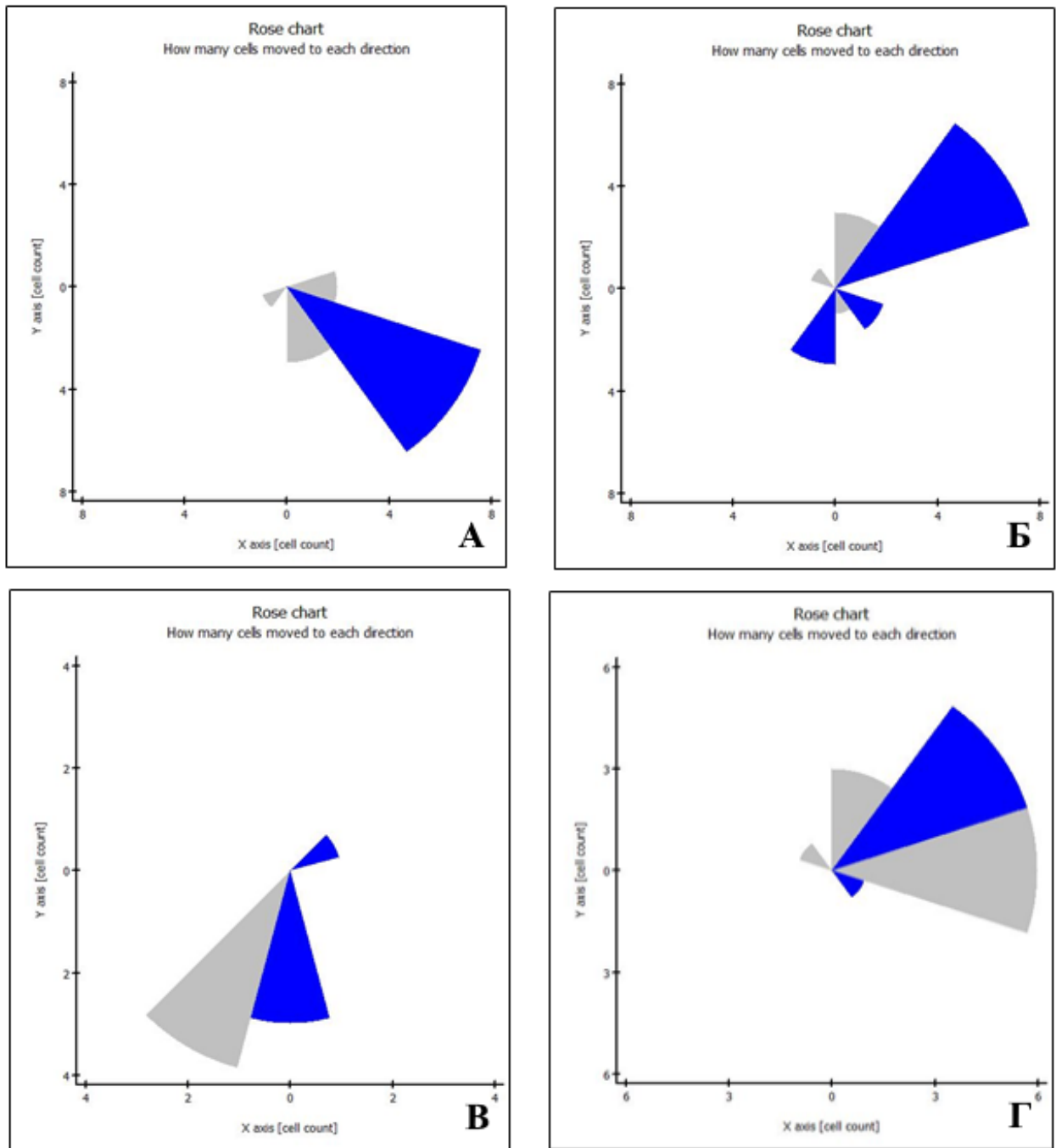


Рисунок 70 – Графическое отображение направлений движения незрелых ДК и количественной оценки преимущественного направления движения в системе кокультивирования с клетками меланомы кожи #894:  
**А** – в стандартных условиях; **Б** – в присутствии TGF- $\beta_1$  (10 нг/мл);  
**В** – в присутствии IL-10 (1 нг/мл); **Г** – в присутствии VEGF (50 нг/мл)

Неудивительно, что во множестве публикаций последних десятилетий имеются противоречивые свидетельства связи опухолевой инфильтрации ДК с положительным или отрицательным прогнозом течения и стадией заболевания. Как показали исследования, ДК, присутствующие в опухолевой ткани, часто характеризуются фенотипом со слабой экспрессией костимулирующих молекул, неэффективной кросс-презентацией антигенов, а также

экспрессией регуляторных молекул и рецепторов, способствующих обычно развитию иммуносупрессии [794; 795]. Исследования на животных моделях продемонстрировали, что тип, фенотип и количество ДК, присутствующих в опухоли, меняются в процессе опухолевого роста и ассоциированы со стадией заболевания. В частности, на модели рака яичников мышей ID8 было показано, что при прогрессировании и увеличении размеров опухоли число ДК в опухолевой ткани заметно возрастало. При этом почти все дендритные клетки обладали иммуносупрессирующим потенциалом, а количество Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, значительно уменьшалось [796].



Рисунок 71 – Графическое изображение процентного распределения незрелых ДК, находящихся в движении в системе кокультивирования с клетками МК #894:

**А** – в стандартных условиях; **Б** – в присутствии TGF- $\beta_1$  (10 нг/мл);

**В** – в присутствии IL-10 (1 нг/мл); **Г** – в присутствии VEGF (50 нг/мл).

■ – 15% ДК; ■ – 30% ДК; ■ – 50% ДК; ■ – 100% ДК

Опухолевые клетки и другие компоненты опухолевого микроокружения синтезируют и высвобождают факторы, которые способны ингибировать или изменять созревание и нормальное функционирование ДК. Кроме того, для успешной презентации антигенов необходимы высокая скорость миграции и низкая степень адгезии, и изменение этих параметров должно иметь определенную направленность в процессе созревания ДК [184; 791].

Michielsen A.J. и соавт. (2011) показали, что кондиционированная среда тканевых эксплантов колоректального рака человека имела высокое содержание VEGF и хемокинов CCL2, CXCL1, CXCL5 [797]. Предварительная инкубация ДК в этой среде *in vitro* приводила к блокаде их созревания. Помимо биохимического воздействия, ИСФ, продуцируемые опухолевыми клетками, оказывают также влияние на биофизические свойства ДК, препятствуя их эффективной миграции. Большинство протоколов противоопухолевой ДК-иммунотерапии основывается на активации ДК *in vitro* путем нагрузки антигенами, содержащимися в аутологичных и/или аллогенных лизатах опухолевых клеток. Активация ДК связана, в том числе с усилением экспрессии внутриклеточных и поверхностных молекул, обеспечивающих подвижность ДК и их способность к миграции. Однако эти процессы зависимы от микроокружения и могут быть заблокированы или модифицированы специфическими ИСФ, экскретируемыми в окружающую среду, что может являться причиной низкой эффективности ДК-вакцинотерапии у отдельных пациентов.

В нашем исследовании была создана модель *in vitro*, позволяющая оценить воздействие ИСФ, продуцируемых клетками МК, на эффективность миграции и активации созревающих ДК. Оказалось, что наиболее ингибирующим воздействием на подвижность созревающих ДК обладает IL-10, и существует обратная зависимость степени продукции IL-10 клетками МК и скоростью движения ДК ( $p < 0,05$ ). В исследовании Xu X. и соавт. (2017) изучали влияние IL-10 на такие биофизические характеристики ДК, как деформируемость, осмотическая резистентность и электрофоретическая подвижность [453]. Было обнаружено, что IL-10 критически воздействует на эти параметры, способствуя их редукции. Электрофоретическая подвижность ДК ассоциирована с наличием отрицательных зарядов на их поверхностной мембране. Установлено, что количество этих зарядов непрерывно увеличивается в процессе дифференциации ДК, что напрямую ассоциировано с их подвижностью [798]. Уменьшение этих зарядов на поверхности клеточной мембраны приводит к усилению сил адгезии ДК к компонентам микроокружения опухоли, и, соответственно, ограничивает подвижность ДК. Способность менять форму клетки важна в процессе миграции, когда ДК «протискиваются» через кровеносный или лимфатический сосуд, через соединения между клетками и сложной внеклеточной матрицей. Исследования Zeng Z. и соавт. (2006) показали, что ДК демонстрируют высокую способность к деформации на различных стадиях дифференцирования, начиная от моноцитов [799]. Дефекты свойств изменения формы клетки, возникающие под влиянием IL-10, могут способствовать ослаблению их миграции, что можно рассматривать как один из вариантов феномена «immune escape», уклонения от иммунной системы для опухолевых клеток.

Нами также было обнаружено, что TGF- $\beta_1$  и VEGF оказывают сходное действие на миграцию ДК, блокируя их подвижность. Различия между контрольными образцами и содержащими повышенное количество этих ИСФ были статистически достоверны ( $p < 0,05$ ) по двум параметрам: длина траектории и средняя скорость прохождения траектории. Исследования, проведенные Ни Z.Q. и соавт. (2016), выявили, что VEGF влияет на биофизические свойства таких структур ДК, как наружная цитоплазматическая мембрана и цитоскелет, что приводит к иммобилизации ДК и нарушает их способность к антигенной презентации [452]. Было выдвинуто предположение, что посредством VEGF происходит воздействие на эффективность иммунологических синапсов, создаваемых ДК, через изменение электрического потенциала клеточной мембраны.

В работе Spary L.K. и соавт. (2014) на модели *in vitro* опухолевых и стромальных клеток рака предстательной железы было показано, что, ДК, культивируемые в присутствии TGF- $\beta_1$ , секретируемого стромальными клеточными элементами, теряли экспрессию CD209, сохраняли экспрессию CD14 и затем не были способны презентировать антигены Т-лимфоцитам [800]. Эти эксперименты продемонстрировали роль иммуносупрессивного микроокружения в блокаде нормального созревания ДК.

Мы получили данные об обратной зависимости подвижности ДК от присутствия в микроокружении ряда ростовых факторов, таких как EGF, FGF, HGF. В литературе имеются данные о влиянии этих факторов на подвижность эукариотических клеток [801; 802]. Известно, что HGF меняет направленность дифференцировки ДК, способствуя формированию толерогенного иммунофенотипа, но механизм действия этого фактора на ДК пока еще не ясен [803]. Кроме того, было показано, что под влиянием HGF происходит увеличение адгезии ДК к одному из компонентов экстрацеллюлярного матрикса – ламинину, что уменьшает их подвижность [804]. В нашем исследовании была выявлена обратная зависимость между продукцией клетками меланомы кожи FasL и скоростью движения ДК в изучаемой системе. Среди многочисленных публикаций, посвященных анализу компонентов опухолевого микроокружения, препятствующих формированию иммунофенотипа ДК, продуктивного для формирования эффективного иммунного ответа, есть данные о присутствии в строме опухоли повышенного количества VEGF, TGF- $\beta_1$ , IL-10, простагландина E<sub>2</sub>, фосфотидилсерина, лиганда цитотоксического рецептора Т-лимфоцитов и естественных киллеров MICA, рецептора Fas и его лиганда FasL [805]. Все эти молекулы способны ингибировать взаимодействие ДК и Т-лимфоцитов.

Таким образом, в настоящее время можно уже предполагать с достаточной долей вероятности, почему при сравнительном изучении миграции *in vivo* зрелых и незрелых ДК, меченных радиоактивным йодом, при введении ДК-вакцин пациентам с диссеминированными

формами меланомы кожи, наблюдали очень низкий процент (<1%) ДК, которые смогли достигнуть лимфатических узлов после их внутрикожной инъекции больным [806]. Кроме того, исследования ДК, циркулирующих в периферической крови больных злокачественными новообразованиями, продемонстрировали их количественные и функциональные дефекты, которые были ассоциированы с повышенным уровнем VEGF и TGF- $\beta_1$  у этих пациентов [807].

ДК представляют собой сложную многообразную клеточную популяцию, задача которой распознавать, захватывать и доставлять антигены Т-лимфоцитам. Это предопределяет способность ДК к активной миграции в сложной трехмерной микросреде, населенной другими клеточными элементами. Изучение на модели кокультивирования с клетками МК *in vitro* миграционных свойств ДК под влиянием компонентов опухолевого микроокружения, блокирующих их подвижность, показало, что между количественным содержанием TGF- $\beta_1$ , IL-10, IL-18, VEGF-A, EGF, FGF, HGF, sFASL в супернатантах культур МК и средней скорости движения ДК, определяемой в аналитической системе *in vitro* Cell-IQ, существует обратная корреляция высокой силы ( $p < 0,01$ ). Также имеет место обратная корреляция высокой силы угла движения популяции ДК от экспрессии клетками МК антигенов Melan A, тирозиназы, семейств MAGE, BAGE, NY-ESO1, что указывает на зависимость направления движения ДК от присутствия изучаемых антигенов. Кроме того, добавление в культуральную модельную систему ИСФ высоких концентраций IL-10, TGF- $\beta_1$ , VEGF приводило к статистически значимому уменьшению длины траектории и средней скорости прохождения траектории ДК ( $p < 0,05$ ).

### **3.6. Экспериментальное моделирование для оценки эффективности иммунологических синапсов в условиях супрессивного опухолевого микроокружения**

Коммуникация между клетками на основе контакта является важным способом формирования взаимобратных связей в функционировании органов и тканей, особенно нервной и иммунной системы млекопитающих, поэтому понимание молекулярной основы функциональных клеточных взаимодействий важно для борьбы с патологическими состояниями, возникающими в результате их нарушения [808]. Молекулярные взаимодействия, лежащие в основе регуляции иммунного ответа, осуществляются между клетками иммунной системы посредством формирования контактов, называемых иммунологическим синапсом. Если эти взаимодействия регулируются надлежащим образом, организм человека защищен от широкого спектра внешних патогенов и собственных мутировавших клеток [809]. При применении противоопухолевых вакцин на основе активированных ДК критическим моментом является взаимодействие вакцинных ДК с Т-лимфоцитами и формирование клонов специфически активированных ЦТЛ, способных, в свою очередь, атаковать опухолевые клетки-мишени. Использование эффективной клеточной модели, позволяющей оценить качество

функционирования иммунных синапсов, представляется важным этапом разработки и совершенствования новых средств клеточной противоопухолевой иммунотерапии.

Создание клеточной модели проводили в несколько этапов. На первом этапе осуществляли направленную дифференцировку ДК из моноцитов периферической крови пациентов и получение культуры зрелых РГА<sup>+</sup>-активированных ДК. Использовали биологический материал двух больных: образцы мононуклеаров периферической крови, полученные центрифугированием в градиенте плотности, от пациентов с МК и СМТ.

На этапе получения культуры моноцитов путем адгезии методом проточной цитометрии были проанализированы клетки супернатантов, содержащих лимфоцитарную фракцию (табл. 38, рис. 72).

Таблица 38 – Результаты анализа клеточных субпопуляций лимфоцитарной фракции, выделенной после адгезии моноцитов *in vitro* (% клеток)

Субпопуляция	Образцы, полученные от пациентов	
	1	2
CD14 <sup>-</sup>	99,6	86,8
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	99,2	79,1
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,2	19,9
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,4	1,9
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	0,4	18,1
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	27,2	27,4
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	52,8	65,0

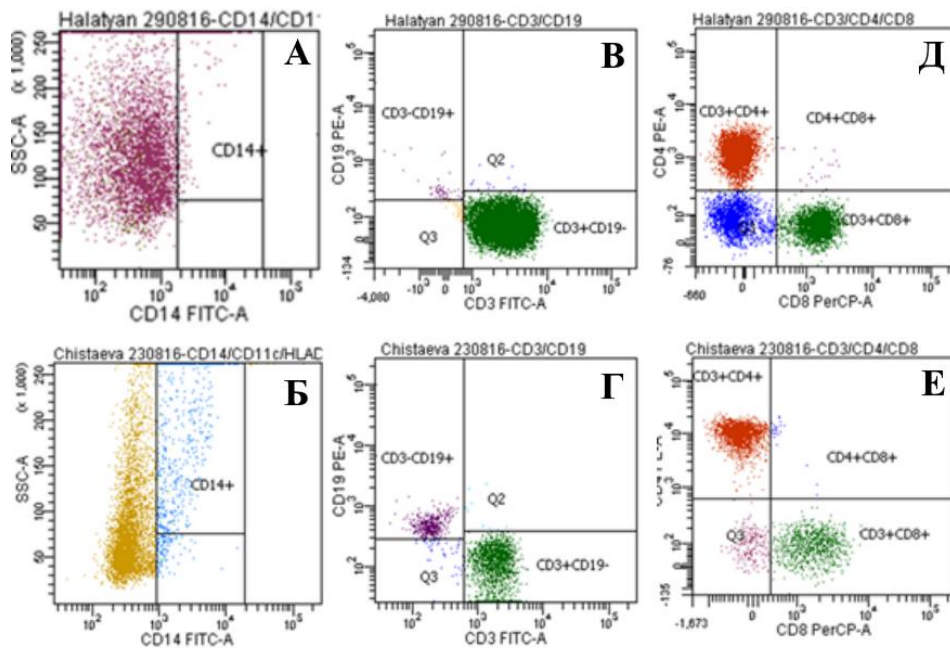


Рисунок 72 – Выявление субпопуляций лимфоцитов в супернатантах культур моноцитов разных больных методом проточной цитометрии:

А, Б – определение CD14<sup>-</sup>-клеток; В, Г – определение CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>-клеток;  
Д, Е – определение CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-клеток

В образцах клеточной суспензии выявили очень низкий процент клеток, несущих антигены CD14, более 90% клеток представляли собой субпопуляции лимфоцитов. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоциты составляли от 27,2% и 27,4% от CD14-негативной субпопуляции. Получение зрелых активированных ДК проводили по стандартному протоколу, оптимизированному ранее, при этом использовали новый клеточный продукт для нагрузки и активации ДК, состоящий из лизатов 9 клеточных линий МК, богатых РТА.

Прижизненное наблюдение в системе Cell-IQ продемонстрировало в смешанных культурах ДК и лимфоцитов формирование контактов активированных ДК с лимфоцитами, которые концентрировались вокруг ДК в виде «грозди» (рис. 73 А, Б).

После двухэтапного кокультивирования лимфоцитарной фракции с активированными ДК, клеточная суспензия, содержащаяся в надосадке, также была подвергнута анализу с помощью метода проточной цитометрии (табл. 39, рис. 74).

Субпопуляция ЦТЛ (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) составляла от 12,8% и 30,2% от общего числа CD3<sup>+</sup>-клеток, в этой субпопуляции выявляли лимфоциты, экспрессирующие HLA-DR, CD38<sup>+</sup>-, CD95<sup>+</sup>-клетки, granzymeB<sup>+</sup>-, perforin<sup>+</sup>- и INF- $\gamma$ <sup>+</sup>-лимфоциты. После цитометрического анализа проводили обогащение активированными ЦТЛ полученной клеточной популяции с помощью негативного магнитного клеточного сортирования и использовали в системе кокультивирования с опухолевыми клетками, которую также мониторировали с помощью наблюдения на приборе Cell-IQ.

Для лучшей визуализации объектов использовали флуоресцентный краситель CellVue Claret FAR red (Sigma-Aldrich, США), которым окрашивали мембраны ЦТЛ (рис. 73 В–Ж). Для создания аллогенных экспериментальных систем были подобраны клеточные компоненты, имеющие сходство по антигенам HLA I класса: гаплотип HLA-A\*02.

Как известно, важным событием, определяющим распознавание и устранение малигнизированных клеток, является распознавание антигена рецептором Т-лимфоцитов (TCR), экспрессируемым на их поверхности. Для того чтобы это событие произошло, необходим предшествующий контакт Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток. После связывания TCR с родственными комплексами пептид-МНС (pMHC), представленными на цитоплазматической мембране АПК, специализированная супрамолекулярная структура, а именно иммунологический синапс, собирается в области взаимодействия Т-лимфоцита с АПК [810]. Такая структура включает массивное перераспределение мембранных белков, в том числе комплексов TCR/pMHC, модулирующих рецепторов и молекул адгезии.

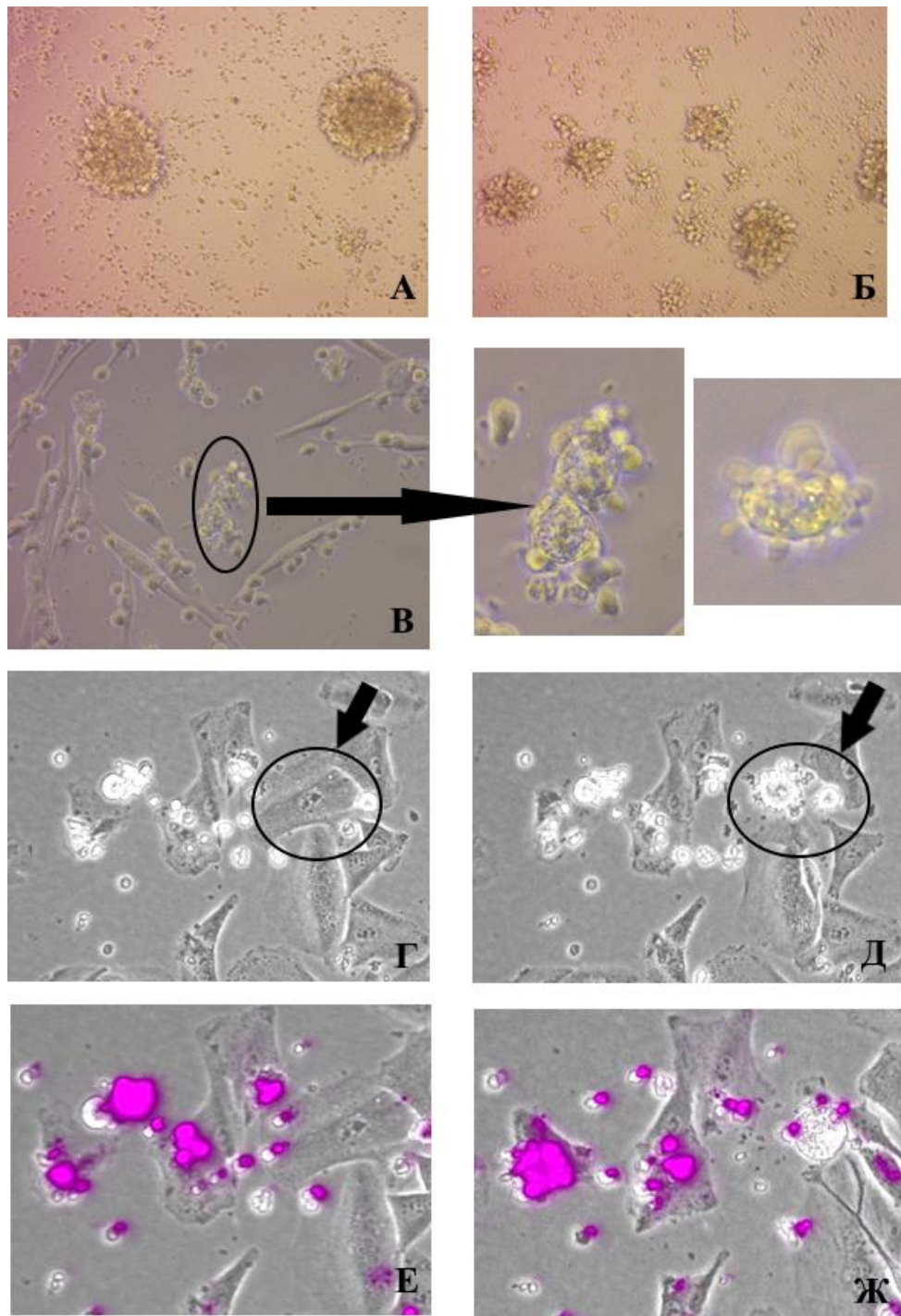


Рисунок 73 – Визуализация этапов получения специфически активированных цитотоксических Т-лимфоцитов:

**А, Б** – ДК в присутствии лимфоцитов на 4-й день кокультурирования (клетки больного Х., МК);

**В, Г, Д** – кокультурирование активированных ЦТЛ и клеток МК;

**Г, Д** – *черным цветом* выделен фрагмент, демонстрирующий взаимодействие ЦТЛ и клеток МК;

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



Таблица 39 – Результаты анализа клеточных субпопуляций суспензионной фракции смешанной культуры активированных ДК и лимфоцитов после двухэтапного культивирования

Субпопуляция	Образцы (% клеток)	
	1	2
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	77,6	68,3
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	12,8	30,2
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	80,5	49,6
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	40,3	30,7
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup>	90,5	85,0
CD8 <sup>+</sup> GranzymeB <sup>+</sup>	55,2	46,7
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	33,8	40,1
CD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup>	20,0	15,6
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>	0	4,2

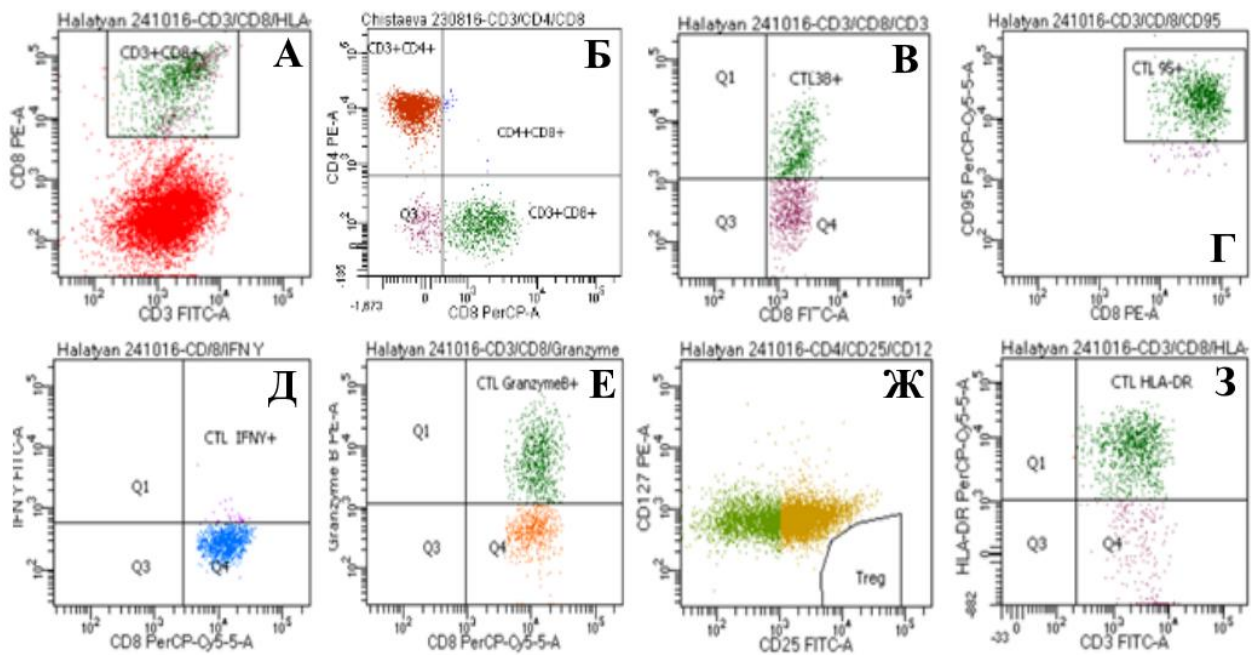


Рисунок 74 – Выявление субпопуляций активированных лимфоцитов суспензионной фракции смешанной культуры активированных ДК и лимфоцитов

после двухэтапного культивирования:

**А, Б** – выявление CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов; **В** – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-лимфоцитов;

**Г** – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов;

**Д** – CD8<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup>-лимфоцитов; **Е** – CD8<sup>+</sup>GranzymeB<sup>+</sup>-лимфоцитов;

**Ж** – CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>-лимфоцитов; **З** – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов

Более того, сборка иммунологического синапса приводит к внутриклеточным событиям, которые регулируют и определяют величину и характеристики Т-клеточного ответа. В злокачественных новообразованиях реализуются разнообразные механизмы, позволяющие изменять функции иммунологических синапсов и препятствовать формированию цитотоксичности Т-клеток. В системе *in vitro* возможно воссоздать условия, где отсутствуют отрицательные стимулы опухолевого микроокружения и получить активированные ЦТЛ с заданными свойствами.

На втором этапе экспериментов по созданию клеточных моделей иммунологического синапса анализ эффективности взаимодействия активированных ЦТЛ и опухолевых клеток осуществляли тремя способами:

- 1) путем создания библиотеки клеточных образов в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ с последующим подсчетом количества адгезирующих клеток;
- 2) с помощью МТТ-теста, позволяющего оценить цитотоксическое воздействие;
- 3) с использованием технологии xCelligence, дающей возможность оценить клеточную пролиферацию в режиме реального времени.

Среди клеточных моделей, созданных для наблюдения с помощью прибора Cell-IQ, в четырех случаях из 13 (30,7%) опухолевые клетки оказались резистентными к воздействию активированных ЦТЛ, индекс жизнеспособности в системе кокультивирования на 90 часов наблюдения в этом случае оказался сопоставим с аналогичным показателем в контрольной культуре (рис. 75 А, Б).

В данной системе индекс жизнеспособности рассматривали как отношение количества распластанных клеток, подсчитанного автоматически в определенный конкретный момент времени наблюдения, к количеству распластанных клеток в стартовый момент времени, выраженного в процентах. В 53,8% случаев (7/13) наблюдали частичное торможение роста культуры опухолевых клеток (рис. 75 В). В 2 (15,5%) случаях – полное торможение роста культуры за 90 часов наблюдения (рис. 75 Г, Д).

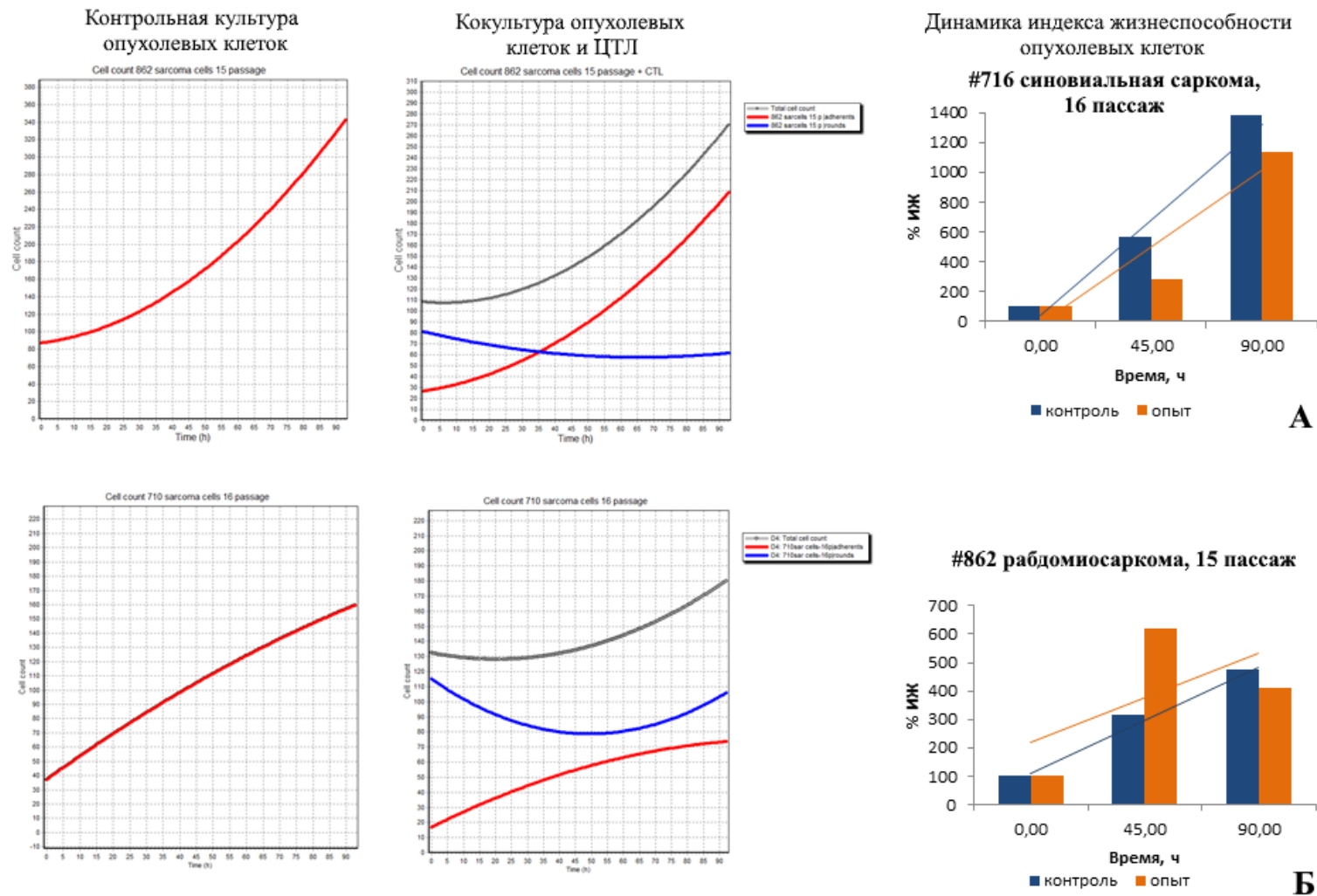


Рисунок 75 А, Б – Примеры взаимодействия активированных ЦТЛ и опухолевых клеток в системе Cell-IQ:  
А, Б – отсутствие эффекта воздействия ЦТЛ. Общее время наблюдения 90 часов.

Красная линия – количество живых адгезированных клеток в модельной системе; синяя линия – количество лимфоцитов.

Гистограммы отражают динамику ИЖ опухолевых клеток, вычисляемого как процент живых опухолевых клеток в данный момент времени по отношению к стартовой концентрации, фиксируемой системой визуализации Cell-IQ

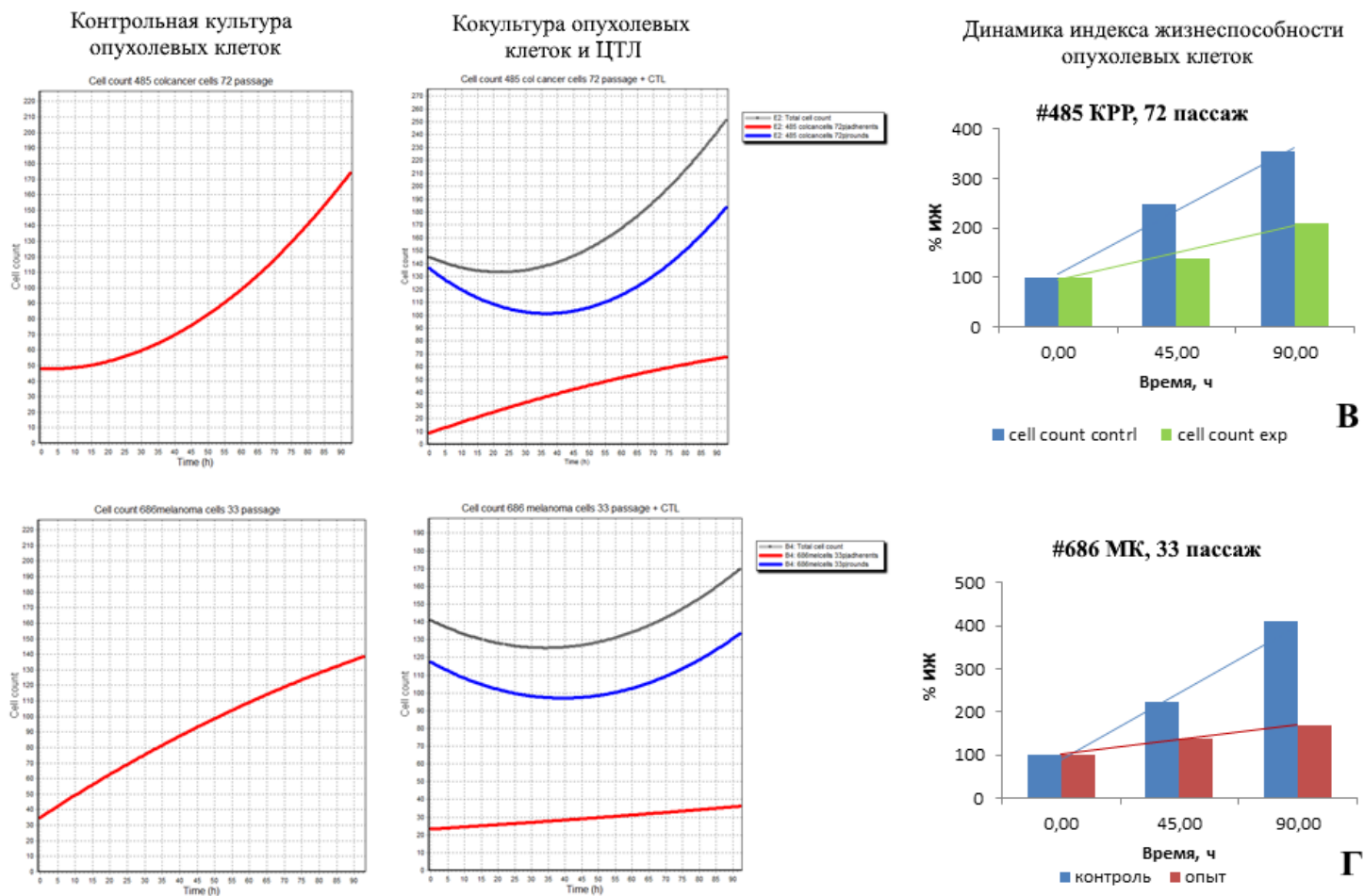


Рисунок 75 В, Г – Примеры взаимодействия активированных ЦТЛ и опухолевых клеток в системе Cell-IQ.

**В** – торможение роста культуры опухолевых клеток; **Г** – отсутствие эффекта воздействия ЦТЛ.

Общее время наблюдения 90 часов.

*Красная линия* – количество живых адгезированных клеток в модельной системе, *синяя линия* – количество лимфоцитов.

Гистограммы отражают динамику ИЖ опухолевых клеток, вычисляемого как процент живых опухолевых клеток в данный момент времени по отношению к стартовой концентрации, фиксируемой системой визуализации Cell-IQ

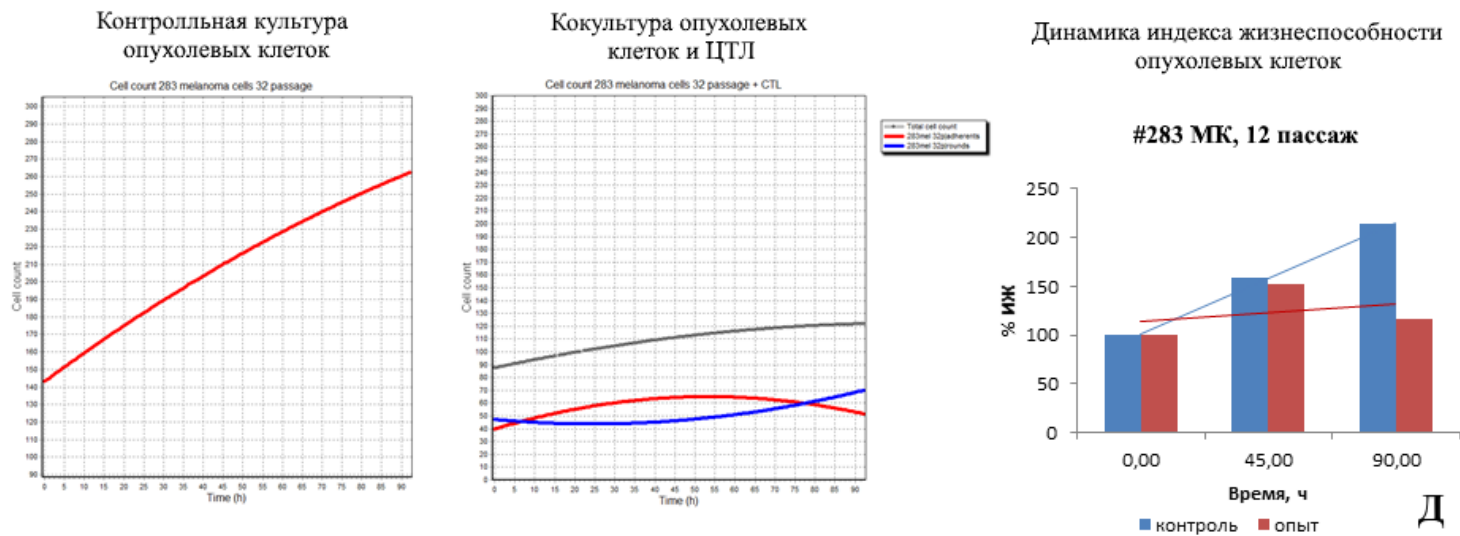


Рисунок 75 Д – Примеры взаимодействия активированных ЦТЛ и опухолевых клеток в системе Cell-IQ:  
 Д – отсутствие эффекта воздействия ЦТЛ. Общее время наблюдения 90 часов.  
*Красная линия* – количество живых адгезированных клеток в модельной системе; *синяя линия* – количество лимфоцитов.  
 Гистограммы отражают динамику ИЖ опухолевых клеток, вычисляемого как процент живых опухолевых клеток в данный момент времени по отношению к стартовой концентрации, фиксируемой системой визуализации Cell-IQ

Анализ жизнеспособности опухолевых клеток с помощью ММТ-теста позволил выявить статистически значимые различия данных по оптической плотности растворов, полученных в интактных и смешанных культурах для ряда образцов,  $p < 0,05$ , при этом малигнизированные клетки, выделенные от разных больных, обладали различной чувствительностью к воздействию ЦТЛ. В данном случае ИЖ, представленный как отношение оптической плотности в опыте и контроле, выраженное в процентах, для наименее резистентных культур МК составил 2,71% и 8,56% (рис. 76, табл. 40).

Для клеток СМТ/ОС статистически значимые различия между опытными и контрольными образцами наблюдали в 45,5% случаев (5/11),  $p < 0,05$ .

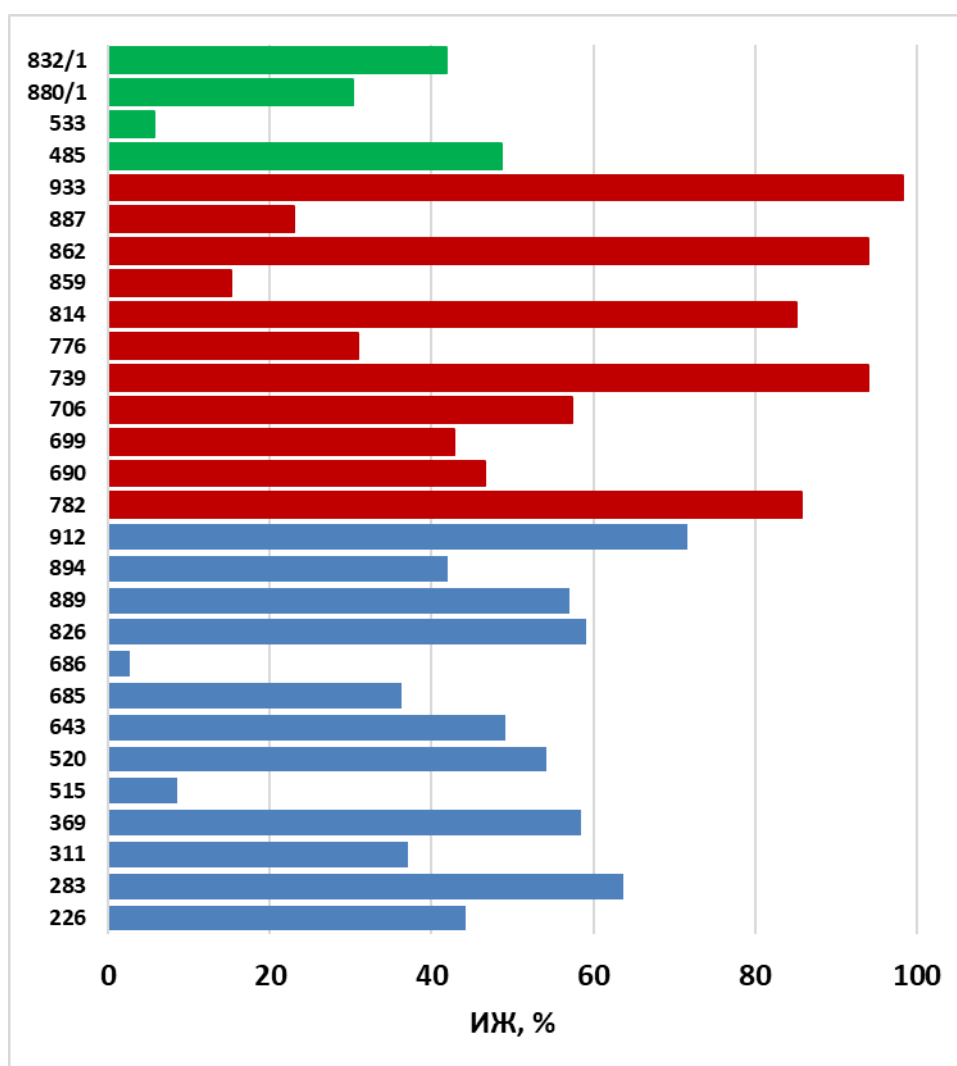


Рисунок 76 – Оценка жизнеспособности культивируемых клеток солидных опухолей с помощью ММТ-теста при кокультивировании с активированными ЦТЛ.

- – культивируемые клетки МК; ■ – культивируемые клетки СМТ/ОС;
- – культивируемые клетки ЭО.

По оси абсцисс – величина ИЖ опухолевых клеток, выраженная в процентах

Таблица 40 – Корреляционная зависимость ИЖ клеток солидных опухолей, кокультивируемых с активированными ЦТЛ, от продукции цитокинов с иммуносупрессивными свойствами

# культуры	Пассаж	ИЖ	IL-6, пг/мл	IL-8, пг/мл	IL-10, пг/мл	IL-18, пг/мл	TGF-β <sub>1</sub> , нг/мл	MICA, пг/мл	VEGF, пг/мл
226	50	44,17	27,73	3198,9	40,15	74,08	3,81	341,97	1565,15
283	30	63,7	357,85	3221,02	214,87	64,02	7,51	486,47	3395,0
311	8	37,06	4,22	1269,65	29,24	53,98	1,22	167,7	1597,17
369	30	58,54	352,88	3352,37	225,6	68,04	6,27	300,4	2940,2
515	45	8,56	1,55	2939,72	4,35	72,06	2,31	77,09	91,08
520	40	54,23	1,79	3280,3	16,0	57,99	4,96	143,8	1607,52
643	25	49,09	66,29	1736,73	6,06	53,98	1,42	31,89	1253,38
685	10	36,21	5,02	2916,4	35,36	55,99	1,18	46,97	1680,42
686	35	2,71	1,61	1520,41	9,515	43,96	3,89	90,89	12,33
826	60	59,03	13,49	2177,55	149,15	51,97	4,96	478,2	2632,08
889	20	57,09	342,46	3542,5	9,91	51,97	5,62	422,27	3899,3
894	10	81,97	358,76	3211,7	6,31	89,97	1,54	78,04	831,0
912	15	71,6	355,48	3372,13	4,34	78,09	3,34	510,76	1508,45
782	15	85,66	387,15	2524,49	104,17	45,97	4,23	391,94	3999,75
690	5	46,56	15,38	693,46	4,92	25,82	3,94	40,78	1609,105
699	10	42,76	95,83	2969,38	2,63	47,97	1,36	27,68	1533,05
706	8	57,3	–	–	–	–	–	108,29	–
739	15	93,93	362,12	3788,5	313,55	45,97	3,35	372,25	3758,5
776	20	30,93	2,779	4,43	2,26	53,98	3,01	26,95	1434,20
814	10	85,08	396,32	3592,4	52,23	79,32	6,13	420,17	3901,5
859	15	15,24	56,45	726,53	7,57	27,97	0,21	121,83	1891,55
862	15	93,91	323,24	3157,1	25,66	68,04	18,34	943,07	8360
887	5	22,99	–	–	–	–	0,77	138,14	–
933	10	98,17	417,24	3984,5	313,49	91,22	20,67	518,624	7075,8
485	70	48,7	48,86	736,71	31,52	45,97	1,34	124,71	1247
533	25	5,76	27,41	610,2	3,78	55,98	0,46	38,32	2206,8
880/1	10	30,33	–	–	83,88	–	1,31	44,62	2635,89
832/1	10	41,8	368,58	3357,8	1,149	59,99	3,03	41,3	3607,14
rho			0,745	0,665	0,536	0,346	0,700	0,688	0,549
p			<0,001	<0,001	0,005	0,091	<0,001	<0,001	0,004

Сравнение секреторных способностей культивируемых клеток солидных опухолей и их резистентности к воздействию активированных ЦТЛ, определяемой по величине ИЖ в ММТ-тесте, показало наличие статистически значимой положительной корреляции высокой силы между величиной ИЖ и концентрацией в супернатантах культивируемых малигнизированных клеток IL-6 ( $\rho=0,745$ ,  $p<0,001$ ), IL-8 ( $\rho=0,665$ ,  $p<0,001$ ), IL-10 ( $\rho=0,536$ ,  $p=0,005$ ), TGF- $\beta_1$  ( $\rho=0,700$ ,  $p<0,001$ ), MICA ( $\rho=0,688$ ,  $p<0,001$ ), VEGF ( $\rho=0,549$ ,  $p=0,004$ ) (см. табл. 40). В группе культур клеток МК были обнаружены обратные коррелятивные связи высокой силы между присутствием дифференцировочных антигенов, антигенов семейства MAGE1, а также антигена HLA I, выявляемых методом иммуноцитохимии, и ИЖ: CD63 ( $\rho=-0,637$ ,  $p=0,019$ ), Melan A ( $\rho=-0,643$ ,  $p=0,018$ ), Tyros ( $\rho=-0,783$ ,  $p=0,002$ ), CD146 ( $\rho=-0,597$ ,  $p=0,031$ ), MAGE1 ( $\rho=-0,605$ ,  $p=0,028$ ), HLA I ( $\rho=-0,602$ ,  $p=0,029$ ). Для всех культур солидных опухолей была выявлена взаимосвязь между ИЖ и транскрипционной активностью гена *PRAME* ( $\rho=-0,945$ ,  $p=0,0001$ ) (см. табл. 40).

В настоящее время получены данные, подтверждающие, что распознавание родственных лигандов pMHC на поверхности АПК может приводить к разнообразным результатам активации Т-лимфоцитов. Мы работали над созданием модели, оценивающей эффективность взаимодействия CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и ДК, с одной стороны, и специфически активированных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и опухолевых клеток-мишеней, с другой стороны, так как обычным результатом является активация именно CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и приобретение способности убивать клетки-мишени, представляющие поверхностные антигены. Однако теперь известно, что CD4<sup>+</sup>-клетки также могут проявлять эту активность как против опухолей, так и против микробов [817; 818]. Тем не менее Т-хелперы в основном известны своими эффекторными функциями, осуществляемыми за счет секреции иммуномодулирующих цитокинов, которые активируют и формируют функции других иммунных клеток [819].

Использование клеточного анализатора в режиме реального времени xCelligence позволило выявить более точно соотношение клеток-мишеней и клеток-эффекторов в экспериментальной системе. Для этого были выбраны культивируемые клетки #686 МК и #515 МК, которые продемонстрировали наибольшую чувствительность к воздействию ЦТЛ. Кроме того, выбор этих клеток МК для определения наиболее оптимальной концентрации ЦТЛ был обоснован еще и тем, что лизаты этих клеточных линий, богатые РТА, входили в клеточный продукт для нагрузки и активации ДК.

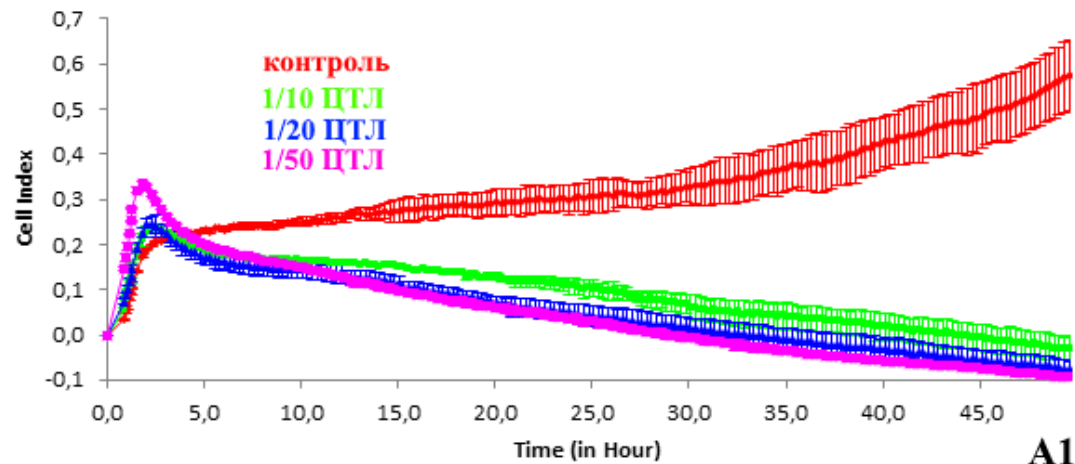
Клетки МК и ЦТЛ помещали последовательно в экспериментальную систему и измеряли электрический импеданс каждые 15 мин после 1 часа инкубации в течение 48–50 часов. Цитотоксичность ЦТЛ оценивали по сравнительной интенсивности роста клеток-мишеней в/без присутствия клеток-эффекторов. Изменение уровня пролиферации клеток МК при их



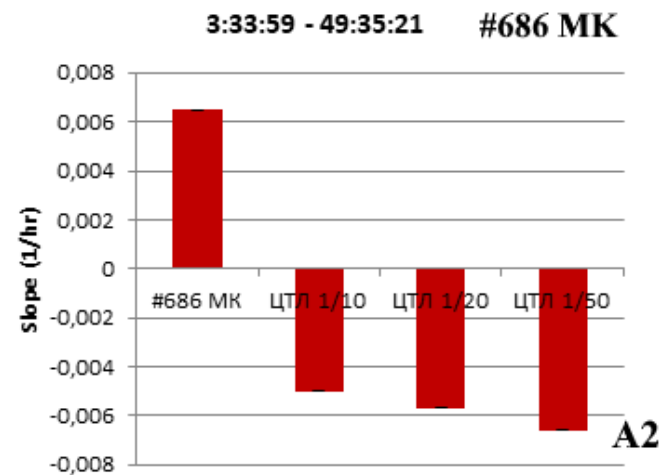
кокультивировании с ЦТЛ свидетельствовало о наличии эффекта воздействия ЦТЛ на клетки МК, при этом была обнаружена зависимость цитотоксического эффекта воздействия Т-лимфоцитов от их количества, максимальная эффективность воздействия была зафиксирована при соотношении концентраций мишень/эффе́ктор 1/50 (рис. 77 А1, А2). Величины параметра Slope за 48 часов наблюдения были негативными в присутствии Т-лимфоцитов, что свидетельствовало о торможении роста культуры опухолевых клеток, в отличие от контрольной культуры без воздействия (рис. 77 Б1, Б2).

Так как ранее было выявлено сходство профилей экспрессии 10 РТГ в культивируемых клетках МК и СМТ/ОС для проверки гипотезы о возможности генерации ЦТЛ, реактивных по отношению к опухолевым клеткам разного гистотипического происхождения, несущим РТА, в качестве клеток-мишеней были выбраны культуры СМТ/ОС, экспрессирующие различные количества этих антигенов. Были использованы РТА-активированные ЦТЛ в соотношении 1 оп.кл./50 ЦТЛ (рис. 78 А, Б, В). Воздействие ЦТЛ оказалось наиболее продуктивным в культурах СМТ/ОС, которые имели наибольшее сходство профиля экспрессии РТА с клетками МК, входившими в состав опухолевых лизатов для активации ДК (рис. 78 Г). Процент лизированных клеток увеличивался с течением времени и достигал максимума к 40 часам наблюдения, при этом показатели киллинга через 25 и 40 часов положительно коррелировали между собой ( $\rho=0,881$ ,  $p<0,001$ ). Минимальный лизис составил 12% для культуры липосаркомы #945, в клетках которой не экспрессировались гены изучаемых РТА. В 5 случаях из 15 клеточный киллинг приближался к 100%. Эффективность воздействия на клетки СМТ/ОС, определяемая по изменению CI, коррелировала с присутствием экспрессии генов *PASDI* ( $\rho=-0,522$ ,  $p=0,046$ ) и *PRAME* ( $\rho=-0,686$ ,  $p=0,005$ ). Интересно, что данные кластеризации по экспрессии РТГ в культивируемых клетках СМТ/ОС соответствовали эффективности лизиса, то есть гибель клеток культур СМТ/ОС, находящихся в кластере с минимальным уровнем экспрессии РТГ, составляла к 40 часам наблюдения менее 70%, в то время как для культур с высоким уровнем экспрессии этот параметр приближался к 100% уже через сутки от начала эксперимента.

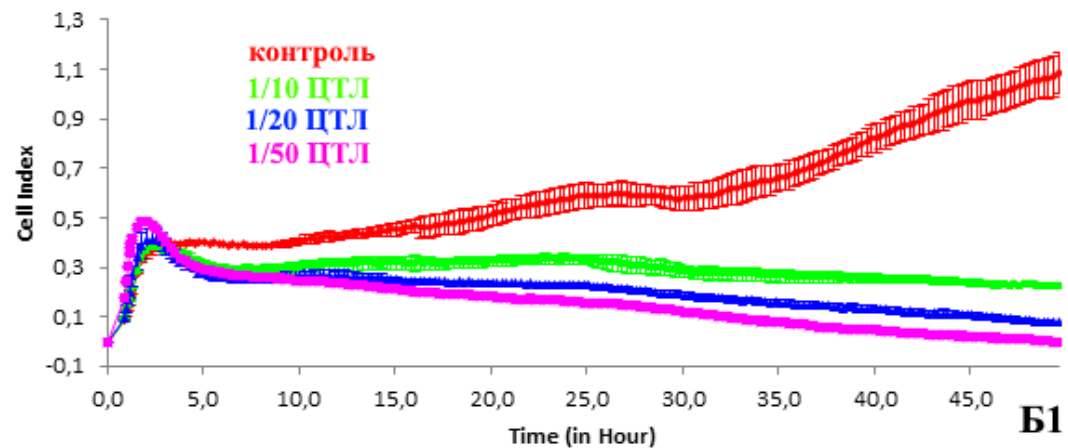
Как известно, ген *PRAME* кодирует связанный с мембраной белок, который способен вызывать Т-клеточный иммунный ответ [118]. Epping M.T. и соавт. (2005) обнаружили, что сверхэкспрессия *PRAME* блокирует опосредованную ретиноевой кислотой (RA) клеточную дифференцировку, остановку роста клеток и апоптотическую гибель [811]. Это дало основание предполагать, что *PRAME*, по-видимому, служит ингибитором передачи сигналов рецептора ретиноевой кислоты RAR. Следовательно, сверхэкспрессия *PRAME* способствует онкогенезу посредством ингибирования пути передачи сигналов RA/RAR.



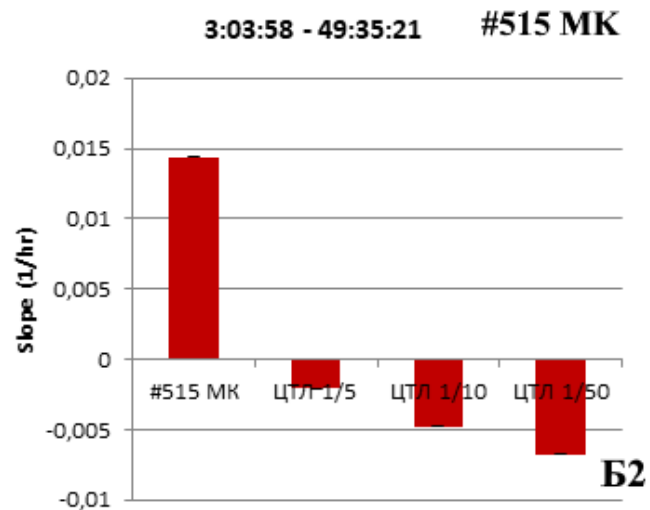
**A1**



**A2**



**B1**



**B2**

Рисунок 77 А1, А2; Б1, Б2 – Графическое изображение результата взаимодействия специфически активированных ЦТЛ и клеток МК. Регистрация клеточного индекса во времени и скорость роста культуры под воздействием разного количества Т-лимфоцитов: **А1, А2** – культура #686 МК; **Б1, Б2** – культура #515 МК

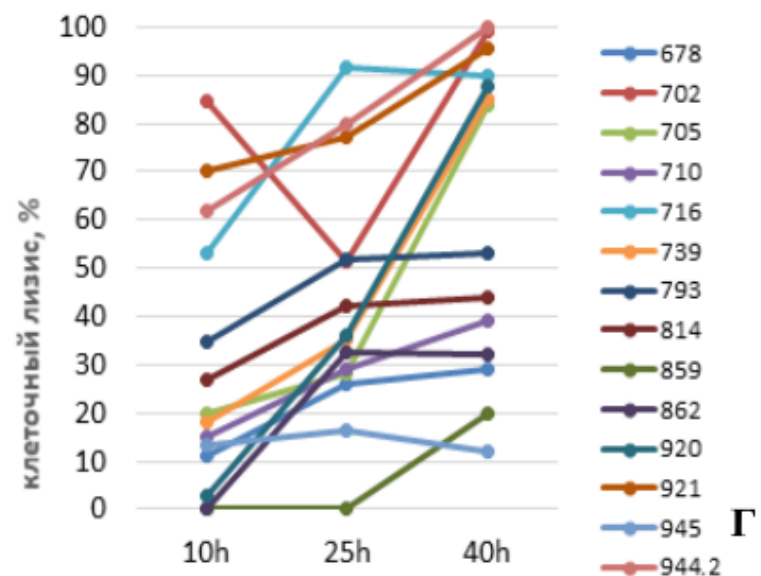
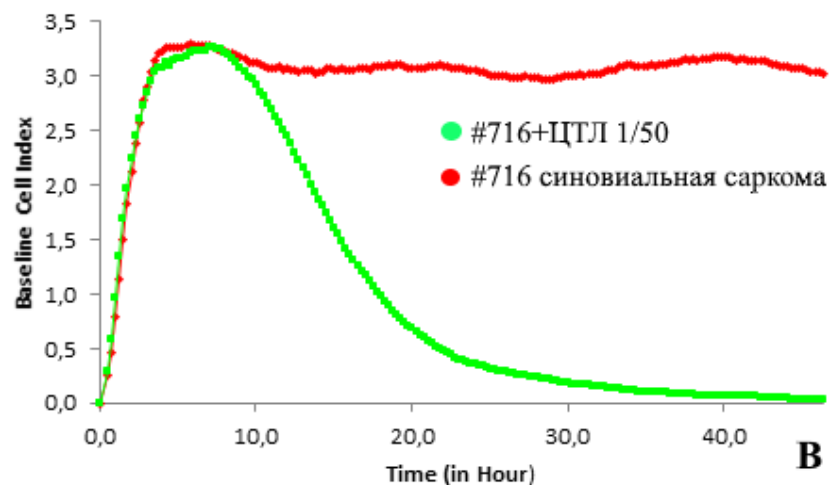
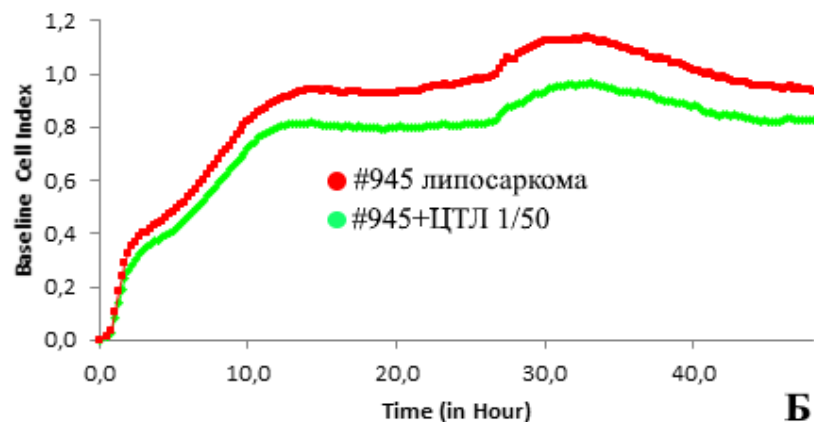
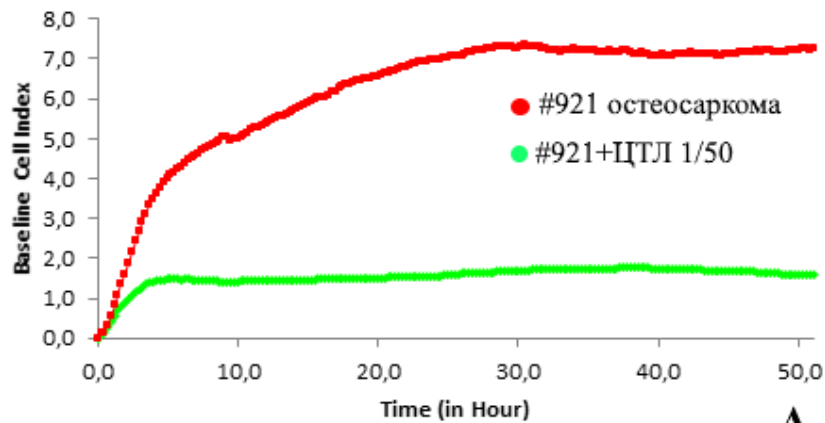


Рисунок 78 А–Г – Графическое изображение результата взаимодействия специфически активированных ЦТЛ и клеток СМТ/ОС.

Регистрация клеточного индекса во времени и скорость роста культуры:

А – #921 остеогенная саркома; Б – #945 липосаркома; В – #716 синовиальная саркома;

Г – динамика клеточного лизиса в процессе взаимодействия Т-лимфоцитов и клеток СМТ/ОС

В соответствии с этим высокая экспрессия *PRAME* во многих злокачественных опухолях, таких как МК, рак головы и шеи, РМЖ, РП и немелкоклеточный рак легкого ассоциирована со стадией заболевания и плохим прогнозом [118; 812]. Ген *PASDI* кодирует белок, который считается фактором транскрипции, и его экспрессия в нормальных тканях локализована в иммунологически защищенных областях, таких как ткани яичек, в которых отсутствует экспрессия МНС I класса [813]. Этот ген широко экспрессируется при гематологических злокачественных новообразованиях, таких как множественная миелома, лимфомы, миелоидные злокачественные новообразования [115]. *PASDI* рассматривается как перспективный кандидат в качестве мишени для иммунотерапевтических воздействий при КРР и РЯ [814]. Обнаруженная нами корреляция между степенью экспрессии *PRAME* и *PASDI* в культурах МК и СМТ/ОС и эффективностью клеточного лизиса в экспериментальной системе подтверждает, что белковые продукты этих генов могут рассматриваться как перспективные универсальные мишени для иммунотерапии злокачественных опухолей человека.

Несмотря на то, что клетки МК характеризуются более выраженной экспрессией изучаемых генов РТА, проведенное нами сравнение частоты встречаемости экспрессии 11 РТГ в клетках СМТ/ОС и МК дает основание считать, что имеет место сходство профилей экспрессии. Этот факт формирует теоретические предпосылки для использования клеток МК, характеризующихся большей легкостью перевода их в культуру, более интенсивной пролиферацией и возможностью нарастить большую массу идентичного клеточного материала в короткий период времени, для приготовления клеточного лизата, необходимого для активации вакцинных ДК, используемых в лечении больных СМТ/ОС.

В системе *in vitro* это подтверждают наши эксперименты по взаимодействию специфически-активированных цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и клеток СМТ/ОС. Сочетанное использование трех технологий позволило визуализировать процесс киллинга и выживаемости клеток солидных опухолей после взаимодействия с ЦТЛ, провести количественный и качественный анализ эффективности этого взаимодействия. Эффективность лизиса клеток-мишеней была индивидуальной для каждой клеточной линии и менялась с течением времени, но коррелировала с присутствием ряда дифференцировочных антигенов и РТА, HLA I класса, экспрессией РТГ, и продукцией целого спектра факторов иммуносупрессии. Pollack S.M. и соавт. (2012) показали возможность использования антигена NY-ESO1 для специфической активации ЦТЛ против клеток миксоидной липосаркомы, для которых была обнаружена его гомогенная экспрессия [602].

В нашем исследовании мы не выявили общей зависимости эффективности клеточного лизиса от транскрипционной активности гена *NY-ESO1*, однако, учитывая высокую гетерогенность экспрессии ОАА клетками злокачественных новообразований, можно

предполагать необходимость активации АПК суммарным пулом опухолеспецифических антигенов, что подтверждается также другими исследованиями. Chieochansin T. и соавт. (2019) продемонстрировали, что ДК, обработанные пулами антигенов, полученными из трех клеточных линий, по сравнению с каждой из этих клеточных линий, улучшили цитолитическую функцию эффекторных Т-лимфоцитов против клеток гепатоцеллюлярной карциномы примерно в два раза ( $p < 0,001$ ) [815]. Аналогичные результаты были получены несколько ранее при изучении клеточных моделей холангиокарциномы [816].

В то же время необходимо учитывать, что эффективность воздействия активированных ЦТЛ зависит не только от степени выраженности экспрессии ОАА и/или секреции иммуносупрессивных факторов опухолевыми клетками, что может также объяснять различия для злокачественных новообразований разного гистотипического происхождения. В частности, Frick M. и соавт. (2017) обнаружили, что ЦТЛ, экспрессирующие Т-клеточный рецептор, специфичный для пептида P1A<sub>35-43</sub>, связанного с H-2L<sup>d</sup>, были способны индуцировать регресс культивируемых клеток мастоцитомы P815, экспрессирующих P1A, но оказались намного менее эффективны против экспрессирующих P1A клеток МК [817]. Дальнейшие исследования показали, что клетки мастоцитомы были более чувствительны к цитолизу *in vitro*, чем клетки МК. Использование ЦТЛ, экспрессирующих флуоресцентный гранзим В (GZMB-Tom), позволило выявить задержку миграции цитотоксических гранул к месту взаимодействия с клетками опухоли, а также частично недостаточный экзоцитоз GZMB-Tom при взаимодействии клетками МК. Одной из возможных причин различия ответа ЦТЛ являлось отсутствие в клетках МК экспрессии молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), лиганда для лейкоцитарного интегрина LFA-1. Comrie W.A. и соавт. (2015) продемонстрировали, что перестройка актинового скелета Т-лимфоцитов генерирует механические силы, которые регулируют активность LFA-1 в иммунологическом синапсе, в то же время иммобилизация ICAM-1 необходима для индукции конформационных изменений LFA-1 [818]. Таким образом, исчезновение экспрессии ICAM-1 в малигнизированных клетках, приводящее к реконструкции цитоскелета в области иммунного синапса, – это еще один обнаруженный механизм «ускользания» злокачественных клеток от воздействия клеток иммунной системы [819].

Исследование с использованием экспериментальной модели взаимодействия специфически активированных Т-лимфоцитов с культивируемыми клетками злокачественных опухолей продемонстрировало, что индивидуальный антигенный профиль клеток опухоли и их способность набирать факторы иммуносупрессии имеют важное значение для эффективности иммунных синапсов и цитолитических реакций, однако точный вклад различных ОАА в этот процесс должен быть подвергнут дальнейшему изучению. Величины ИЖ малигнизированных клеток коррелировали с продукцией ИСФ IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta_1$ ,

VEGF, MICA ( $p \leq 0,001$ ). Предложенная клеточная модель продемонстрировала принципиальную возможность использовать РТА<sup>+</sup>-лизаты клеток МК для активации ДК, в присутствии которых были генерированы специфически активированные ЦТЛ, реактивные по отношению к клеткам СМТ/ОС, имеющим сходный РТА-профиль. При этом установлено, что процент лизированных клеток СМТ/ОС зависел от степени экспрессии таких РТГ, как *PRAME* и *PASDI* ( $p < 0,05$ ).

Негативные результаты, полученные в широкомасштабных исследованиях клеточных противоопухолевых вакцин, таких как CancerVax [820] и DERMA [821], указали на необходимость создания новых, более сложных стратегий вакцинации, основанных на достижениях изучения опухолевого микроокружения и антигенных, метаболических, секреторных свойств малигнизированных клеток. Так называемые «ДК-вакцины второго поколения» демонстрируют другие перспективы [822].

При разработке подобных технологий качественная и количественная характеристика антигенов, а также ИСФ, нарабатываемых злокачественными клетками, становится одним из основных этапов процесса создания иммунотерапевтического клеточного продукта, которая оказывает решающее влияние на терапевтическую эффективность. Клеточные модели, позволяющие оценить качество возникающих иммунологических синапсов на стадии взаимодействия активированных ДК с Т-лимфоцитами и специфически активированных ЦТЛ с клетками опухолей *in vitro*, могут быть использованы для предварительной оценки оправданности применения тех или иных подходов при создании новых противоопухолевых вакцин.

### **3.7. Исследование иммуносупрессивных факторов как биомаркеров эффективности клеточной иммунотерапии**

Изучение возможностей применения противоопухолевых клеточных вакцин началось задолго до появления таргетной терапии и терапии ингибиторами контрольных точек иммунной системы. К сожалению, результаты многих исследований имели негативный результат и вызвали большое разочарование. В частности, ряд клинических испытаний III фазы не смогли продемонстрировать клиническую эффективность клеточных вакцин разных типов [820; 821; 823]. Вместе с тем в 2010 году были опубликованы данные об успешном применении вакцины на основе аутологичных активированных ДК (ДКВ) для лечения кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Было показано увеличение общей выживаемости мужчин с кастрационно-резистентной аденокарциномой предстательной железы, и в 2011 году эта вакцина была одобрена FDA (США) [398]. В настоящее время проходят клинические исследования III фазы ДКВ, зарегистрированной для лечения глиобластомы [399; 824].

Таким образом, разработка новых подходов к оценке клинической эффективности клеточной иммунотерапии представляется весьма актуальной задачей.

В то же время стало понятно, что именно биологические особенности опухоли и ее микроокружения определяют гетерогенность иммунологического ответа на опухолевые антигены, различную чувствительность опухолевых клеток к действию киллерных клеток, различия в интенсивности ингибирующего влияния опухоли на иммунокомпетентные клетки и, как следствие, различную чувствительность к иммунотерапии, химиотерапии, лучевой терапии [14; 346]. Однако все еще нет ясного понимания патогенеза опухолевого роста в контексте взаимодействия с компонентами иммунной системы.

Одним из механизмов, обеспечивающих рост злокачественного новообразования, является продукция опухолевыми клетками разнообразных факторов, которые высвобождаются в микроокружение опухоли и обладают широким спектром иммуносупрессивных эффектов [23; 195]. На данный момент известно, что баланс между иммуногенностью и иммуносупрессией является ключевым фактором иммунотерапевтического ответа [825]. В этом контексте крайне важно до начала лечения выявить факторы, оказывающие иммуносупрессивный эффект, так как способность клеток опухолей к реализации разнообразных молекулярных механизмов, ингибирующих или модифицирующих противоопухолевый иммунный ответ, может влиять на эффективность иммунотерапии. В связи с этим для оптимизации эффективности клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований представляется необходимым учитывать и минимизировать возможное иммуносупрессорное воздействие самой опухоли.

Базируясь на полученных нами экспериментальных данных, мы выдвинули гипотезу, что метаболические свойства клеток злокачественных новообразований, позволяющие создавать микроокружение, которое благоприятствует дальнейшей диссеминации опухоли в организме, являются универсальным механизмом, способным существенно ограничивать клиническую эффективность клеточной иммунотерапии.

Целью данной части работы явилось подтверждение потенциальной прогностической и предиктивной значимости продукции опухолевыми клетками больших факторов, ассоциированных с иммуносупрессией (MICA, TGF- $\beta_1$ , IL-10 и VEGF) у больных МК, РП, СМТ, получавших ГМВ или ДКВ. Исследование количественного содержания ИСФ в супернатантах культур малигнизированных клеток пациентов показало, что культивируемые опухолевые клетки проявляли широкую вариабельность в их продукции, но при этом концентрация всех исследуемых ИСФ в супернатантах клеток больных с недостаточным эффектом была статистически значимо выше, чем у больных с достаточным эффектом ( $p < 0,05$ ) (табл. 41, рис. 79).

Таблица 41 – Количественное содержание ИСФ в супернатантах культур опухолевых клеток пациентов с достаточным и недостаточным клиническим эффектом

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

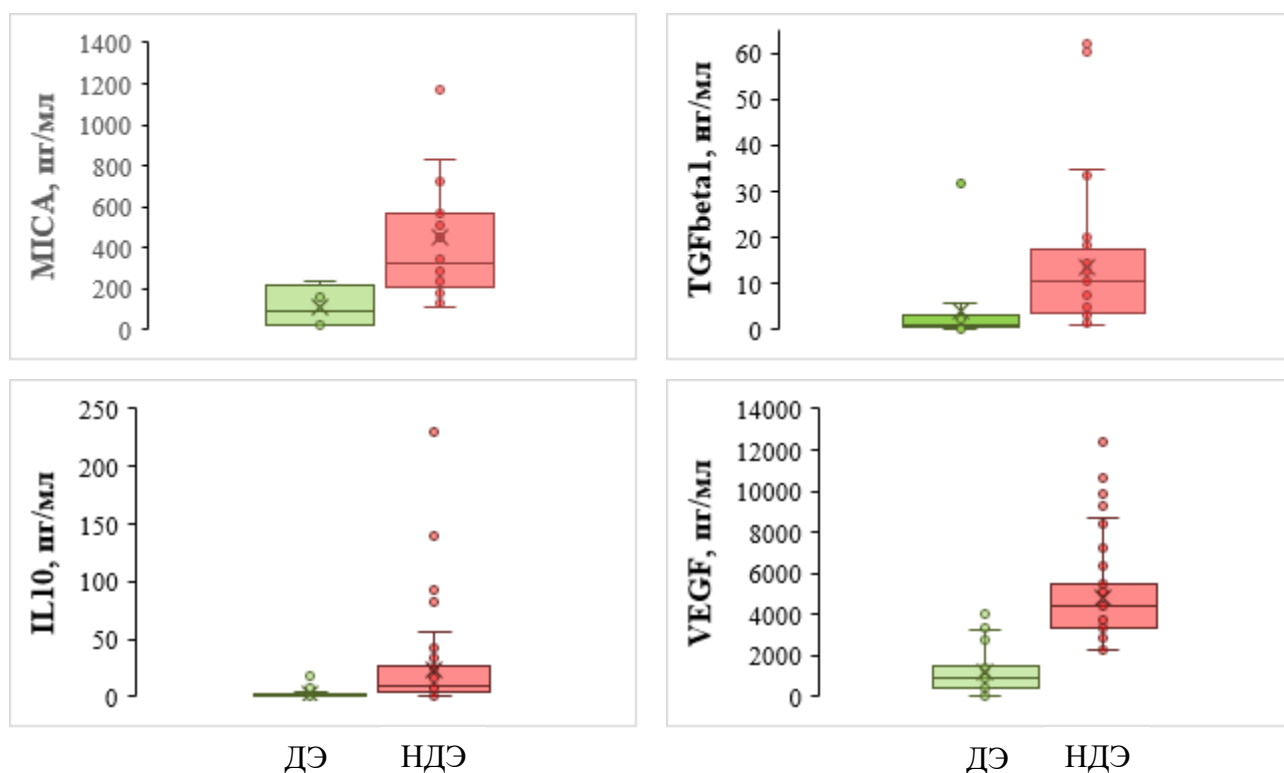
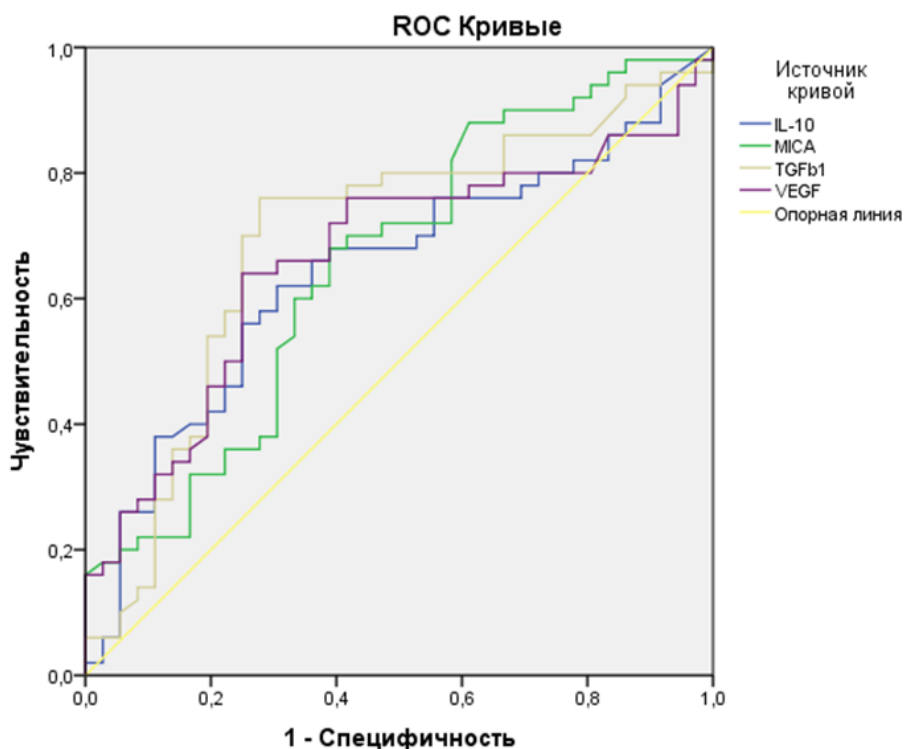


Рисунок 79 – Графическое изображение количественного содержания ИСФ в супернатантах культур опухолевых клеток пациентов с достаточным и недостаточным клиническим эффектом,  $p < 0,05$

Была изучена прогностическая роль каждого ИСФ в отдельности при оценке клинической эффективности специфической клеточной иммунотерапии. На рисунке 80 представлена точность прогнозирования достаточности эффекта при использовании каждого из анализируемых факторов. ROC AUC (площадь под ROC-кривой) для IL-10 составила 64,3%, для MICA – 65,5%, для TGF- $\beta_1$  – 69,5%, для VEGF – 66,4%.





Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 80 – Графическое отображение точности определения эффективности лечения с использованием каждого ИСФ: MICA, TGF- $\beta_1$ , IL-10, VEGF

Для определения возможности прогнозирования достаточности эффекта нами был использован метод построения деревьев принятия решений. В модель были включены следующие критерии: тип заболевания (МК, СМТ, РП), метод лечения, наличие отдаленных метастазов и уровни ИСФ. Полученное дерево решений представлено на рис. 81.

Мы оценили корреляционные связи между факторами с использованием ранговых корреляций Спирмана. Все ИСФ оказались значимо связаны между собой, при этом уровень корреляций был средним (табл. 42).

Точность прогнозирования с использованием подобного подхода превышала точность использования отдельных факторов и составляла, по данным кросс-проверки, 74,4% (чувствительность – 76%, специфичность – 72,2 %).

Наиболее значимым фактором оказался TGF- $\beta_1$ , пациенты имели благоприятный прогноз при значении его концентрации от 1,4 до 3 нг/мл. При выявлении TGF- $\beta_1$  >3 нг/мл пороговым значением MICA для пациентов с благоприятным прогнозом была концентрация 574,7 пг/мл. При значении содержания MICA  $\leq$ 574,7 пг/мл выявлялась пороговая концентрация IL-10 10,5 пг/мл, при IL-10 >10,5 пг/мл неблагоприятный исход прогнозировался в 100% случаев. При этом указанные выше клинические параметры не имели решающего значения в модели. Значимость оцененных в модели факторов представлена на рис. 82.

Для валидации полученных данных больных с высокой вероятностью НДЭ, по результатам прогнозирования, оценивали как пациентов с высоким риском, остальных пациентов – как больных с низким риском.

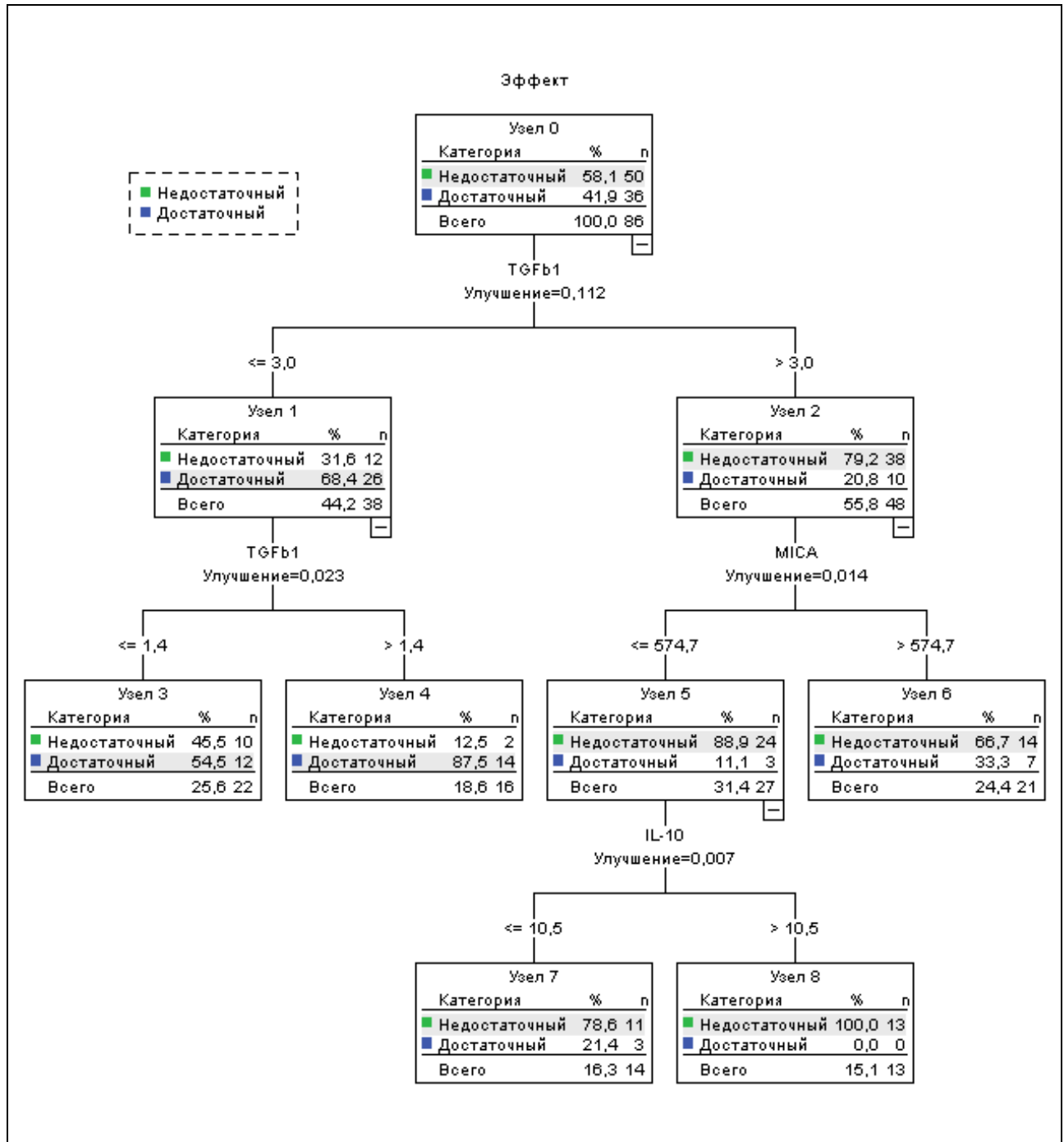


Рисунок 81 – Дерево классификации, построенное на основе анализа продукции ИСФ: МІСА, TGF-β<sub>1</sub>, IL-10, VEGF опухолевыми клетками пациентов

Таблица 42 – Коррелятивные связи между параметрами концентраций факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, продуцируемых клетками опухолей пациентов (метод ранговых корреляций Спирмана)

Коэффициент Спирмана (rho)		IL-10	MICA	TGF- $\beta_1$	VEGF
IL-10	rho	1,000	0,550**	0,693**	0,626**
	p (2-сторонняя значимость)	–	0,000	0,000	0,000
	n	99	99	99	99
MICA	rho	0,550**	1,000	0,602**	0,575**
	p (2-сторонняя значимость)	0,000	–	0,000	0,000
	n	99	99	99	99
TGF- $\beta_1$	rho	0,693**	0,602**	1,000	0,634**
	p (2-сторонняя значимость)	0,000	0,000	–	0,000
	n	99	99	99	99
VEGF	rho	0,626**	0,575**	0,634**	1,000
	p (2-сторонняя значимость)	0,000	0,000	0,000	–
	n	99	99	99	99

Примечание: \*\* – корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

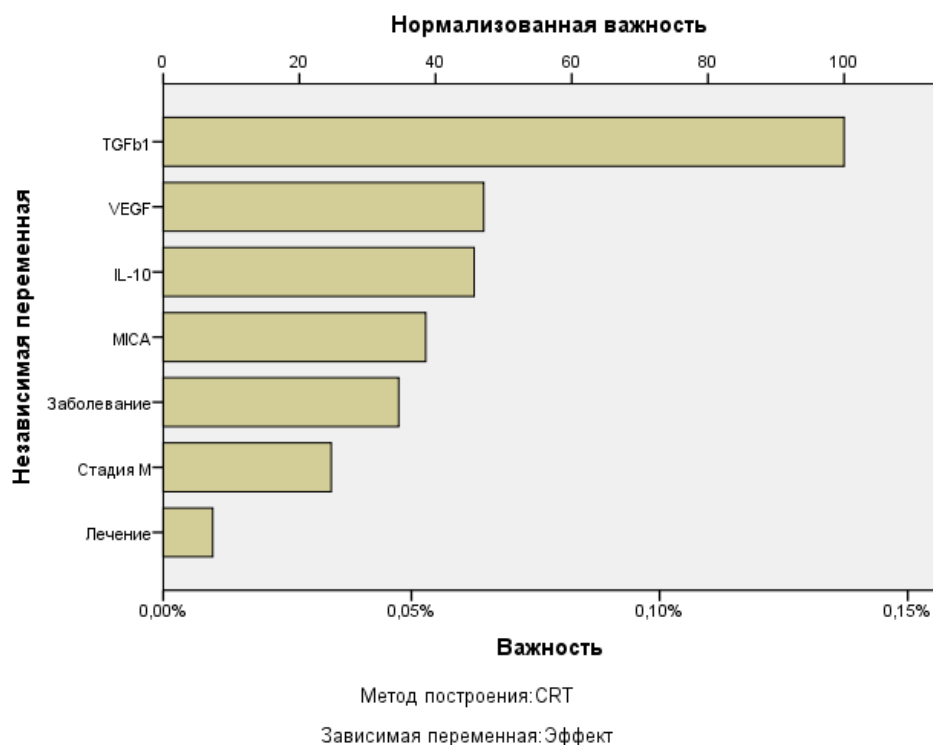


Рисунок 82 – Диаграмма, отображающая важность исследуемых переменных в математической модели прогнозирования эффекта клеточной иммунотерапии больных солидными опухолями

Для определения прогностической роли ИСФ были построены многофакторные модели Кокса, оценивающие ОВ и ВДП больных МК как наибольшей из имеющихся групп, при этом во всех случаях использовали метод условного включения переменных в модель. В качестве

факторов в модель были включены вид терапии (ДКВ или ГМВ), стадия заболевания, паллиативный или адъювантный характер лечения, концентрации ИСФ в супернатантах культур опухолевых клеток. Результаты анализа представлены в табл. 43. Уровни TGF- $\beta_1$  и МІСА оказались значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости пациентов с МК. Так, МІСА повышал риск смерти больного на 0,04% за каждую единицу увеличения уровня фактора. С учетом высокого разброса значений данного фактора в нашем исследовании (min 7,5 – max 5870,0 пг/мл), значимость влияния показателя на продолжительность жизни может быть весьма велика.

Таблица 43 – Многофакторный анализ выживаемости больных меланомой кожи, саркомами мягких тканей и раком почки, получивших клеточную иммунотерапию

Фактор	ВДП			ОВ		
	ОР	95% ДИ	p	ОР	95% ДИ	p
Адъювантная терапия	0,226	0,121–0,422	$3 \cdot 10^{-6}$	0,274	0,148–0,508	$4 \cdot 10^{-5}$
МІСА, пг/мл			>0,05	1,0004	1,00009–1,001	0,012
TGF- $\beta_1$ , пг/мл			>0,05	1,034	1,006–1,063	0,017
ДКВ	0,226	0,121–0,422	0,04			>0,05
VEGF, пг/мл	1,0003	1,0002–1,0004	$5 \cdot 10^{-6}$			>0,05

*Примечание:* ОР – относительный риск; ОВ – общая выживаемость; ВДП – время до прогрессирования. Значимость модели для ВДП:  $p=7,1 \cdot 10^{-8}$ ; для ОВ:  $p=1,4 \cdot 10^{-9}$ .

TGF- $\beta_1$  повышал риск на 3,4% за единицу увеличения уровня фактора при диапазоне его измерений в исследовании от 0,125 до 62,15 нг/мл, что говорит о более сильном влиянии TGF- $\beta_1$  по сравнению с МІСА. При анализе ВДП отмечено, что МІСА и TGF- $\beta_1$ , однако, не добавляли дополнительной информации в модель выживаемости, тогда как уровень VEGF был значимым, повышая риск прогрессирования на 0,03% на каждую единицу повышения фактора. Высокие значения уровня VEGF в нашем исследовании (от 12,59 до 12389,5 пг/мл) свидетельствуют о значительном вкладе данного показателя в прогностическую модель. IL-10 не добавлял дополнительной прогностической информации ни в одну модель прогнозирования ( $p>0,1$ ). Необходимо отметить, что при включении факторов в многофакторные модели выживаемости мы не наблюдали высоких корреляций их регрессионных остатков, что подтверждает независимость включенных в модели факторов. Тем не менее подобные взаимосвязи позволяют упростить оценку риска с использованием проанализированных факторов и требуют комплексного подхода к их оценке.

Мы применили полученный нами результат оценки рисков прогрессирования на основании количественного содержания ИСФ в однофакторном и многофакторном анализе. При однофакторном анализе уровень риска определял ОВ как в общей популяции, так и при

адъювантной терапии МК (рис. 83, 84, табл. 44). Мощность нашего исследования оказалась недостаточной для получения статистически значимых различий по ОВ у больных МК, получавших самостоятельное лекарственное лечение ( $p=0,101$ ) (см. рис. 84 Б, табл. 44). Тем не менее никто из больных с высоким риском не пережил 3 года.

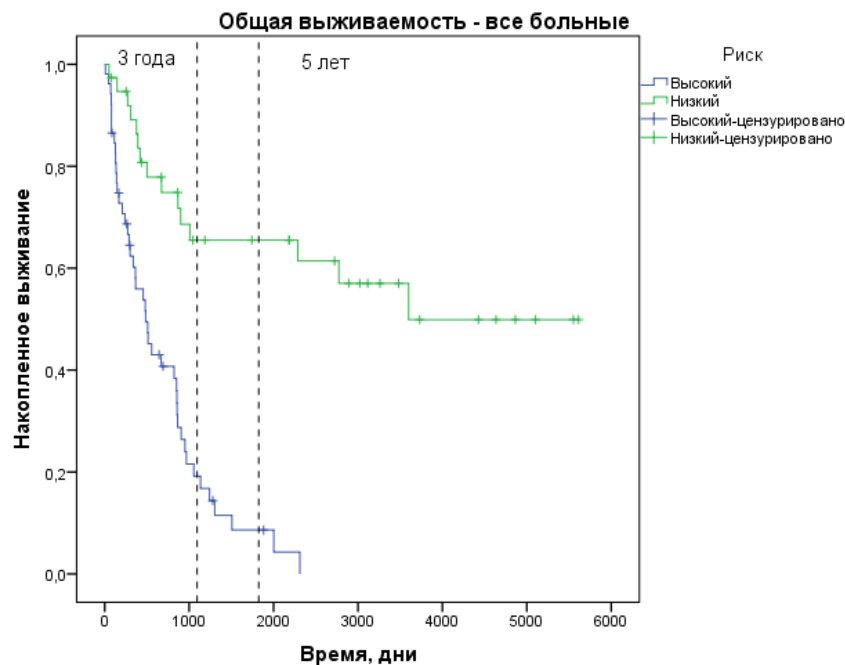


Рисунок 83 – Общая выживаемость всех пациентов, включенных в исследование, получавших иммунотерапию ГМВ и ДКВ, в зависимости от определенного уровня риска

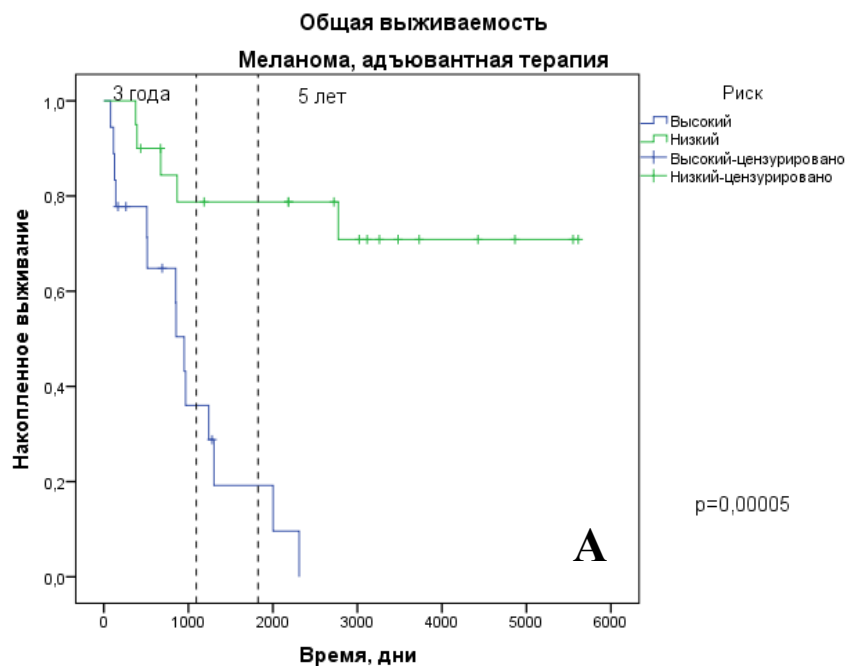


Рисунок 84 А – Общая выживаемость пациентов, получавших иммунотерапию ГМВ и ДКВ, в зависимости от определенного уровня риска:

А – ОВ пациентов с меланомой кожи, получавших адъювантную иммунотерапию

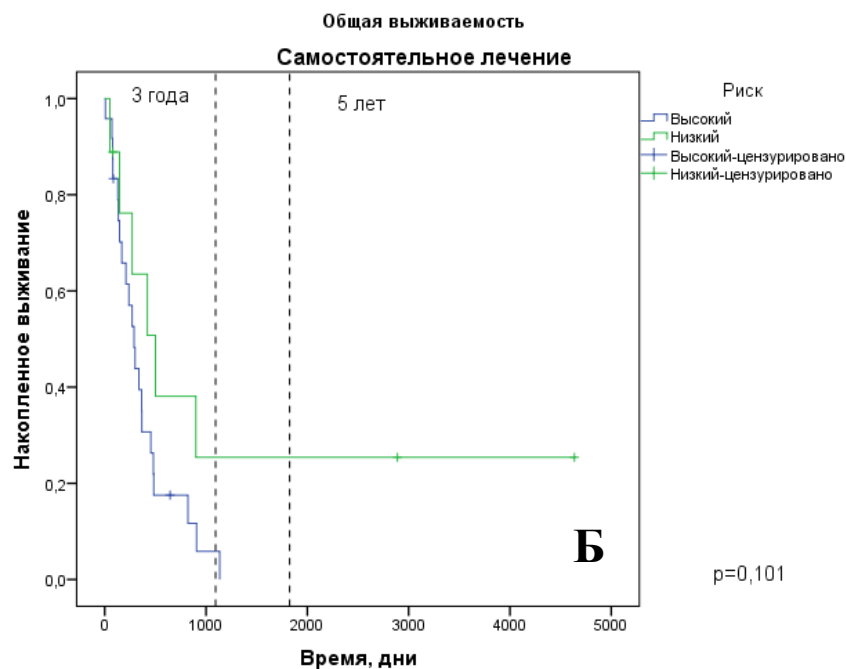


Рисунок 84 Б – Общая выживаемость пациентов, получавших иммунотерапию ГМВ и ДКВ, в зависимости от определенного уровня риска:

**Б** – ОВ пациентов с меланомой кожи, получавших иммунотерапию в самостоятельном режиме

Таблица 44 – Показатели выживаемости пациентов, получавших клеточную иммунотерапию ГМВ и ДКВ, в группах высокого и низкого риска

Показатель	Группа больных	Кол-во больных, n	Высокий риск	Низкий риск	p
Общая выживаемость, медиана, мес.	Все больные, n	99	15	38,7	$2 \cdot 10^{-5}$
	Меланома кожи, адъювантная терапия	38	30,3	НД	$5 \cdot 10^{-5}$
	Меланома кожи, самостоятельная системная терапия	33	9,5	16,5	0,101
Время до прогрессирования, мес.	Все больные, n	99	3,4	27	$2 \cdot 10^{-8}$
	Меланома кожи, адъювантная терапия	38	8,5	65,9	$8 \cdot 10^{-5}$
	Меланома кожи, самостоятельная системная терапия	33	2	4,7	0,021

*Примечание:* НД – не достигнута.

При построении аналогичных предыдущим моделям Кокса для прогнозирования ОВ и ВДП у больных МК, риск, основанный на количественном содержании ИСФ в супернатантах

культур опухолевых клеток больных, являлся независимым фактором прогноза ОВ и ВДП. У больных низкого риска ОР смерти составлял 0,227, ОР прогрессирования – 0,239 (табл. 45).

Таблица 45 – Многофакторный анализ выживаемости пациентов с МК, получавших клеточную иммунотерапию ГМВ и ДКВ, при комплексной оценке ИСФ

Фактор	ВДП			ОВ		
	ОР	95% ДИ	p	ОР	95% ДИ	p
Адьювантная терапия	0,259	0,135–0,427	$1*10^{-6}$	0,299	0,159–0,561	$1,7*10^{-4}$
Самостоятельное лечение	1			1		
Низкий риск	0,239	0,122–0,467	$2,8*10^{-5}$	0,227	0,107–0,484	0,0001
Высокий риск	1			1		

*Примечание:* значимость модели для ВДП:  $p=4,6*10^{-9}$ , для ОВ:  $p=2,7*10^{-10}$ .

Как показали наши исследования, ИСФ, которые продуцируются клетками злокачественных новообразований, могут быть использованы в качестве дополнительного источника биомаркеров при прогнозировании эффективности лечения. Благодаря технологическим особенностям метода приготовления клеточных противоопухолевых вакцин на основе собственных опухолевых клеток пациентов или аутологичных клеток иммунной системы, мы можем использовать этот источник биомаркеров – культуру малигнизированных клеток, которая подвергается трансфекции интересующими генами, или применяется как источник антигенов для нагрузки и активации ДК.

В иммунологически толерантном микроокружении опухоли может быть реализовано множество механизмов резистентности за счет повышения концентрации разнообразных биологически активных молекул: локально – в опухолевом очаге или на системном уровне – в кровотоке. Мы проанализировали секрецию четырех факторов (MICA, TGF- $\beta_1$ , IL-10 и VEGF), имеющих плеiotропные функции в организме и различные механизмы действия, но в высоких концентрациях способные блокировать специфическую активность АПК и ЦТЛ. Можно предложить как минимум три сценария действия ИСФ в контексте клеточной иммунотерапии. Первый из них – это ухудшение презентации антигена в месте инъекции клеточного противоопухолевого препарата, когда активная секреция ИСФ вакцинными клетками препятствует эффективной индукции иммунного ответа. Второй – высокая концентрация в опухолевом очаге ИСФ, которые препятствуют действиям активированных иммунных клеток. Третий – системная иммуносупрессия, вызванная этими факторами. Однако мы не обнаружили явных клинических признаков иммуносупрессии у пациентов, включенных в исследование. Тем не менее анализ клинической эффективности клеточной иммунотерапии

показал зависимость ОВ и ВДП больных от концентраций ИСФ в межклеточном окружении малигнизированных культур *in vitro*, что можно экстраполировать на ситуацию *in vivo*. При этом необходимо отметить, что иммуносупрессивное воздействие изученных факторов носит универсальный характер и не зависит от типа противоопухолевой вакцины (ГМВ или ДКВ), а также от типа злокачественного новообразования.

Полученные результаты анализа клинической эффективности клеточной иммунотерапии согласуются с экспериментальными результатами клеточного моделирования поведения ДК, которые продемонстрировали, что концентрация ИСФ, секретируемых клетками МК, ассоциирована с блокадой подвижности ДК человека, оцениваемой по скорости прохождения и длине траектории в модельной системе *in vitro*. Как и при моделировании *in vitro* иммунных синапсов было обнаружено, что индекс жизнеспособности клеток СМТ/ОС и МК при взаимодействии с активированными цитотоксическими Т-лимфоцитами коррелировал с концентрациями ИСФ (MICA, TGF- $\beta_1$ , IL-10, VEGF и др.) в модельной системе. Таким образом, экспериментальные данные убедительно демонстрируют важность этих критериев для изучения на клиническом уровне и представляют возможное биологическое объяснение выявленному нами феномену.

В наше исследование были включены пациенты с более тяжелым прогнозом, чем средняя популяция больных МК, описанная ранее [826]. Об этом свидетельствуют более низкие показатели выживаемости больных как низкого, так и более высокого риска. Вместе с тем обращает на себя внимание близость результатов, полученных в нашем исследовании, с результатами, полученными при применении анти-PD-1-терапии, которая является наиболее эффективной из имеющихся средств иммунотерапии в условиях реальной клинической практики [827; 828]. При анализе адъювантной терапии результаты применения вакцин в группе низкого риска существенно превосходили данные по адъювантной терапии анти-PD1-препаратами, полученными в реальных клинических условиях [828]. Так, в нашем исследовании медиана ВДП составила 65,9 мес., тогда как в исследовании P. Koelblinger и соавт. (2021) – 16,7 мес.

При сопоставлении с результатами применения самостоятельного лечения эффективность терапии практически не отличалась от анти-PD1-терапии в группе низкого риска по времени до прогрессирования: 4,7 мес. в нашем исследовании и 5,7 мес. в исследовании A. Arheden с соавт. (2019) соответственно, однако существенно уступала по показателям общей выживаемости (16,5 и 27 мес. соответственно) [827]. Причиной такого расхождения может быть время проведения нашего исследования, когда большинство включенных больных не имели доступа к современным методам терапии, продлевающим жизнь



у больных МК. Поэтому данные, полученные в нашей работе, могут рассматриваться как «чистый» эффект, без смещения от последующего эффективного лечения.

На сегодняшний день известно, что различные методы иммунотерапии обладают разным воздействием на ключевые иммунопатогенетические синдромы, сопровождающие развитие злокачественной опухоли [829–831]. Полученные нами результаты демонстрируют важность создания жестких критериев отбора пациентов для клеточной иммунотерапии с учетом биологических характеристик злокачественных опухолей. Уникальным источником такой информации для клеточной иммунотерапии могут стать культуры аутологичных опухолевых клеток. Наше исследование показало высокую предиктивную и прогностическую ценность продукции опухолевыми клетками ИСФ для клеточной иммунотерапии. Данная информация может быть использована на уровне пациента при планировании дальнейших исследований клеточных методов иммунотерапии, направленных на оптимизацию презентации опухолеассоциированных антигенов клеткам иммунной системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунная система играет ключевую роль в формировании биологических особенностей опухоли. В настоящее время не вызывает сомнений, что факт «ускользания» опухолевых клеток от воздействия иммунной системы является серьезным препятствием при разработке методов иммунотерапии злокачественных новообразований. Исследование биологии малигнизированных клеток может способствовать трансляции теоретического понимания патогенеза опухоли в клиническую практику [15]. Несмотря на то, что современные иммунотерапевтические подходы преследуют цель ингибировать эффекты «immune escape» в опухоли, уже продемонстрировано, что даже блокирование отдельных мишеней ускользания от иммунного ответа может с течением времени способствовать росту опухоли и приводить к ее дальнейшей диссеминации в организме больного. Стратегии, восстанавливающие способность иммунной системы распознавать и уничтожать злокачественные клетки, имеют клинический эффект только у отдельных категорий пациентов. Гетерогенность ответа на лечение связана со способностью опухолей адаптироваться к иммунному давлению за счет потери антигенности и иммуногенности, а также за счет их способности формировать иммуносупрессивное ТМЕ. В связи с этим так важно персонализировать противоопухолевую иммунотерапию. Здесь на первый план выходит поиск новых потенциальных биомаркеров для разработки клинических подходов и показателей ответа.

Клеточное моделирование *in vitro* позволяет изучать механизмы, лежащие в основе канцерогенеза и событий на клиническом уровне, таких как терапевтический эффект, резистентность, рецидивирование, метастазирование [832]. Мы получили и охарактеризовали культуры клеток злокачественных новообразований основных локализаций, выявили среди них наиболее перспективные для создания экспериментальных моделей. Изучение свойств культивируемых клеток солидных опухолей позволило обнаружить ряд общих закономерностей, касающихся изменения их антигенного и секреторного профиля при длительном культивировании, которое имитирует процессы эволюции опухоли в организме человека. Интересным фактом явилось выявление изменения секреторных свойств опухолевых клеток при изменении формата культивирования. Малигнизированные клетки, формирующие сфероиды, начинали нарабатывать повышенное количество хемокинов, привлекающих в опухолевое микроокружение клетки иммунной системы, такие как лимфоциты, NK-, NKT-клетки, нейтрофилы, макрофаги, и способствующих изменению их поляризации; цитокинов, обладающих иммуносупрессивными свойствами, такими как IL-10, лиганд активационного рецептора ЦТЛ и натуральных киллеров MICA. Полученные данные указывают на

необходимость выбора в процессе дальнейших исследований клеточных моделей, наиболее адекватно отражающих реальную клиническую ситуацию.

В наших исследованиях было также установлено, что моделирование условий, где клетки злокачественных новообразований могут проявлять миграционные и инвазивные свойства, позволяет выявить факторы, ассоциированные с этими процессами, которые возможно рассматривать как потенциальные мишени для терапевтических стратегий, ставящих своей целью воздействовать на метастатическую болезнь. Изучение субпопуляционного состава клеточных систем МК и СМТ/ОС, проявляющих различные инвазивные свойства, продемонстрировало наличие групп опухолевых клеток, различающихся по экспрессии рецепторов хемокинов CCR4, CCR7, CCR10, маркеров стволовых клеток опухоли, маркера пролиферации Ki-67. Введение в трехмерную систему фибробластов для имитации стромального компонента опухолевого узла и сравнение инвазии злокачественных клеток в трехмерной среде из гомо- и гетеросфероидов показало, что наблюдается корреляция скорости распространения гомосфероидов с присутствием ряда ИСФ, с одной стороны, и влиянием стромальных фибробластов на подвижность опухолевых клеток, с другой стороны.

Использование модельной системы, позволяющей оценить подвижность ДК, позволило установить, что скорость и направленность движения ДК зависит от концентрации ИСФ, продуцируемых клетками МК, что может указывать на факт воздействия злокачественного новообразования на миграцию ДК, в том числе вакцинных ДК, в организме пациента.

Проведенное нами исследование позволяет рассматривать ИСФ, продуцируемые опухолевыми клетками, как возможные прогностические и предиктивные факторы, которые могут определять эффективность противоопухолевой иммунотерапии и исход заболевания. Необходимо также анализировать и учитывать индивидуальный иммунный фенотип малигнизированных клеток пациентов и их способность нарабатывать продукты, позволяющие им направленно формировать благоприятное иммуносупрессивное ТМЕ, учитывая при этом, что эти процессы имеют динамический характер, обусловленный чрезвычайной пластичностью свойств злокачественных новообразований.

Полученные нами данные о закономерностях антигенных и метаболических модификаций клеток солидных опухолей в процессе длительного культивирования и сходстве их РТА-профиля позволили разработать новый универсальный клеточный продукт IRTAN-2018 для нагрузки и активации ДК при создании ДК-вакцин. Этот продукт состоит из равновесной смеси лизатов 9 клеточных линий МК с хорошими пролиферативными характеристиками, которые позволяют в короткий срок наращивать значительную клеточную массу и характеризуются высокой стабильной транскрипционной активностью 10 РТГ.

Использование IRTAN-2018 для активации ДК в экспериментальных условиях позволило получить генерацию РГА<sup>+</sup>-активированных ЦТЛ, реактивных по отношению к клеткам злокачественных новообразований других локализаций, в частности, СМТ/ОС, что является доказательством принципиальной возможности разработки универсального подхода к применению РГА<sup>+</sup>-активированных ДК-вакцин.

Перспективным направлением представляется также разработка и использование индивидуальных аутологичных клеточных моделей для прогноза эффективности существующей клеточной терапии и для разработки новых терапевтических подходов.

Совершенствование методов клеточной иммунотерапии, в том числе основанной на использовании АПК и связанной с восстановлением нарушенных звеньев противоопухолевого иммунного цикла, должно идти в направлении индивидуализации показаний к ее применению и поиска комбинаций с другими видами лечения.

## ВЫВОДЫ

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

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

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

4. Обнаружен факт сходства профилей экспрессии 10 РТГ клетками МК, сарком мягких тканей и остеогенных сарком (СМТ/ОС) и злокачественных новообразований эпителиального происхождения (ЭО), что позволяет использовать лизаты культивируемых клеток МК как источник раково-тестикулярных антигенов в клеточной иммунотерапии на основе активированных дендритных клеток (ДК). Создан новый клеточный препарат для нагрузки и активации ДК на основе равных долей лизатов 9 клеточных линий МК, обладающих гиперэкспрессией 10 РТГ.

5. Установлен факт повышенной продукции культивируемыми клетками солидных опухолей факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, ангиогенезом, инвазией, метастазированием, при этом количественные характеристики секреторного профиля ассоциированы с типом опухоли: клетки СМТ/ОС синтезировали в большем количестве VEGF-A, -C, -D, uPA, PAI-1, IGFBP-1, HGF, sEGFR и эндоглин, но в меньшем количестве – остеокальцин, чем клетки МК ( $p < 0,05$ ). Процесс длительного культивирования

(>20 пассажа) сопряжен с усилением секреторной активности опухолевых клеток в отношении лиганда MICA, TGF- $\beta_1$ , цитокина IL-10, независимо от типа злокачественного новообразования.

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

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

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

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

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

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

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АПК – антиген-презентирующие клетки  
 ВДП – время до прогрессирования  
 ГМВ – вакцина на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных геном *tag7/PGRP-S*  
 ДК – дендритные клетки  
 ДКВ – вакцина на основе аутологичных активированных дендритных клеток  
 ДЭ – достаточный клинический эффект  
 ИЖ – индекс жизнеспособности  
 ИСФ – факторы, ассоциированные с иммуносупрессией  
 КРР – колоректальный рак  
 МК – меланома кожи  
 МКАТ – моноклональные антитела  
 МНК – мононуклеарные клетки  
 НАДФ-Н – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-Н-оксидаза, клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс, локализующийся на плазматической мембране и в некоторых органеллах клеток  
 НДЭ – недостаточный клинический эффект  
 ОАА – опухолиассоциированные антигены  
 ОАМ – опухолиассоциированные макрофаги  
 ОВ – общая выживаемость  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 РМЖ – рак молочной железы  
 РМП – рак мочевого пузыря  
 РП – рак почки  
 РПЖ – рак предстательной железы  
 РТА – раково-тестикулярные антигены  
 РТГ – раково-тестикулярные гены  
 РЯ – рак яичников  
 СМТ/ОС – саркомы мягких тканей и остеогенные саркомы  
 СКО – стволовые клетки опухоли  
 СЭКРС – сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота  
 ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты  
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
 ЭО – опухоли эпителиального происхождения  
 ANG – ангиопоэтин  
 BSA – бычий сывороточный альбумин  
 САФ – опухолиассоциированные фибробласты  
 СЕА – раково-эмбриональный антиген  
 СК – цитокератин  
 DMSO – диметилсульфоксид  
 FDA – Food and Drug Administration, Министерство здравоохранения и социальных служб США  
 EGF – эпидермальный фактор роста  
 EGFR – рецепторы к эпидермальному фактору роста  
 ЕМА – эпителиальный мембранный антиген  
 FGF – фактор роста фибробластов  
 FST – фоллистатин  
 FLECH – культура фибробластов легкого эмбриона человека  
 GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор



gp100 – гликопротеин 100 или белок меланоцитов PMEL, который состоит из 661 аминокислоты и представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I, присутствующий в меланосомах, меланин-продуцирующих органеллах в меланоцитах

HB-EGF – heparin-binding EGF-like growth factor, гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста

HGF – фактор роста гепатоцитов

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией

HLA A/B/C – Human Leukocyte Antigens, группа антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса

HLA DP/DQ/DR – Human Leukocyte Antigens, группа антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса

IFN- $\gamma$  – интерферон-гамма

IGFBP – Insulin-like growth factor-binding protein, белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста

IL – интерлейкин

MCK – мультицитокератин

MDSC – myeloid-derived suppressor cells, супрессорные клетки миелоидного происхождения

Melan A – трансмембранный 18 кД белок, состоящий из 118 аминокислот, который находится на поверхности меланоцитов

MHC I – главный комплекс гистосовместимости I класса

MICA/B – MHC class I related-chain genes A and B, трансмембранные белки, лиганды рецептора NKG2D NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов

MIF – фактор ингибирования миграции макрофагов

MITF – microphthalmia-associated transcription factor, транскрипционный фактор, который вовлечен в перестройку сигнальных каскадов, необходимых для выживания и функционирования предшественников меланоцитов, остеокластов, тучных клеток и др.

Npr-1 – нейропилин-1

OSTP – остеопонтин

PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена, тип 1

PBS – фосфатно-солевой буфер

PECAM-1 – platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, гликопротеин, мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов, относится к классу молекул клеточной адгезии

PLGF – плацентарный фактор роста

RCC – renal cell carcinoma antigen, гликопротеин массой 200 кДа, локализованный в щеточной кайме проксимального отдела почечных канальцев, выявляется в 90% первичных и 85% метастатических почечно-клеточных карцином

S100 – мультигенное семейство низкомолекулярных гомо- и гетеродимерных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков, маркер меланомы

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3, сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT, который у человека кодируется геном *STAT3*.

TCR – Т-клеточный рецептор

TGF – трансформирующий фактор роста

TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

TME – опухолевое микроокружение

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$

TRP-1 – тирозиназоподобный белок 1

Tyros – тирозиназа

uPA – урокиназный активатор плазминогена

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations / J.L. Perez-Gracia, S. Labiano, M.E. Rodriguez-Ruiz [et al.] // *Current Opinion in Immunology*. – 2014. – Vol. 27, № 1. – P. 89–97.
2. Cancer-Associated Immune Resistance and Evasion of Immune Surveillance in Colorectal Cancer / P. Parcesepe, G. Giordano, C. Laudanna [et al.] // *Gastroenterology Research and Practice*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–8.
3. Ozga, A.J. Chemokines and the immune response to cancer / A.J. Ozga, M.T. Chow, A.D. Luster // *Immunity*. – 2021. – Vol. 54, № 5. – P. 859–874.
4. An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer / T. Karasaki, K. Nagayama, H. Kuwano [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2017. – Vol. 12, № 5. – P. 791–803.
5. Massagué, J. Metastasis-initiating cells and ecosystems / J. Massagué, K. Ganesh // *Cancer Discov.* – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 971–994.
6. Desai, R. Therapeutic applications of the cancer immunoediting hypothesis / R. Desai, A.T. Coxon, G.P. Dunn // *Semin. Cancer Biol.* – 2022. – Vol. 78. – P. 63–77.
7. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment. Vol. 13 / B. LV, Y. Wang, D. Ma [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers Immunology*. – 2022. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35874717/> (date accessed: 26.09.2022).
8. Strategy to targeting the immune resistance and novel therapy in colorectal cancer / W. Gang, J.J. Wang, R. Guan [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2018. – Vol. 7, № 5. – P. 1578–1603.
9. Jenkins, R.W. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors / R.W. Jenkins, D.A. Barbie, K.T. Flaherty // *British Journal of Cancer*. – 2018. – Vol. 118, № 1. – P. 9–16.
10. Seliger, B. Immune therapy resistance and immune escape of tumors / B. Seliger, C. Massa // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 3. – P. 1–16.
11. Wilczyński, J.R. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors / J.R. Wilczyński, M. Nowak. – Text: electronic // *Exp. Suppl.* – 2022. – Vol. 113. – P. 1–57. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35165859/> (date accessed: 07.04.2022).
12. Hui, L. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil / L. Hui, Y. Chen // *Cancer Letters*. – 2015. – Vol. 368, № 1. – P. 7–13.
13. Arneth, B. Tumor microenvironment / B. Arneth. – Text: electronic // *Medicina (Kaunas)*, 2020. – Vol. 56, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31906017/> (date accessed: 28.09.2021).
14. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions / D. Hanahan // *Cancer Discov.* – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 31–46.
15. Understanding of Immune Escape Mechanisms and Advances in Cancer Immunotherapy / N. Aktar, C. Yueting, M. Abbas [et al.]. – Text: electronic // *J. Oncol.* – 2022. – Vol. 2022. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35401745/> (date accessed: 16.06.2022).
16. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms / C.C. Maley, A. Aktipis, T.A. Graham [et al.] // *Nature Reviews Cancer*. – 2017. – Vol. 17, № 10. – P. 605–619.
17. Metastasis in context: Modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches / J.J.F. Sleeboom, H.E. Amirabadi, P. Nair [et al.] // *DMM Disease Models and Mechanisms*. – 2018. – Vol. 11, № 3. – P. dmm033100.
18. Dumitru, C.A. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: Mechanisms and consequences for tumor progression / C.A. Dumitru, S. Lang, S. Brandau // *Seminars in Cancer Biology*. – 2013. – Vol. 23, № 3. – P. 141–148.
19. Targeting the microenvironment in solid tumors / C. Belli, D. Trapani, G. Viale [et al.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2018. – Vol. 65. – P. 22–32.
20. Adjei, I. Modulation of the Tumor Microenvironment for Cancer Treatment: A Biomaterials Approach / I. Adjei, S. Blanka // *J. Functional Biomaterials*. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 81–103.

21. Denk, D. Inflammation: the incubator of the tumor microenvironment / D. Denk, F.R. Greten. – Text : electronic // Trends Cancer. 2022. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35907753/> (date accessed: 26.09.2022).
22. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression / R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, K. Arihiro // Cancer Research. – 2006. – Vol. 66, № 11. – P. 5527–5536.
23. 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 // Current Opinion in Immunology. – 2014. – Vol. 27, № 1. – P. 16–25.
24. O'Donnell, J.S. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy / J.S. O'Donnell, M.W.L. Teng, M.J. Smyth // Nature Publishing Group. – 2019. – Vol. 16, № 3. – P. 151–167.
25. From mice to humans: Developments in cancer immunoediting / M.W.L. Teng, J. Galon, W.H. Fridman, M.J. Smyth // J. Clin. Invest. – 2015. – Vol. 125, № 9. – P. 3338–3346.
26. Bai, R. Development of Immunotherapy Strategies Targeting Tumor Microenvironment Is Fiercely Ongoing / R. Bai, J. Cui. – Text : electronic // Front. Immunol. – 2022. – Vol. 13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35833121/> (date accessed: 26.09.2022).
27. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition / J.S. O'Donnell, G.V. Long, R.A. Scolyer [et al.] // Cancer Treat. Rev. – 2017. – Vol. 52. – P. 71–81.
28. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy / P. Sharma, S. Hui-Lieskovan, J.A. Wargo, A. Ribas // Cell. – 2017. – Vol. 168, № 4. – P. 707–723.
29. Hegde, P.S. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy / P.S. Hegde, D.S. Chen // Immunity. – 2020. – Vol. 52, № 1. – P. 17–35.
30. Schultz, L. Mechanisms of and approaches to overcoming resistance to immunotherapy / L. Schultz, R. Gardner. – Text : electronic // Hematology (United States). – 2019. – Vol. 2019, № 1. – P. 226–232. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31808880/> (date accessed: 26.08.2021).
31. Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- $\beta$  signaling pathway / D.Y. Sun, J.Q. Wu, Z.H. He [et al.]. – Text : electronic // Life Sci. – 2019. – Vol. 235. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31465732/> (date accessed: 05.08.2020).
32. Chen, D.S. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle / D.S. Chen, I. Mellman // Immunity. – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 1–10.
33. Starzer, A.M. Immune escape mechanisms and therapeutic approaches in cancer: the cancer-immunity cycle / A.M. Starzer, M. Preusser, A.S. Berghoff. – Text : electronic // Ther Adv. Med. Oncol. – 2022. – Vol. 14. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35510032/> (date accessed: 16.06.2022).
34. Aspects of the Tumor Microenvironment Involved in Immune Resistance and Drug Resistance / K. Khalaf, D. Hana, J.T.T. Chou [et al.] // Front. Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 1764.
35. Cancer Cell Phenotype Plasticity as a Driver of Immune Escape in Melanoma / V. Benboubker, F. Boivin, S. Dalle, J. Caramel. – Text : electronic // Front. Immunol. – 2022. – Vol. 13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35432344/> (date accessed: 16.06.2022).
36. Overcoming resistance to tumor-targeted and immune-targeted therapies / M. Aldea, F. Andre, A. Marabelle [et al.] // Cancer Discov. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 874–899.
37. Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening / K.V. Kitaeva, C.S. Rutland, A.A. Rizvanov, V.V. Solovyeva. – Text : electronic // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2020. – Vol. 8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32328489/> (date accessed: 16.08.2021).
38. Burnet, M. Cancer-A Biological Approach\* Iii. Viruses Associated With Neoplastic Conditions / M. Burnet // British Medical Journal. – 1957. – Vol. 1, № 5023. – P. 841–847.
39. Phoon, Y.P. Immunobiology of Melanoma / Y.P. Phoon, C. Tannenbaum, C.M. Diaz-Montero // Clin. Plast. Surg. – 2021. – Vol. 48, № 4. – P. 561–576.
40. 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.

41. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape / G.P. Dunn, A.T. Bruce, H. Ikeda [et al.] // *Nature Immunology*. – 2002. – Vol. 3, № 11. – P. 991–998.
42. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting / G.P. Dunn, A.T. Bruce, K.C.F. Sheehan [et al.] // *Nature Immunology*. – 2005. – Vol. 6, № 7. – P. 722–729.
43. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting / M. Dupage, C. Mazumdar, L.M. Schmidt [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 482, № 7385. – P. 405–409.
44. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories / D. Ribatti // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 4. – P. 7175–7180.
45. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations / P.C. Nowell // *Science*. – 1976. – Vol. 194, № 4260. – P. 23–28.
46. Signatures of mutational processes in human cancer / L.B. Alexandrov, S. Nik-Zainal, D.C. Wedge [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 500, № 7463. – P. 415–421.
47. Messerschmidt, J.L. Cancer Clonal Theory, Immune Escape, and Their Evolving Roles in Cancer Multi-Agent Therapeutics / J.L. Messerschmidt, P. Bhattacharya, G.L. Messerschmidt // *Current Oncology Reports*. – 2017. – Vol. 19, № 10. – P. 66.
48. Arenas-Ramirez, N. Epigenetic mechanisms of tumor resistance to immunotherapy / N. Arenas-Ramirez, D. Sahin, O. Boyman // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – Vol. 75, № 22. – P. 4163–4176.
49. Molecular pathways: At the crossroads of cancer epigenetics and immunotherapy / M. Maio, A. Covre, E. Fratta [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21, № 18. – P. 4040–4047.
50. Majzner, R.G. Tumor antigen escape from car t-cell therapy / R.G. Majzner, C.L. Mackall // *Cancer Discovery*. – 2018. – Vol. 8, № 10. – P. 1219–1226.
51. The immune microenvironment: A major player in human cancers / W.H. Fridman, R. Remark, J. Goc [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2014. – Vol. 164, № 1. – P. 13–26.
52. Natural killer cells in cancer biology and therapy / S.Y. Wu, T. Fu, Y.Z. Jiang, Z.M. Shao. – Text : electronic // *Mol. Cancer*. – 2020. – Vol. 19. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32762681/> (date accessed: 12.07.2022).
53. Pellicci, D.G. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and  $\gamma\delta$  T cells emerge / D.G. Pellicci, H.F. Koay, S.P. Berzins // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 20, № 12. – P. 756–770.
54. Kufer, T.A. A Brief Introduction to Effector-Triggered Immunity / T.A. Kufer, M. Kaparakis-Liaskos. – Text : electronic // *Methods in Molecular Biology*. – 2022. – Vol. 2523. – P. 1–8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35759187/> (date accessed: 12.07.2022).
55. Chang, R.B. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance / R.B. Chang, G.L. Beatty // *J. Leukoc. Biol.* – 2020. – Vol. 108, № 1. – P. 363–376.
56. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: A review / D. Jorgovanovic, M. Song, L. Wang, Y. Zhang – Text : electronic // *Biomark. Res.* – 2020. – Vol. 8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33005420/> (date accessed: 12.07.2022).
57. Motz, G.T. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression / G.T. Motz, G. Coukos // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 61–73.
58. Evidence of immune elimination, immuno-editing and immune escape in patients with hematological cancer / M.O. Holmström, S. Cordua, V. Skov [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2020. – Vol. 69, № 2. – P. 315–324.
59. Patel, S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation / S. Patel. – Text : electronic // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2018. – Vol. 18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30267163/> (date accessed: 26.09.2022).
60. Heat Shock Proteins Regulating Toll-like Receptors and the Immune System could be a Novel Therapeutic Target for Melanoma / N. Shomali, L.S. Hatamnezhad, S. Tarzi [et al.]. – Text : electronic // *Current Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 21, № 1. – P. 15–24.

61. Toll-like receptors and toll-like receptor-targeted immunotherapy against glioma / Y. Xun, H. Yang, B. Kaminska, H. You. – Text : electronic // *J. Hematol. Oncol.* – 2021. – Vol. 14, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34715891/> (date accessed: 2 6.09.2022).
62. NF- $\kappa$ B pathways in the development and progression of colorectal cancer / M. Patel, P.G. Horgan, D.C. McMillan, J. Edwards // *Transl. Res.* – 2018. – Vol. 197, P. 43–56.
63. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer / M.H. Mannino, Z. Zhu, H. Xiao [et al.] // *Cancer Letters.* – 2015. – Vol. 367, № 2. – P. 103–107.
64. Battle, E. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in immunity and cancer / E. Battle, J. Massagué // *Immunity.* – 2019. – Vol. 50, № 4. – P. 924–940.
65. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: From tumor tolerance to eradication / S.A. Quezada, K.S. Peggs, T.R. Simpson, J.P. Allison // *Immunological Reviews.* – 2011. – Vol. 241, № 1. – P. 104–118.
66. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon  $\gamma$  / S.E.A. Street, J.A. Trapani, D. MacGregor, M.J. Smyth // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196, № 1. – P. 129–134.
67. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity / V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 410, № 6832. – P. 1107–1111.
68. Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice / I.M. Svane, A.M. Engel, M.B. Nielsen [et al.] // *European Journal of Immunology.* – 1996. – Vol. 26, № 8. – P. 1844–1850.
69. Current progress in cancer immunotherapy based on natural killer cells / Y. Bagheri, A. Barati, A. Aghebati-Maleki [et al.] // *Cell. Biol. Int.* – 2021. – Vol. 45, № 1. – P. 2–17.
70. MacKie, R.M. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery / R.M. MacKie, R. Reid, B. Junor // *New Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348, № 6. – P. 567–568.
71. Cankovic, M. Use of microsatellite analysis in detection of tumor lineage as a cause of death in a liver transplant patient / M. Cankovic, M.D. Linden, R.J. Zarbo // *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* – 2006. – Vol. 130, № 4. – P. 529–532.
72. Transmission of Donor-Derived Small-Cell Carcinoma Cells by a Nontumor-Bearing Allograft / C. Morath, P. Rohmeiss, V. Schwenger [et al.] // *Transpl.* – 2005. – Vol. 80, № 4. – P. 540–542.
73. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome / W.H. Fridman, F. Pagès, C. Sauts-Fridman, J. Galon // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 298–306.
74. Beatty, G.L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy / G.L. Beatty, W.L. Gladney // *Clinical Cancer Research.* – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 687–692.
75. Jhunjhunwala, S. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion / S. Jhunjhunwala, C. Hammer, L. Delamarre // *Nature Research.* – 2021. – Vol. 21, № 5. – P. 298–312.
76. Fearon, E.R. A genetic model for colorectal tumorigenesis / E.R. Fearon, B. Vogelstein // *Cell.* – 1990. – Vol. 61, № 5. – P. 759–767.
77. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies / D.S. Vinay, E.P. Ryan, G. Pawelec [et al.] // *Seminars in Cancer Biology.* – 2015. – Vol. 35. – P. S185–S198.
78. Park, J.H. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets / J.H. Park, W.Y. Pyun, H.W. Park. – Text : electronic // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081387/> (date accessed: 26.09.2022).
79. Cellular Immune Responses and Immune Escape Mechanisms in Breast Cancer: Determinants of Immunotherapy / C. Domschke, A. Schneeweiss, S. Stefanovic [et al.] // *Breast Care.* – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 102–107.
80. Seliger, B. Molecular mechanisms of HLA class I-mediated immune evasion of human tumors and their role in resistance to immunotherapies / B. Seliger // *Blackwell Publishing Ltd.* – 2016. – Vol. 88, № 5. – P. 213–220.
81. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype / F. Garrido, I. Romero, N. Aptsiauri, A.M. Garcia-Lora // *Int. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 138, № 2. – P. 271–280.

82. Garrido, F. Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases / F. Garrido, N. Aptsiauri // *Immunology*. – 2019. – Vol. 158, № 4. – P. 255–266.
83. HLA class I expression in metastatic melanoma correlates with tumor development during autologous vaccination / T. Cabrera, E. Lara, J.M. Romero [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2007. – Vol. 56, № 5. – P. 709–717.
84. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells / R. Carretero, T. Cabrera, H. Gil [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 129, № 4. – P. 839–846.
85. Immune escape from NY-ESO-1-specific T-cell therapy via loss of heterozygosity in the MHC / Z.K. Klippel, J. Chou, A.M. Towlerton [et al.] // *Gene Ther.* – 2014. – Vol. 21, № 3. – P. 337–342.
86. Suppression of Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer through Depletion of Notch- and Hedgehog-Dependent Tumor-Initiating Cells / J. Domingo-Domenech, S.J. Vidal, V. Rodriguez-Bravo [et al.] // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 373–388.
87. Conserved Interferon- $\gamma$  Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma / C.S. Grasso, J. Tsoi, M. Onyshchenko [et al.] // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 38, № 4. – P. 500–515.e3.
88. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma / S.J. Rodig, D. Gusenleitner, D.G. Jackson [et al.]. – Text : electronic // *Sci. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 10, № 450. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30021886/> (date accessed: 16.06.2022).
89. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis / J. Yu, M. Ni, J. Xu [et al.] // *BMC Cancer*. – 2002. – Vol. 2, № 1. – P. 29.
90. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016 a systematic analysis for the global burden of disease study global burden of disease cancer collaboration / C. Fitzmaurice, T.F. Akinyemiju, F.H. Al Lami [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2018. – Vol. 4, № 11. – P. 1553–1568.
91. Epigenetic induction of adaptive immune response in multiple myeloma: Sequential azacitidine and lenalidomide generate cancer testis antigen-specific cellular immunity / A.A. Toor, K.K. Payne, H.M. Chung [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2012. – Vol. 158, № 6. – P. 700–711.
92. NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma / L. von Boehmer, M. Mattle, P. Bode [et al.] // *Cancer Immun.* – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 12–13.
93. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage / C. Barrow, J. Browning, D. MacGregor [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12, № 3, pt. 1. – P. 764–771.
94. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer / J.M. Cejalvo, E. Martínez de Dueñas, P. Galván [et al.] // *Cancer Research*. – 2017. – Vol. 77, № 9. – P. 2213–2221.
95. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab / N. Riaz, J.J. Havel, V. Makarov [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171, № 4. – P. 934–949.e15.
96. Neoantigen-based cancer immunotherapy / S. Bobisse, P.G. Foukas, G. Coukos, A. Harari // *Annals of Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 4, № 14. – P. 262.
97. Hutchison, S. Identifying neoantigens for use in immunotherapy / S. Hutchison, A.L. Pritchard // *Mammalian Genome*. – 2018. – Vol. 29, № 11–12. – P. 714–730.
98. Schumacher, T.N. Cancer Neoantigens / T.N. Schumacher, W. Scheper, P. Kvistborg // *Annu. Rev. Immunol.* – 2019. – Vol. 37. – P. 173–200.
99. Exome sequencing to predict neoantigens in melanoma / A.L. Pritchard, J.G. Burel, M.A. Neller [et al.] // *Cancer Immunology Research*. – 2015. – Vol. 3, № 9. – P. 992–998.
100. The neoepitope landscape in pediatric cancers / T.-C. Chang, R.A. Carter, Y. Li [et al.] // *Genome Medicine*. – 2017. – Vol. 9, № 1. – P. 78.

101. Targeting neoantigens for cancer immunotherapy / X. Zhao, X. Pan, Y. Wang, Y. Zhang. – Text : electronic // *Biomark. Res.* – 2021. – Vol. 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34321091/> (date accessed: 26.09.2022).
102. Challenges targeting cancer neoantigens in 2021: a systematic literature review / I. Chen, M.Y. Chen, S.P. Goedegebuure, W.E. Gillanders // *Expert Review of Vaccines*. Taylor and Francis Ltd. – 2021. – Vol. 20, № 7. – P. 827–837.
103. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma / A. Snyder, V. Makarov, T. Merghoub [et al.] // *New Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371, № 23. – P. 2189–2199.
104. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer / N.A. Rizvi, M.D. Hellmann, A. Snyder [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 348, № 6230. – P. 124–128.
105. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer / M.D. Vesely, M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, M.J. Smyth // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 29, № 1. – P. 235–271.
106. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update / N. Vigneron, V. Stroobant, B.J. Van den Eynde, P. van der Bruggen // *Cancer Immunity*. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 15.
107. Tumor-associated antigens characterized in a conceptual framework of biology, microenvironment, and therapy / P. Straten, D. Schrama, J.C. Becker, M. Hald Andersen // *Tumor Immunology and Immunotherapy* / ed. R. C. Rees. – Oxford University Press, 2014. – P. 189–202.
108. Sherr, C.J. Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy / C.J. Sherr, D. Beach, G.I. Shapiro // *Cancer Discov.* – 2016. – Vol. 6, № 4. – P. 353–367.
109. McCormick, F. K-Ras protein as a drug target / F. McCormick // *J. Mol. Med. (Berl.)*. – 2016. – Vol. 94, № 3. – P. 253–258.
110. Lebrun, H. Therapeutic implications of B-RAF mutations in colorectal cancer / H. Lebrun, A. Turpin, P. Zerbib // *J. Visc. Surg.* – 2021. – Vol. 158, № 6. – P. 487–496.
111. Butterfield, L.H. Lessons learned from cancer vaccine trials and target antigen choice / L.H. Butterfield // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2016. – Vol. 65, № 7. – P. 805–812.
112. Cancer/Testis Antigens as Biomarker and Target for the Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Lung Cancer / P. Yang, Y. Qiao, M. Meng, Q. Zhou. – Text : electronic // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35574342/> (date accessed: 21.06.2022).
113. Trace of survivin in cancer / F. Shojaei, F. Yazdani-Nafchi, M. Banitalebi-Dehkordi [et al.] // *European Journal of Cancer Prevention*. – 2019. – Vol. 28, № 4. – P. 365–372.
114. Combined RNA/tissue profiling identifies novel Cancer/testis genes / S.P. Jamin, F. Hikmet, R. Mathieu [et al.] // *Molecular Oncology*. – 2021. – Vol. 15, № 11. – P. 3003–3023.
115. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers / A. Salmaninejad, M.R. Zamani, M. Pourvahedi [et al.] // *Immunological Investigations*. – 2016. – Vol. 45, № 7. – P. 619–640.
116. CTpedia [Electronic resource]. – URL: <http://www.cta.lncc.br/index.php> (accessed: 20.09.2021).
117. A novel era of cancer/testis antigen in cancer immunotherapy / X. Meng, X. Sun, Z. Liu, Y. He. – Text : electronic // *Int. Immunopharmacol.* – 2021. – Vol. 98. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34174699/> (date accessed: 20.09.2021).
118. The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer / Y. Xu, R. Zou, J. Wang [et al.]. – Text : electronic // *Cell. Prolif.* – 2020. – Vol. 53, № 3. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32022332/> (date accessed: 21.09.2021).
119. Cancer/testis antigens: from serology to mRNA cancer vaccine / C. Fan, H. Qu, X. Wang [et al.]. – Text : electronic // *Seminars in Cancer Biology*. – 2021. – Vol. 76. – P. 218–231.
120. Yang, P. Oncogenic cancer/testis antigens are a hallmark of cancer and a sensible target for cancer immunotherapy / P. Yang, M. Meng, Q. Zhou // *Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 1876, № 1. – P. 188558.
121. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis / A.I. Riker, S.A. Enkemann, O. Fodstad [et al.] // *BMC Medical Genomics*. – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 13.

122. Ghafouri-Fard, S. Expression of cancer-testis antigens in stem cells: is it a potential drawback or an advantage in cancer immunotherapy / S. Ghafouri-Fard // *APJCP*. – 2015. – Vol. 16, № 7. – P. 3079–3081.
123. Whitehurst, A.W. Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer / A.W. Whitehurst // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2014. – Vol. 54, № 1. – P. 251–272.
124. Раково-тестикулярные антигены в диагностике опухолей толстой кишки / О.И. Кит, К.И. Солдатова, Д.С. Кутилин, Д.И. Водолажский // *Современные проблемы науки и образования*. – 2018. – № 2. – С. 10.
125. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential / E. Fratta, S. Coral, A. Covre [et al.] // *Molecular Oncology*. – 2011. – Vol. 5, № 2. – P. 164–182.
126. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression / O. Hofmann, O.L. Caballero, B.J. Stevenson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105, № 51. – P. 20422–20427.
127. Akers, S.N. Regulation of cancer germline antigen gene expression: Implications for cancer immunotherapy / S.N. Akers, K. Odunsi, A.R. Karpf // *Future Oncology*. – 2010. – Vol. 6, № 5. – P. 717–732.
128. Gordeeva, O. Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy / O. Gordeeva // *Seminars in Cancer Biology*. – 2018. – Vol. 53. – P. 75–89.
129. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia / J.P. Radich, H. Dai, M. Mao [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, № 8. – P. 2794–2799.
130. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: Correlation with tumor grade / T. Kurashige, Y. Noguchi, T. Saika [et al.] // *Cancer Research*. – 2001. – Vol. 61, № 12. – P. 4671–4674.
131. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma / F. Brasseur, D. Rimoldi, D. Liénard [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 1995. – Vol. 63, № 3. – P. 375–380.
132. NY-ESO-1 as a diagnostic and prognostic marker for myxoid liposarcoma / U. Jo, J. Roh, M.J. Song [et al.]. – Text : electronic // *American Journal of Translational Research*. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 1268–1278. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35273728/> (date accessed: 21.06.2022).
133. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: Down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression / G. Cronwright, K. Le Blanc, C. Götherström [et al.] // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65, № 6. – P. 2207–2215.
134. Bloom, J.E. SSX2 regulates focal adhesion but does not drive the epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer / J.E. Bloom, D.G. McNeel // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 32. – P. 50997–51011.
135. Cancer/Testis Antigens Trigger Epithelial-Mesenchymal Transition and Genesis of Cancer Stem-Like Cells / P. Yang, Z. Huo, H. Liao, Q. Zhou // *Current Pharmaceutical Design*. – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 1292–1300.
136. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review / M.R. Abbaszadegan, V. Bagheri, M.S. Razavi [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2017. – Vol. 232, № 8. – P. 2008–2018.
137. Downregulation of PRAME Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Through the Activation of P53 Mediated Pathway / H. Zhu, J. Wang, J. Yin [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 45, № 3. – P. 1121–1135.
138. Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку PRAME / Н.А. Лыжко, В.А. Мисюрин, Ю.П. Финашутина [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 53–58.
139. VAP31, a newly defined cancer/testis antigen, regulates proliferation, migration, and invasion to promote cervical cancer progression / E. Dang, S. Yang, C. Song [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2018. – Vol. 9, № 8. – P. 791.



140. The cancer-testis antigens SPANX-A/C/D and CTAG2 promote breast cancer invasion / E.A. Maine, J.M. Westcott, A.M. Prechtl [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 12. – P. 14708–14726.
141. Cancer/testis antigens (CTAs) expression in resected lung cancer / S. Jin, S. Cao, J. Li [et al.] // *OncoTargets and Therapy*. – 2018. – Vol. 11. – P. 4491–4499.
142. Meinhardt, A. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege / A. Meinhardt, M.P. Hedger // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2011. – Vol. 335, № 1. – P. 60–68.
143. Chodon, T. Active Immunotherapy of Cancer / T. Chodon, R. C. Koya, K. Odunsi // *Immunological Investigations*. – 2015. – Vol. 44, № 8. – P. 817–836.
144. Medullary Epithelial Cells of the Human Thymus Express a Highly Diverse Selection of Tissue-specific Genes Colocalized in Chromosomal Clusters / J. Gotter, B. Brors, M. Hergenahn, B. Kyewski // *Journal of Experimental Medicine*. – 2004. – Vol. 199, № 2. – P. 155–166.
145. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy / A. Raza, M. Merhi, V. P. Inchakalody [et al.] // *BioMed Central Ltd.* – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 140.
146. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives / R. Thomas, G. Al-Khadairi, J. Roelands [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 947.
147. Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer / A. Wadle, B. Kubuschok, J. Imig [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2006. – Vol. 119, № 1. – P. 117–125.
148. Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer / A. Mischo, B. Kubuschok, K. Ertan [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 118, № 3. – P. 696–703.
149. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients / R.B. Parmigiani, F. Bettoni, M.D. Vibranovski [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 103, № 48. – P. 18066–18071.
150. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation / D. Atanackovic, J. Arfsten, Y. Cao [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, № 3. – P. 1103–1112.
151. Functions of anti-MAGE T-cells induced in melanoma patients under different vaccination modalities / T. Connerotte, A. Van Pel, D. Godelaine [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68, № 10. – P. 3931–3940.
152. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia / O. Goodyear, A. Agathangelou, I. Novitzky-Basso [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, № 11. – P. 1908–1918.
153. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma / H. Nishikawa, Y. Maeda, T. Ishida [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, № 13. – P. 3097–3104.
154. Cancer testis antigen PRAME: An anti-cancer target with immunomodulatory potential / A. Naik, R. Thomas, G. Al-Khadairi [et al.]. – Text: electronic // *J. Cell. Mol. Med.* – 2021. – Vol. 25, № 22. – P. 10376–10388. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34612587/> (date accessed: 26.09.2022).
155. Local and systemic immunosuppression in pancreatic cancer: Targeting the stalwarts in tumor's arsenal / C.S. Mundry, K.C. Eberle, P.K. Singh [et al.]. – Text: electronic // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. – 2020. – Vol. 1874, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32579889/> (date accessed: 12.07.2022).
156. Speiser, D.E. Regulatory circuits of T cell function in cancer / D.E. Speiser, P.C. Ho, G. Verdeil // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – Vol. 16, № 10. – P. 599–611.
157. Schmielau, J. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients / J. Schmielau, M.A. Nalesnik, O.J. Finn // *Clin. cancer res.* – 2001. – Vol. 7, № 3, Suppl. – P. 933s–939s.

158. Tumor Infiltrating Lymphocytes in Uveal Melanoma: A Link with Clinical Behavior? / S. Staibano, M. Mascolo, F. Tranfa [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 171–179.
159. Immunosuppression in renal cancer: differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes / A. Riccobon, R. Gunelli, R. Ridolfi [et al.] // *Cancer Investigation.* – 2004. – Vol. 22, № 6. – P. 871–877.
160. Loss of T-cell receptor-CD3zeta and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma / D.C. Lockhart, A.K. Chan, S. Mak [et al.] // *Surgery.* – 2001. – Vol. 129, № 6. – P. 749–756.
161. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma / T.E. Reichert, R. Day, E.M. Wagner, T.L. Whiteside // *Cancer Research.* – 1998. – Vol. 58, № 23. – P. 5344–5347.
162. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer / S.L. Topalian, F.S. Hodi, J.R. Brahmer [et al.] // *New Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, № 26. – P. 2443–2454.
163. Thommen, D.S. T Cell Dysfunction in Cancer / D.S. Thommen, T.N. Schumacher // *Cancer Cell.* – 2018. – Vol. 33, № 4. – P. 547–562.
164. Tumor-induced apoptosis of T lymphocytes: Elucidation of intracellular apoptotic events / B.R. Gastman, D.E. Johnson, T.L. Whiteside, H. Rabinowich // *Blood.* – 2000. – Vol. 95, № 6. – P. 2015–2023.
165. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes / J.W. Kim, E. Wieckowski, D.D. Taylor [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, № 3. – P. 1010–1020.
166. Buonaguro, L. Selecting target antigens for cancer vaccine development / L. Buonaguro, M. Tagliamonte. – Text: electronic // MDPI. – 2020. – Vol. 8, № 4. – P. 1–14. – URL: [/pmc/articles/PMC7711972/](https://pmc/articles/PMC7711972/) (date accessed: 22.09.2021).
167. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease / K. Shah, A. Al-Haidari, J. Sun, J.U. Kazi // Nature Publishing Group. – 2021. – Vol. 6. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00823-w> (date accessed: 26.09.2022).
168. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses / P.C. Ho, J.D. Bihuniak, A.N. MacIntyre [et al.] // *Cell.* – 2015. – Vol. 162, № 6. – P. 1217–1228.
169. Molon, B. T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity / B. Molon, B. Cali, A. Viola // *Frontiers in Immunology.* – 2016. – Vol. 7. – P.20.
170. Martínez-Reyes, I. Cancer metabolism: looking forward / I. Martínez-Reyes, N.S. Chandel // *Nat. Rev. Cancer.* – 2021. – Vol. 21, № 10. – P. 669–680.
171. From tumor cell metabolism to tumor immune escape / M. Villalba, M.G. Rathore, N. Lopez-Royuela [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 106–113.
172. Modulation of human T-cell functions by reactive nitrogen species / T. Kasic, P. Colombo, C. Soldani [et al.] // *European Journal of Immunology.* – 2011. – Vol. 41, № 7. – P. 1843–1849.
173. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide / A. Predonzani, B. Cali, H.R. Agnellini, B. Molon // *World Journal of Experimental Medicine.* – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 64.
174. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells / B. Molon, S. Ugel, F. Del Pozzo [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208, № 10. – P. 1949–1962.
175. Liu, X.H. Role of tryptophan metabolism in cancers and therapeutic implications / X.H. Liu, X.Y. Zhai // *Biochimie. Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 182. – P. 131–139.
176. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients / G. Weinlich, C. Murr, L. Richardsen [et al.] // *Dermatology.* – 2006. – Vol. 214, № 1. – P. 8–14.
177. Meireson, A. IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? / A. Meireson, M. Devos, L. Brochez. – Text: electronic // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33072086/> (date accessed: 27.09.2022).

178. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase / C. Uyttenhove, L. Pilotte, I. Théate [et al.] // *Nature Medicine*. – 2003. – Vol. 9, № 10. – P. 1269–1274.
179. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity / X. Liu, N. Shin, H.K. Koblish [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 115, № 17. – P. 3520–3530.
180. Hypoxia Modifies the Transcriptome of Human NK Cells, Modulates Their Immunoregulatory Profile, and Influences NK Cell Subset Migration / M. Parodi, F. Raggi, D. Cangelosi [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2358.
181. The hypoxic environment reprograms the cytokine/chemokine expression profile of human mature dendritic cells / F. Blengio, F. Raggi, D. Pierobon [et al.] // *Immunobiology*. – 2013. – Vol. 218, № 1. – P. 76–89.
182. Role of hypoxia in inhibiting dendritic cells by VEGF signaling in tumor microenvironments: mechanism and application / Z. Han, Y. Dong, J. Lu [et al.]. – Text: electronic // *Am. J. Cancer Res.* – 2021. – Vol. 11, № 8. – P. 3777. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34522449/> (date accessed: 27.09.2022).
183. McGettrick, A.F. The Role of HIF in Immunity and Inflammation / A.F. McGettrick, L.A.J. O’Neill. – *Cell Metab.* – 2020. – Vol. 32, № 4. – P. 524–536.
184. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy / S.K. Wculek, F.J. Cueto, A.M. Mujal [et al.] // *Nature Research*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 7–24.
185. Lee, Y.S. The role of dendritic cells in cancer / Y.S. Lee, K.J. Radford // *International Review of Cell and Molecular Biology* // Elsevier Inc. – 2019. – Vol. 348. – P. 123–178.
186. Manicassamy, S. Dendritic cell control of tolerogenic responses / S. Manicassamy, B. Pulendran // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 241, № 1. – P. 206–227.
187. Shurin, G.V. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer / G.V Shurin, Y. Ma, M.R. Shurin // *Cancer Microenvironment*. – 2013. – Vol. 6, № 2. – P. 159–167.
188. Fu, C. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment / C. Fu, A. Jiang. – Text: electronic // *Frontiers Media SA*. – 2018. – Vol. 9. – P. 3059. – URL: </pmc/articles/PMC6306491/> (date accessed: 22.09.2021).
189. Giovanelli, P. Dendritic Cell Metabolism and Function in Tumors / P. Giovanelli, T.A. Sandoval, J.R. Cubillos-Ruiz // *Trends in Immunology*. – 2019. – Vol. 40, № 8. – P. 699–718.
190. Metabolism of Dendritic Cells in Tumor Microenvironment: For Immunotherapy / X. Peng, Y. He, J. Huang [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33732237/> (date accessed: 12.07.2022).
191. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function / J. Zong, A.A. Keskinov, G.V Shurin, M.R. Shurin // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2016. – Vol. 65, № 7. – P. 821–833.
192. D’Souza-Schorey Crislyn, C. Tumor-derived microvesicles: Shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers / C. D’Souza-Schorey Crislyn, J.W. Clancy // *Genes and Development*. – 2012. – Vol. 26, № 12. – P. 1287–1299.
193. The roles of tumor-derived exosomes in altered differentiation, maturation and function of dendritic cells / R. Hosseini, L. Asef-Kabiri, H. Yousefi [et al.]. – Text: electronic // *Mol. Cancer*. – 2021. – Vol. 20, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34078376/> (date accessed: 12.07.2022).
194. Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells / S.H. Huang, Y. Li, J. Zhang [et al.] // *Cancer Invest.* – 2013. – Vol. 31, № 5. – P. 330–335.
195. Russo, V. Tumor-derived factors affecting immune cells / V. Russo, M.P. Protti // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2017. – Vol. 36. – P. 79–87.
196. Monocytes in the Tumor Microenvironment / S. Ugel, S. Canegrave, F. De Sanctis, V. Bronte. – Text: electronic // *Annu. Rev. Pathol.* – 2021. – Vol. 16. – P. 93–122. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33497262/> (date accessed: 31.03.2022).
197. Dakowicz, D. Relationship between VEGF Family Members, Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer / D. Dakowicz, M. Zajkowska, B. Mroczko. – Text: electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35328794/> (date accessed: 23.06.2022).

198. Fuertes, M.B. Leveraging NKG2D Ligands in Immuno-Oncology / M.B. Fuertes, C.I. Domaica, N.W. Zwirner. Text: electronic // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34394116/> (date accessed: 11.11.2021).
199. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications / G. Chitadze, J. Bhat, M. Lettau [et al.] // *Scand. J. Immunol.* – 2013. – Vol. 78, № 2. – P. 120–129.
200. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor / D.H. Raulet, S. Gasser, B.G. Gowen [et al.] // *Annual Review of Immunology*. – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 413–441.
201. NKG2D: A versatile player in the immune system / V. Jelenčić, M. Lenartić, F.M. Wensveen, B. Polić // *Immunology Letters*. – 2017. – Vol. 189. – P. 48–53.
202. Interaction of Monocytes with NK Cells upon Toll-Like Receptor-Induced Expression of the NKG2D Ligand MICA / M. Kloss, P. Decker, K.M. Baltz [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 181, № 10. – P. 6711–6719.
203. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis / C. Cerboni, A. Zingoni, M. Cippitelli [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, № 2. – P. 606–615.
204. Dhar, P. NKG2D and its ligands in cancer / P. Dhar, J.D. Wu // *Curr. Opin. Immunol.* – 2018. – Vol. 51. – P. 55–61.
205. Зайцева, Г.А. Полиморфизм генов MICA и MICB в комплексе MHC / Г.А. Зайцева, А.Н. Киселева, И.В. Парамонов // *Гематология и трансфузиология*. – 2016. – Vol. 61, № 2. – С. 100–104.
206. Fernández-Messina, L. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition / L. Fernández-Messina, H.T. Reyburn, M. Valés-Gómez // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 299.
207. Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy / H. Liu, S. Wang, J. Xin [et al.]. – Text: electronic // *American Journal of Cancer Research*. – 2019. – Vol. 9, № 10. – P. 2064–2078. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31720075/> (date accessed: 27.09.2022).
208. Raeland H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity / A. Diefenbach, E.R. Jensen, A.M. Jamieson, D.H. Raulet // *Nature*. – 2001. – Vol. 413, № 6852. – P. 165–171.
209. Prognostic value of soluble major histocompatibility complex class I polypeptide-related sequence A in non-small-cell lung cancer – significance and development / R. Cascone, A. Carlucci, M. Pierdiluca [et al.] // *Lung Cancer: Targets and Therapy*. – 2017. – Vol. 10, № 8. – P. 161–167.
210. NKG2D ligands in glioma stem-like cells: expression in situ and in vitro / C. Flüh, G. Chitadze, V. Adamski [et al.] // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2018. – Vol. 149, № 3. – P. 219–233.
211. MICA-129Met/Val Polymorphism Is Associated with Early-Onset Breast Cancer Risk / N. Ouni, A. Ben Chaaben, G. Kablouti [et al.] // *Immunol. Invest.* – 2017. – Vol. 46, № 6. – P. 603–614.
212. MHC class I chain-related A: Polymorphism, regulation and therapeutic value in cancer / X. Yang, S. Kuang, L. Wang, Y. Wei // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 103. – P. 111–117.
213. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor-versus NKG2D-dependent recognition / P. Wrobel, H. Shojaei, B. Schitteck [et al.] // *Scand. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 66, № 2–3. – P. 320–328.
214. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: High expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis / K. Li, M. Mandai, J. Hamanishi [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2009. – Vol. 58, № 5. – P. 641–652.
215. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells / Y. Gao, F. Souza-Fonseca-Guimaraes, T. Bald [et al.] // *Nature Immunology*. – 2017. – Vol. 18, № 9. – P. 1004–1015.
216. Salih, H.R. Soluble NKG2D ligands: Prevalence, release, and functional impact / H.R. Salih, S. Holdenrieder, A. Steinle // *Frontiers in Bioscience*. – 2008. – Vol. 13, № 9. – P. 3448–3456.

217. Immunoassays for scarce tumour-antigens in exosomes: detection of the human NKG2D-Ligand, MICA, in tetraspanin-containing nanovesicles from melanoma / S. López-Cobo, C. Campos-Silva, A. Moyano [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 47.
218. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas / D. Sun, X. Wang, H. Zhang [et al.] // *Cell Biology International*. – 2011. – Vol. 35, № 6. – P. 569–574.
219. Regulation of NKG2D Stress Ligands and Its Relevance in Cancer Progression / A.B. Jones, A. Rocco, L.S. Lamb [et al.]. – Text : electronic // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14, № 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35565467/> (date accessed: 27.09.2022).
220. Derynck, R. TGF $\beta$  biology in cancer progression and immunotherapy / R. Derynck, S.J. Turley, R.J. Akhurst // *Nature Research*. – 2021. – Vol. 18, № 1. – P. 9–34.
221. Bellomo, C. Transforming growth factor beta as regulator of cancer stemness and metastasis / C. Bellomo, L. Caja, A. Moustakas // *Br. J. cancer*. – 2016. – Vol. 115, № 7. – P. 761–769.
222. Transforming growth factor- $\beta$  signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy / A. Ahmadi, M. Najafi, B. Farhood, K. Mortezaee. – Text : electronic // *Wiley-Liss Inc.* – 2019. – Vol. 234, № 8. – P. 12173–12187. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30537043/> (date accessed: 04.08.2020).
223. TGF-beta 1 promotes in vitro generation of dendritic cells by protecting progenitor cells from apoptosis / E. Riedl, H. Strobl, O. Majdic, W. Knapp // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1997. – Vol. 158, № 4. – P. 1591–1597.
224. TGF- $\beta$  secreted by tumor-associated macrophages promotes proliferation and invasion of colorectal cancer via miR-34a-VEGF axis / D. Zhang, X. Qiu, J. Li [et al.] // *Cell Cycle*. – 2018. – Vol. 17, № 24. – P. 2766–2778.
225. HER2/EGFR–AKT signaling switches TGFb from inhibiting cell proliferation to promoting cell migration in breast cancer / F. Huang, Q. Shi, Y. Li [et al.] // *Cancer Research*. – 2018. – Vol. 78, № 21. – P. 6073–6085.
226. SMAD4 promotes TGF- $\beta$ -independent NK cell homeostasis and maturation and antitumor immunity / Y. Wang, J. Chu, P. Yi [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Clinical Investigation*. – 2018. – Vol. 128, № 11. – P. 5123–5136. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30183689/> (date accessed: 04.08.2020).
227. Liu, S. TGF- $\beta$  signaling: A complex role in tumorigenesis (Review) / S. Liu, S. Chen, J. Zeng // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 699–704.
228. Farhood, B. Cancer-associated fibroblasts: Secretions, interactions, and therapy / B. Farhood, M. Najafi, K. Mortezaee // *J. Cell. Biochem*. – 2019. – Vol. 120, № 3. – P. 2791–2800.
229. Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis / M. Curtis, H.A. Kenny, B. Ashcroft [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2019. – Vol. 29, № 1. – P. 141–155.e9.
230. Transforming growth factor- $\beta$  limits secretion of lumican by activated stellate cells within primary pancreatic adenocarcinoma tumors / Y. Kang, D. Roife, Y. Lee [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22, № 19. – P. 4934–4946.
231. Computational modeling of three-dimensional ECMrigidity sensing to guide directed cell migration / M.C. Kim, Y.R. Silberberg, R. Abeyaratne [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – Vol. 115, № 3. – P. E390–E399.
232. Thrombospondin-4 mediates TGF- $\beta$ -induced angiogenesis / S. Muppala, R. Xiao, I. Krukovets [et al.] // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36, № 36. – P. 5189–5198.
233. Lipoxin A4 reverses mesenchymal phenotypes to attenuate invasion and metastasis via the inhibition of autocrine TGF- $\beta$ 1 signaling in pancreatic cancer / L. Zong, K. Chen, Z. Jiang [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 36, № 1. – P. 181.
234. You, H. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor  $\beta$  / H. You, W. Ding, C.B. Rountree // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 51, № 5. – P. 1635–1644.
235. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma / Q.M. Fan, Y.Y. Jing, G.F. Yu [et al.] // *Cancer Letters*. – 2014. – Vol. 352, № 2. – P. 160–168.

236. Brief reports: A distinct DNA methylation signature defines breast cancer stem cells and predicts cancer outcome / R. El Helou, J. Wicinski, A. Guille [et al.] // *Stem Cells*. – 2014. – Vol. 32, № 11. – P. 3031–3036.
237. Crosstalk between transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway and long non-coding RNAs in cancer / J. Wang, N. Shao, X. Ding [et al.] // *Cancer Letters*. – 2016. – Vol. 370, № 2. – P. 296–301.
238. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- $\beta$  signaling / V.S. Cortez, T.K. Ulland, L. Cervantes-Barragan [et al.] // *Nature Immunology*. – 2017. – Vol. 18, № 9. – P. 995–1003.
239. Dahmani, A. TGF- $\beta$  in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy / A. Dahmani, J.-S. Delisle // *Cancers*. – 2018. – Vol. 10, № 6. – P. 194.
240. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in regulatory T cell biology / J.M. Moreau, M. Velegraki, C. Bolyard [et al.]. – Text : electronic // *Sci. Immunol.* – 2022. – Vol. 7, № 69. – P. eabi4613. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35302863/> (date accessed: 12.07.2022).
241. Haque, S. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer / S. Haque, J.C. Morris. – Text : electronic // Taylor and Francis Inc. – 2017. – Vol. 13, № 8. – P. 1741–1750. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575585/> (date accessed: 04.08.2020).
242. Tauriello, D.V.F. Overcoming TGF $\beta$ -mediated immune evasion in cancer / D.V.F. Tauriello, E. Sancho, E. Batlle. – Text : electronic // *Nature Reviews Cancer*. – 2022. – Vol. 22. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34671117/> (date accessed: 14.07.2022).
243. Elevated TGF- $\beta$ 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients / J.-C. Lee, K.-M. Lee, D.-W. Kim, D.S. Heo. – Text : electronic // *The Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172, № 12. – P. 7335–7340. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15187109/> (date accessed: 28.07.2020).
244. Ouyang, W. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation / W. Ouyang, A. O'Garra. – Text : electronic // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50, № 4. – P. 871–891. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30995504/> (date accessed: 23.09.2021).
245. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: A target for anticancer immunotherapy / T. Sato, M. Terai, Y. Tamura [et al.] // *Immunologic Research*. – 2011. – Vol. 51, № 2–3. – P. 170–182.
246. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma / W. Dummer, J.C. Becker, A. Schwaaf [et al.] // *Melanoma Research*. – 1995. – Vol. 5, № 1. – P. 67–68.
247. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence / E. Itakura, R.R. Huang, D.R. Wen [et al.]. – Text : electronic // *Modern Pathology*. – 2011. – Vol. 24, № 6. – P. 801–809. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317876/> (date accessed: 11.11.2021).
248. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma / D.R. Smith, S.L. Kunkel, M.D. Burdick [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 1994. – Vol. 145, № 1. – P. 18–25.
249. Saraiva, M. Biology and therapeutic potential of interleukin-10 / M. Saraiva, P. Vieira, A. O'Garra. – Text : electronic // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31611251/> (date accessed: 11.08.2020).
250. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation / D. Lobo-Silva, G.M. Carriche, A.G. Castro [et al.]. – Text : electronic // *J. Neuroinflammation*. – 2016. – Vol. 13, № 1. – P. 297. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27881137/> (date accessed: 29.09.2022).
251. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction / M. Hulsmans, H.B. Sager, J.D. Roh [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Experimental Medicine*. – 2018. – Vol. 215, № 2. – P. 423–440. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29339450/> (date accessed: 29.09.2022).
252. Ostrand-Rosenberg, S. Macrophages and Tumor Development / S. Ostrand-Rosenberg. – *Tumor-Induced Immune Suppression*. – NY: Springer New York, 2014. – P. 185–212.
253. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis / M. Murai, O. Turovskaya, G. Kim [et al.] // *Nature Immunology*. – 2009. – Vol. 10, № 11. – P. 1178–1184.

254. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease / A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini [et al.]. – Text : electronic // *J. Cell. Physiol.* – 2018. – Vol. 233. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29319160/> (date accessed: 13.07.2022).
255. The increase of circulating PD-L1-expressing CD68+ macrophage in ovarian cancer / Q.X. Qu, Q. Huang, Y. Shen [et al.] // *Tumor Biology.* – 2016. – Vol. 37, № 4. – P. 5031–5037.
256. CD163+ CD204+ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma / K. Kubota, M. Moriyama, S. Furukawa [et al.] // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1755.
257. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination / T. Yamaguchi, S. Fushida, Y. Yamamoto [et al.] // *Gastric Cancer.* – 2016. – Vol. 19, № 4. – P. 1052–1065.
258. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation / M.L. García-Hernández, R. Hernández-Pando, P. Gariglio, J. Berumen // *Immunology.* – 2002. – Vol. 105, № 2. – P. 231–243.
259. Ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop / B. Sredni, M. Weil, G. Khomenok [et al.] // *Cancer Research.* – 2004. – Vol. 64, № 5. – P. 1843–1852.
260. Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer / J.M. Vahl, J. Friedrich, S. Mittler [et al.] // *British Journal of Cancer.* – 2017. – Vol. 117, № 11. – P. 1644–1655.
261. Lin, W.W. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer / W.W. Lin, M. Karin. – Text : electronic // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 5. – P. 1175–1183. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17476347/> (date accessed: 05.08.2020).
262. Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer / S. Abtahi, F. Davani, Z. Mojtahedi [et al.] // *J. Cancer Res. Therapeutics.* – 2017. – Vol. 13, № 2. – P. 252–256.
263. Relationships of interleukin-10 with the regulatory T cell ratio and prognosis of cervical cancer patients / B. Wang, H. Wang, P. Li [et al.] // *Clinics.* – 2018. – Vol. 73. – P. e679.
264. Prognostic value of serum IL-8 and IL-10 in patients with ovarian cancer undergoing chemotherapy / L. Zhang, W. Liu, X. Wang [et al.] // *Oncology Letters.* – 2019. – Vol. 17, № 2. – P. 2365–2369.
265. Interleukin-10 Increases Th1 Cytokine Production and Cytotoxic Potential in Human Papillomavirus-Specific CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes / A.D. Santin, P.L. Hermonat, A. Ravaggi [et al.] // *Journal of Virology.* – 2000. – Vol. 74, № 10. – P. 4729–4737.
266. CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity / K. Steinbrink, E. Graulich, S. Kubsch [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 99, № 7. – P. 2468–2476.
267. Novel Drugs with High Efficacy against Tumor Angiogenesis / S. Qi, S. Deng, Z. Lian, K. Yu. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 13. – P. 6934. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35805939/> (date accessed: 29.09.2022).
268. Matsumoto, K. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours / K. Matsumoto, M. Ema. – Text : electronic // *Biochem.* – 2014. – Vol. 156, № 1. – P. 1–10. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24839295/> (date accessed: 29.07.2020).
269. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms / G.W. Prager, M. Poettler, M. Unseld, C.C. Zielinski // *Translational Lung Cancer Research.* – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 14–25.
270. Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer / A. Lapeyre-Prost, M. Terme, S. Pernot [et al.] // *International Review of Cell and Molecular Biology.* – 2017. – Vol. 330. – P. 295–342.
271. Eguchi, R. VEGF-Independent Angiogenic Factors: Beyond VEGF/VEGFR2 Signaling / R. Eguchi, J.I. Kawabe, I. Wakabayashi. – Text : electronic // *Karger Publishers.* – 2022. – Vol. 59, № 2. – P. 78–89. – URL: <https://www.karger.com/Article/FullText/521584> (date accessed: 29.09.2022).
272. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2 / S. Cébe Suarez, M. Pieren, L. Cariolato [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2006. – Vol. 63, № 17. – P. 2067–2077.

273. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges / K.S. Siveen, K. Prabhu, R. Krishnankutty [et al.] // *Current Vascular Pharmacology*. – 2017. – Vol. 15, № 4. – P. 339–351.
274. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells / E.N. Unemori, N. Ferrara, E.A. Bauer, E.P. Amento // *Journal of Cellular Physiology*. – 1992. – Vol. 153, № 3. – P. 557–562.
275. Pepper, M.S. Proteolytic balance and capillary morphogenesis / M.S. Pepper, R. Montesano // *Cell Differ. Deve.* – 1990. – Vol. 32, № 3. – P. 319–327.
276. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis / H.F. Dvorak, L.F. Brown, M. Detmar, A.M. Dvorak // *American Journal of Pathology*. – 1995. – Vol. 146, № 5. – P. 1029–1039.
277. In vitro study of normoxic epidermal growth factor receptor-induced hypoxia-inducible factor-1-alpha, vascular endothelial growth factor, and BNIP3 expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Implications for anti-epidermal growth factor / P. Secades, I. S. de Santa-María, A. Merlo [et al.] // *Head & Neck*. – 2015. – Vol. 37, № 8. – P. 1150–1162.
278. Takahashi, H. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions / H. Takahashi, M. Shibuya // *Clinical Science*. – 2005. – Vol. 109, № 3. – P. 227–241.
279. Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment / G. Liu, T. Chen, Z. Ding [et al.]. Text: electronic // *Cell Proliferation*. – 2021. – Vol. 54, № 4. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33655556/> (date accessed: 13.07.2022).
280. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis / C.S. Melincovici, A.B. Boşca, S. Şuşman [et al.] // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 455–467.
281. Jha, S.K. Key molecules in lymphatic development, function, and identification / S.K. Jha, K. Rauniyar, M. Jeltsch // *Annals of Anatomy*. – 2018. – Vol. 219. – P. 25–34.
282. Goel, H.L. VEGF targets the tumour cell / H.L. Goel, A.M. Mercurio // *Nature Reviews Cancer*. – 2013. – Vol. 13, № 12. – P. 871–882.
283. Roy, D. Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors / D. Roy, L. Walsh // *Breast Cancer: Targets and Therapy*. – 2014. – Vol. 6. – P. 81.
284. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes / W.T. Bellamy, L. Richter, D. Sirjani [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 97, № 5. – P. 1427–1434.
285. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo / D. Gabrilovich, T. Ishida, T. Oyama [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 92, № 11. – P. 4150–4166.
286. Sinha, P. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis / P. Sinha, V.K. Clements, S. Ostrand-Rosenberg // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65, № 24. – P. 11743–11751.
287. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity / M. Kortylewski, M. Kujawski, T. Wang [et al.] // *Nature Medicine*. – 2005. – Vol. 11, № 12. – P. 1314–1321.
288. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients / T. Osada, G. Chong, R. Tansik [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2008. – Vol. 57, № 8. – P. 1115–1124.
289. Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells / N. Horikawa, K. Abiko, N. Matsumura [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23, № 2. – P. 587–599.
290. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages / N. Linde, W. Lederle, S. Depner [et al.] // *Journal of Pathology*. – 2012. – Vol. 227, № 1. – P. 17–28.



291. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions / J. Wada, H. Suzuki, R. Fuchino [et al.] // *Anticancer Research*. – 2009. – Vol. 29, № 3. – P. 881–888.
292. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression / J.E. Ohm, D.I. Gabrilovich, G.D. Sempowski [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 101, № 12. – P. 4878–4886.
293. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8<sup>++</sup> T cells in tumors / T. Voron, O. Colussi, E. Marcheteau [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2015. – Vol. 212, № 2. – P. 139–148.
294. Yang, Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease / Y. Yang, Y. Cao // *Semin. Cancer Biol.* – 2022. – Vol. 86. – P. 251–261. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35307547/> (date accessed: 13.07.2022).
295. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments / C.H. Lee, M.S. Kim, B.M. Chung [et al.]. – Text : electronic // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 19, № 7. – P. 707–715. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22705788/> (date accessed: 23.07.2020).
296. Multifaceted role of the placental growth factor (PLGF) in the antitumor immune response and cancer progression / L. Albonici, M G. Giganti, A. Modesti [et al.] // *MDPI*. – 2019. – Vol. 20, № 12. – P. 2970.
297. Yu, X. Role of Angiopoietins in Development of Cancer and Neoplasia Associated with Viral Infection / X. Yu, F. Ye. – Text : electronic // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 457. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085414/> (date accessed: 13.07.2022).
298. uPA AND PAI-1 In Breast Cancer: Review Of Their Clinical Utility And Current Validation In The ProspectivE NNBC-3 TRIAL / K. Annecke, M. Schmitt, U. Euler [et al.] // *Advances in Clinical Chemistry*. – 2008. – Vol. 45, Suppl.: COMPLETE. – P. 31–45.
299. Levels of uPA and PAI-1 in breast cancer and its correlation to Ki67-index and results of a 21-multigene-array / H.-U. Völker, M. Weigel, A. Strehl, L. Frey // *Diagnostic Pathology*. – 2018. – Vol. 13, № 1. – P. 67.
300. Ilkovitch, D. uPA and uPA-receptor are involved in cancer-associated myeloid-derived suppressor cell accumulation / D. Ilkovitch, R. Carrio, D.M. Lopez // *Anticancer Research*. – 2012. – Vol. 32, № 10. – P. 4263–4270.
301. Overexpression of MMP-3 and uPA with Diminished PAI-1 Related to Metastasis in Ductal Breast Cancer Patients Attending a Public Hospital in Mexico City / L.M. Barajas-Castañeda, E. Cortés-Gutiérrez, F.M. García-Rodríguez [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 8519648.
302. Endoglin (CD105): A review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy / F. Nassiri, M.D. Cusimano, B.W. Scheithauer [et al.] // *Anticancer Res.* – 2011. – Vol. 31, № 6. – P. 2283–2290. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21737653/> (date accessed: 12.11.2020).
303. Kasprzak, A. Role of Endoglin (CD105) in the Progression of Hepatocellular Carcinoma and Anti-Angiogenic Therapy / A. Kasprzak, A. Adamek // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 3887.
304. Adaptive immune resistance at the tumour site: mechanisms and therapeutic opportunities / T.K. Kim, E.N. Vandsemb, R.S. Herbst, L. Chen. – Text : electronic // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2022. – Vol. 21. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35701637/> (date accessed: 13.07.2022).
305. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets / Y. Tie, F. Tang, Y. quan Wei, X. wei Wei. – Text : electronic // *BioMed Central*. – 2022. – Vol. 15. – P. 1–33. – URL: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01282-8> (date accessed: 30.09.2022).
306. Ohue, Y. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? / Y. Ohue, H. Nishikawa. – Text : electronic // *Blackwell Publishing Ltd*. – 2019. – Vol. 110, № 7. – P. 2080–2089. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31102428/> (date accessed: 30.07.2020).

307. Nishikawa, H. Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: Implications for innovative immune precision therapies / H. Nishikawa, S. Koyama // *BMJ Publishing Group*. – 2021. – Vol. 9, № 7. – P. e002591.
308. 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 [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12, № 22. – P. 6808–6816.
309. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer / M. Terme, S. Pernot, E. Marcheteau [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, № 2. – P. 539–549.
310. Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth / W. Hansen, M. Hutzler, S. Abel [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – Vol. 209, № 11. – P. 2001–2016.
311. Therapeutic targeting of regulatory T cells in cancer / F. Shan, A. Somasundaram, T.C. Bruno [et al.]. – Text: electronic // *Trends Cancer*. – 2022. – Vol. 8, № 11. – P. 944–961. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35853825/> (date accessed: 30.09.2022).
312. Aparicio, L.M.A. Tyrosine kinase inhibitors reprogramming immunity in renal cell carcinoma: rethinking cancer immunotherapy / L.M.A. Aparicio, I.P. Fernandez, J. Cassinello // *Clinical & Translational Oncology*. – 2017. – Vol. 19, № 10. – P. 1175–1182.
313. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients / J.H. Finke, B. Rini, J. Ireland [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14, № 20. – P. 6674–6682.
314. Immunomodulatory Effects of Tyrosine Kinase Inhibitor In Vitro and In Vivo Study / E. Marinelli Busilacchi, A. Costantini, N. Viola [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2018. – Vol. 24, № 2. – P. 267–275.
315. Multifaceted role of chemokines in solid tumors: From biology to therapy / S. Raza, S. Rajak, A. Tewari [et al.] // Text: electronic // *Seminars in Cancer Biology*. – Vol. 86, pt. 1. – P. 1105–1121. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34979274> (date accessed: 30.09.2022).
316. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention / H. Zhao, L. Wu, G. Yan [et al.]. – Text: electronic // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2021. – Vol. 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34248142/> (date accessed: 27.09.2021).
317. Vilgelm, A.E. Chemokins modulate immune surveillance in tumorigenesis, metastasis, and response to immunotherapy / A.E. Vilgelm, A. Richmond. – Text: electronic // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30873179/> (date accessed: 27.09.2021).
318. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival / T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou [et al.] // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10, № 9. – P. 942–949.
319. Mailloux, A.W. NK-Dependent Increases in CCL22 Secretion Selectively Recruits Regulatory T Cells to the Tumor Microenvironment / A.W. Mailloux, M.R.I. Young // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182, № 5. – P. 2753–2765.
320. 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 [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 183, № 10. – P. 6330–6337.
321. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T reg cells / A. Facciabene, X. Peng, I.S. Hagemann [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 475, № 7355. – P. 226–230.
322. Surgical trauma-induced CCL18 promotes recruitment of regulatory T cells and colon cancer progression / Z. Sun, C. Du, P. Xu, C. Miao // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. – Vol. 234, № 4. – P. 4608–4616.
323. Myeloid-derived suppressor cells: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy / Z. Yin, C. Li, J. Wang, L. Xue // *International Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 144, № 5. – P. 933–946.
324. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity / F. Veglia, E. Sanseviero, D.I. Gabrilovich. – Text: electronic // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. –

- Vol. 21, № 8. – P. 485–498. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33526920/> (date accessed: 13.07.2022).
325. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Solid Tumors / T. Ma, B.W. Renz, M. Ilmer [et al.]. – Text : electronic // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 310. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35053426/> (date accessed: 30.09.2022).
326. Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment / X. Tian, H. Shen, Z. Li [et al.]. – Text : electronic // *J. Hematol. Oncol.* – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 84. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31438991/> (date accessed: 30.09.2022).
327. Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells / Y. Liu, X. Xiang, X. Zhuang [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2010. – Vol. 176, № 5. – P. 2490–2499.
328. Roles of the Exosomes Derived From Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Immunity and Cancer Progression / Z. Chen, R. Yuan, S. Hu [et al.] // *Frontiers Media S.A.* – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 310.
329. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment / V. Kumar, S. Patel, E. Tcyganov, D.I. Gabrilovich // *Trends in Immunology*. – 2016. – Vol. 37, № 3. – P. 208–220.
330. Dysthe, M. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment / M. Dysthe, R. Parihar. – Text : electronic // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 1224. – P. 117–140. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32036608/> (date accessed: 30.09.2022).
331. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression / C. Groth, X. Hu, R. Weber [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 120, № 1. – P. 16–25.
332. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function / E. Chun, S. Lavoie, M. Michaud [et al.] // *Cell Reports*. – 2015. – Vol. 12, № 2. – P. 244–257.
333. Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) / C. Alfaro, A. Teijeira, C. Oñate [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22, № 15. – P. 3924–3936.
334. CCL9/CCR1 induces myeloid-derived suppressor cell recruitment to the spleen in a murine H22 orthotopic hepatoma model / B. Li, S. Zhang, N. Huang [et al.] // *Oncology Reports*. – 2019. – Vol. 41, № 1. – P. 608–618.
335. Shaul, M.E. Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment / M.E. Shaul, Z.G. Fridlender // *J. Leukocyte Biology*. – 2017. – Vol. 102, № 2. – P. 343–349.
336. Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells / Y.J. Park, B. Song, Y.S. Kim [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, № 18. – P. 5669–5681.
337. Liang, W. The complex role of Neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis / W. Liang, N. Ferrara // *Cancer Immunology Research*. – 2016. – Vol. 4, № 2. – P. 83–91.
338. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells / J. Zhou, Y. Nefedova, A. Lei, D. Gabrilovich // *Seminars in Immunology*. – 2018. – Vol. 35. – P. 19–28.
339. Transcriptomic Analysis Comparing Tumor-Associated Neutrophils with Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells and Normal Neutrophils / Z.G. Fridlender, J. Sun, I. Mishalian [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e31524.
340. Fousek, K. Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression / K. Fousek, L.A. Horn, C. Palena // *Pharmacol. Ther.* – 2021. – Vol. 219. – Abstr. 107692.
341. Macrophage polarity in cancer: A review / M. Najafi, N. Hashemi Goradel, B. Farhood [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2019. – Vol. 120, № 3. – P. 2756–2765.
342. Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer cells deliver microRNAs to macrophages and elicit a tumor-promoted phenotype / X. Chen, J. Zhou, X. Li [et al.] // *Cancer Letters*. – 2018. – Vol. 435. – P. 80–91.

343. Tunneling nanotubes, a novel mode of tumor cell–macrophage communication in tumor cell invasion / S. J. Hanna, K. McCoy-Simandle, E. Leung [et al.] // *Journal of Cell Science*. – 2019. – Vol. 132, № 3. – P. jcs223321.
344. The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer / M. De la Fuente López, G. Landskron, D. Parada [et al.] // *Tumor Biology*. – 2018. – Vol. 40, № 11. – P. 101042831881005.
345. Wu, T. Tumor microenvironment and therapeutic response / T. Wu, Y. Dai // Elsevier Ireland Ltd. – 2017. – Vol. 387. – P. 61–68.
346. Bejarano, L. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment / L. Bejarano, M.J. C. Jordão, J.A. Joyce. – Text : electronic // *Cancer Discov*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 933–959. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811125/> (date accessed: 05.05.2022).
347. Rosenberg, S.A. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines / S.A. Rosenberg, J.C. Yang, N.P. Restifo // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10, № 9. – P. 909–915.
348. Palucka, K. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines / K. Palucka, J. Banchereau // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 38–48.
349. Cancer immunotherapy: Challenges and limitations / S. Taefehshokr, A. Parhizkar, S. Hayati [et al.]. – Text : electronic // *Pathology Research and Practice*. – 2022. – Vol. 229. – P. 153723. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34952426/> (date accessed: 30.09.2022).
350. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / D.M. Pardoll // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 252–264.
351. Rosenberg, S.A. Entering the mainstream of cancer treatment / S.A. Rosenberg // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 11, № 11. – P. 630–632.
352. Immunotherapies: Exploiting the immune system for cancer treatment / J. Koury, M. Lucero, C. Cato [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–16.
353. Progress of immune checkpoint therapy in the clinic (Review) / Y. Fan, C. Zhang, S. Jin [et al.] // *Oncology Reports*. – 2019. – Vol. 41, № 1. – P. 3–14.
354. Salama, A.K.S. Next steps in immuno-oncology: Enhancing antitumor effects through appropriate patient selection and rationally designed combination strategies / A.K.S. Salama, S.J. Moschos // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28, № 1. – P. 57–74.
355. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors / J.M. Pitt, M. Vétizou, R. Daillère [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44, № 6. – P. 1255–1269.
356. On the other side: Manipulating the immune checkpoint landscape of dendritic cells to enhance cancer immunotherapy / B.Y. Kong, H. Bolton, J.W. Kim [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 50.
357. Shan, C. Progress of immune checkpoint LAG-3 in immunotherapy (Review) / C. Shan, X. Li, J. Zhang. – Text : electronic // *Oncology Letters*. – 2020. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32963613/> (date accessed: 14.07.2022).
358. PD-1 and LAG-3 checkpoint blockade: Potential avenues for therapy in b-cell lymphoma / J.W.D. Tobin, K. Bednarska, A. Campbell, C. Keane. – Text : electronic // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 1152. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34068762/> (date accessed: 14.07.2022).
359. Emerging Novel Therapeutic Approaches for Treatment of Advanced Cutaneous Melanoma / F. Comito, R. Pagani, G. Grilli [et al.]. – Text : electronic // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35053435/> (date accessed: 14.07.2022).
360. Corti, C. Novel immune targets for the treatment of triple-negative breast cancer / C. Corti, E. Nicolò, G. Curigliano. – Text : electronic // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2021. – Vol. 25, № 10. – P. 815–834. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34763593/> (date accessed: 14.07.2022).
361. TIM-3: An update on immunotherapy / L. Zhao, S. Cheng, L. Fan [et al.]. – Text : electronic // *Int. Immunopharmacol*. – 2021. – Vol. 99. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34224993/> (date accessed: 14.07.2022).

362. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients / J. Fourcade, Z. Sun, M. Benallaoua [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2010. – Vol. 207, № 10. – P. 2175–2186.
363. Ning, Z. Roles of BTLA in Immunity and Immune Disorders / Z. Ning, K. Liu, H. Xiong. – Text : electronic // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33859648/> (date accessed: 27.09.2021).
364. Zila N. Novel immune checkpoints beyond PD-1 in advanced melanoma / N. Zila, C. Hoeller, V. Paulitschke. – Text : electronic // *Magazine of European Medical Oncology*. – 2021. – Vol. 14, № 2. – P. 135–142. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12254-021-00699-0> (date accessed: 27.09.2021).
365. Demerlé, C. BTLA-HVEM Couple in Health and Diseases: Insights for Immunotherapy in Lung Cancer / C. Demerlé, L. Gorvel, D. Olive. – Text : electronic // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – URL: </pmc/articles/PMC8438526/> (date accessed: 27.09.2021).
366. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 / S.A. Rosenberg, J.R. Yannelli, J.C. Yang [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1994. – Vol. 86, № 15. – P. 1159–1166.
367. Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer / S.A. Rosenberg, M.T. Lotze, L.M. Muul [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 1985. – Vol. 313, № 23. – P. 1485–1492.
368. Genome-Editing Technologies in Adoptive T Cell Immunotherapy for Cancer / N. Singh, J. Shi, C.H. June, M. Ruella // *Curr. Hematol. Malig Reports*. – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. 522–529.
369. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era / S.T. Pajens, A. Vledder, M. de Bruyn, H.W. Nijman. – Text : electronic // *Cell. Mol. Immunol.* – 2021. – Vol. 18, № 4. – P. 842–859. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33139907/> (date accessed: 14.07.2022).
370. Rosenberg, S.A. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer / S.A. Rosenberg, N.P. Restifo // *Science*. – 2015. – Vol. 348, № 6230. – P. 62–68.
371. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes / M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, P.F. Robbins [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5594. – P. 850–854.
372. Adoptive cell therapy: Past, present and future / J.E. Cohen, S. Merims, S. Frank [et al.] // *Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 9, № 2. – P. 183–196.
373. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes / M.S. Lawrence, P. Stojanov, P. Polak [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 499, № 7457. – P. 214–218.
374. Tumor Exome Analysis Reveals Neoantigen-Specific T-Cell Reactivity in an Ipilimumab-Responsive Melanoma / N. van Rooij, M.M. van Buuren, D. Philips [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31, № 32. – P. e439–e442.
375. Shum, T. Strategies for enhancing adoptive T-cell immunotherapy against solid tumors using engineered cytokine signaling and other modalities / T. Shum, R.L. Kruse, C.M. Rooney // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2018. – Vol. 18, № 6. – P. 653–664.
376. Genetic Modification of T Cells for the Immunotherapy of Cancer / S. Quinn, N. Lenart, V. Dronzek [et al.]. – Text : electronic // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – Vol. 10, № 3. – P. 457. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35335089/> (date accessed: 30.09.2022).
377. A pilot trial of the combination of transgenic NY-ESO-1–reactive adoptive cellular therapy with dendritic cell vaccination with or without ipilimumab / T.S. Nowicki, B. Berent-Maoz, G. Cheung-Lau [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25, № 7. – P. 2096–2108. – URL: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/7/2096> (date accessed: 27.09.2021).
378. Sterner, R.C. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies / R.C. Sterner, R.M. Sterner. – Text : electronic // *Blood Cancer J*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 69. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33824268/> (date accessed: 30.09.2022).
379. Luskin, M.R. Chimeric Antigen Receptor Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Clinical Practice / M.R. Luskin, D.J. DeAngelo // *Curr. Hematol. Malig. Reports*. – 2017. – Vol. 12, № 4. – P. 370–379.

380. CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead / Q. Zhang, J. Ping, Z. Huang [et al.]. – Text: electronic // *J. Immunol. Res.* – 2020. – Vol. 2020. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32411789/> (date accessed: 28.09.2021).
381. Liu, B. Target selection of CAR T cell therapy in accordance with the TME for solid tumors / B. Liu, L. Yan, M. Zhou // *Am. J. Cancer Res.* – 2019. – Vol. 9, № 2. – P. 228–241.
382. Fibroblast Activation Protein (FAP)-Targeted CAR-T Cells: Launching an Attack on Tumor Stroma / R. Bughda, P. Dimou, R.R. D'Souza, A. Klampatsa. – Text: electronic // *Immunotargets and Therapy.* – 2021. – Vol. 10. – P. 313–323. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34386436/> (date accessed: 14.07.2022).
383. Chen, F. Molecular MRI of VEGFR-2 reveals intra-tumor and inter-tumor heterogeneity / F. Chen, Y. Zhang, W. Cai // *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. 312–316.
384. Suzuki, M. Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases / M. Suzuki, N.K.V. Cheung // *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* – 2015. – Vol. 19, № 3. – P. 349–362.
385. Improving Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cell Function by Reversing the Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer / S. Mohammed, S. Sukumaran, P. Bajgain [et al.] // *Molecular Therapy.* – 2017. – Vol. 25, № 1. – P. 249–258.
386. Assessing the Future of Solid Tumor Immunotherapy / P. Guha, K.R. Heatherton, K.P. O'connell [et al.]. – Text: electronic // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10, № 3. – P. 655. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35327456/> (date accessed: 30.09.2022).
387. Brinkmann U. The making of bispecific antibodies / U. Brinkmann, R. E. Kontermann // *MAbs.* – 2017. – Vol. 9, № 2. – P. 182–212.
388. Surowka, M. Ten years in the making: application of CrossMab technology for the development of herapeutic bispecific antibodies and antibody fusion proteins / M. Surowka, W. Schaefer, C. Klein. – Text: electronic // *MAbs.* – 2021. – Vol. 13, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34491877/> (date accessed: 28.09.2021).
389. Cancer immunotherapy using anti-TIM3/PD-1 bispecific antibody: a patent evaluation of EP3356411A1 / I. Herrera-Camacho, M. Anaya-Ruiz, M. Perez-Santos [et al.]. – Text: electronic // *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* – 2019. – Vol. 29, № 8. – P. 587–593. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31241380/> (date accessed: 28.09.2021).
390. Bispecific anti-PD-1/LAG-3 antibodies for treatment of advanced or metastatic solid tumors: a patent evaluation of US2018326054 / J. Cebada, A. Flores, C. Bandala [et al.]. – Text: electronic // *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* – 2020. – Vol. 30, № 7. – P. 487–494. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32397849/> (date accessed: 28.09.2021).
391. Killock, D. Engaging results with glofitamab / D. Killock. – Text: electronic // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2021. – Vol. 18, № 5. – P. 257. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33828233/> (date accessed: 28.09.2021).
392. Minson, A. Glofitamab CD20-TCB bispecific antibody / A. Minson, M. Dickinson. – Text: electronic // *Leukemia and Lymphoma.* – 2021. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34263696/> (date accessed: 28.09.2021).
393. Dominant-Negative TGF- $\beta$  Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication / C.C. Kloss, J. Lee, A. Zhang [et al.]. – Text: electronic // *Molecular Therapy.* – 2018. – Vol. 26, № 7. – P. 1855–1866. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29807781/> (date accessed: 28.09.2021).
394. Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells / M. Daher, R. Basar, E. Gokdemir [et al.]. – Text: electronic // *Blood.* – 2021. – Vol. 137, № 5. – P. 624–636. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32902645/> (date accessed: 28.09.2021).
395. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial / J.F. Vansteenkiste, B.C. Cho, T. Vanakesa [et al.] // *The Lancet Oncology.* – 2016. – Vol. 17, № 6. – P. 822–835.
396. Targeting the heterogeneity of cancer with individualized neoepitope vaccines / Ö. Türeci, M. Vormehr, M. Diken [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, № 8. – P. 1885–1896.

397. Kim J. Augmenting the synergies of chemotherapy and immunotherapy through drug delivery / J. Kim, M.P. Manspecker, S.N. Thomas // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – Vol. 88. – P. 1–14.
398. Handy, C.E. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: Novel insights and future directions / C. E. Handy, E. S. Antonarakis. – Text : electronic // *Future Oncology*. – 2018. – Vol. 14, № 10. – P. 907–917. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29260582/> (date accessed: 28.09.2021).
399. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma / L. M. Liau, K. Ashkan, D. D. Tran [et al.]. – Text : electronic // *Int. J. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29843811/> (date accessed: 05.05.2022).
400. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results / B. Mastelic-Gavillet, K. Balint, C. Boudousquie [et al.]. – Text : electronic // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 766. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31031762/> (date accessed: 27.08.2021).
401. Advances in anti-cancer immunotherapy: CAR-T cell, checkpoint inhibitors, dendritic cell vaccines, and oncolytic viruses, and emerging cellular and molecular targets / E. Alard, A.B. Butnariu, M. Grillo [et al.]. – Text : electronic // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 1–38. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32645977/> (date accessed: 27.08.2021).
402. Personalized cancer vaccine effectively mobilizes antitumor T cell immunity in ovarian cancer / J.L. Tanyi, S. Bobisse, E. Ophir [et al.]. – Text : electronic // *Sci. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 10, № 436. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29643231/> (date accessed: 14.07.2022).
403. Blass, E. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines / E. Blass, P.A. Ott. – Text : electronic // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2021. – Vol. 18, № 4. – P. 215–229. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33473220/> (date accessed: 14.07.2022).
404. Exploiting the immunogenic potential of cancer cells for improved dendritic cell vaccines / L. Vandenberk, J. Belmans, M. Van Woensel [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers Media S.A.* – 2016. – Vol. 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26834740/> (date accessed: 25.01.2021).
405. Phase II study of autologous monocyte-derived mRNA electroporated dendritic cells (TriMixDC-MEL) plus ipilimumab in patients with pretreated advanced melanoma / S. Wilgenhof, J. Corthals, C. Heirman [et al.]. – Text : electronic // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34, № 12. – P. 1330–1338. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926680/> (date accessed: 14.07.2022).
406. Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control / D.W. Mullins, S.L. Sheasley, R.M. Ream [et al.]. – Text : electronic // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198, № 7. – P. 1023–1034. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14530375/> (date accessed: 15.07.2022).
407. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients / W.J. Lesterhuis, I.J.M. De Vries, G. Schreibelt [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2011. – Vol. 17, № 17. – P. 5725–5735. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21771874/> (date accessed: 15.07.2022).
408. Davis, M.M. Immunology Taught by Humans / M.M. Davis // *Science Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 4, № 117. – P. 117fs2–117fs2.
409. Boorn, J.G. van den. Turning Tumors into Vaccines: Co-opting the Innate Immune System / J.G. van den Boorn, G. Hartmann // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 27–37.
410. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance / L. Zitvogel, L. Galluzzi, M.J. Smyth, G. Kroemer // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 74–88.
411. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents / L. Galluzzi, A. Buqué, O. Kepp [et al.] // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 28, № 6. – P. 690–714.
412. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer / L. Bracci, G. Schiavoni, A. Sistigu, F. Belardelli // *Cell Death and Differentiation*. – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 15–25.

413. Serum antibody response to influenza virus vaccination during chemotherapy treatment in adult patients with solid tumours / M.L. Wumkes, A.M.T. Van Der Velden, M. Los [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31, № 52. – P. 6177–6184.
414. Trial watch: Dendritic cell-based anticancer immunotherapy / A.D. Garg, M. Vara Perez, M. Schaaf [et al.] // *OncoImmunology*. – 2017. – Vol. 6, № 7. – P. e1328341.
415. Effectiveness and safety of PD-1/PD-L1 or CTLA4 inhibitors combined with chemotherapy as a first-line treatment for lung cancer: A meta-analysis / K. Shen, J. Cui, Y. Wei [et al.] // *Journal of Thoracic Disease*. – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 6636–6652.
416. Inoue, H. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments / H. Inoue, K. Tani. – Text : electronic // *Nature Publishing Group*. – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 39–49. – URL: [/pmc/articles/PMC3857623/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23857623/) (date accessed: 15.07.2022).
417. Immunogenic cell stress and death / G. Kroemer, C. Galassi, L. Zitvogel, L. Galluzzi. – Text : electronic // *Nat. Immunol.* – 2022. – Vol. 23, № 4. – P. 487–500. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35145297/> (date accessed: 15.07.2022).
418. Fabian, K.P. From Immunogenic Cell Death to Immunogenic Modulation: Select Chemotherapy Regimens Induce a Spectrum of Immune-Enhancing Activities in the Tumor Microenvironment / K.P. Fabian, B. Wolfson, J.W. Hodge. – Text : electronic // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34497771/> (date accessed: 15.07.2022).
419. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy / M. Binnewies, E.W. Roberts, K. Kersten [et al.] // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24, № 5. – P. 541–550.
420. Transcriptomic analysis of the tumor microenvironment to guide prognosis and immunotherapies / F. Petitprez, Y.A. Vano, E. Becht [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2018. – Vol. 67, № 6. – P. 981–988.
421. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients / R.S. Herbst, J.C. Soria, M. Kowanzet [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, № 7528. – P. 563–567.
422. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability / B. Mlecnik, G. Bindea, H. K. Angell [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44, № 3. – P. 698–711.
423. Spranger, S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment / S. Spranger // *International Immunology*. – 2016. – Vol. 28, № 8. – P. 383–391.
424. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention / C. Sautès-Fridman, M. Lawand, N. A. Giraldo [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 407.
425. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells / H. Sumimoto, F. Imabayashi, T. Iwata, Y. Kawakami // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, № 7. – P. 1651–1656.
426. Spranger, S. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity / S. Spranger, R. Bao, T.F. Gajewski // *Nature*. – 2015. – Vol. 523, № 7559. – P. 231–235.
427. PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer / E. Bonavita, S. Gentile, M. Rubino [et al.] // *Cell*. – 2015. – Vol. 160, № 4. – P. 700–714.
428. Hinshaw, D.C. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression / D.C. Hinshaw, L.A. Shevde. – Text : electronic // *Cancer Res.* – 2019. – Vol. 79, № 18. – P. 4557–4567. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31350295/> (date accessed: 28.09.2021).
429. Blum, D. Registered report: Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion / D. Blum, S. LaBarge. – Text : electronic // *Elife*. – 2014. – Vol. 3. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25490933/> (date accessed: 29.09.2021).
430. Walker, C. Role of extracellular matrix in development and cancer progression / C. Walker, E. Mojares, A. Del Río Hernández. – Text : electronic // *MDPI*. – 2018. – Vol. 19. – URL: [/pmc/articles/PMC6213383/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306213383/) (date accessed: 21.07.2022).
431. Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells / B. Ruffell, D. Chang-Strachan, V. Chan [et al.]. –



- Text: electronic // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 26, № 5. – P. 623–637. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25446896/> (date accessed: 29.09.2021).
432. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis / S. Acharyya, T. Oskarsson, S. Vanharanta [et al.]. – Text: electronic // *Cell*. – 2012. – Vol. 150, № 1. – P. 165–178. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22770218/> (date accessed: 29.09.2021).
433. Anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma invasion is associated with accumulation of Tie2-expressing monocytes / K. Gabrusiewicz, D. Liu, N. Cortes-Santiago [et al.]. – Text: electronic // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5, № 8. – P. 2208–2220. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24809734/> (date accessed: 29.09.2021).
434. McGray, A.J.R. Adaptive resistance to cancer immunotherapy / A.J.R. McGray, J. Bramson // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 1036. – P. 213–227.
435. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адъювантом у больных с меланомой кожи / И.А. Балдуева, А.В. Новик, В.М. Моисеенко [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2012. – Т. 58, № 2. – С. 212–221.
436. Long-term survival in patients (pts) with locally advanced or disseminated malignant melanoma (MM) or renal cell carcinoma (RCC), treated with tag-7 gene-modified (GMV) tumor cells: A phase II trial / A.V. Novik, A.B. Danilova, I.A. Baldueva [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 37, № 15, Suppl. – P. e14022–e14022.
437. Freshney, R.I. *Culture of Animal Cells* / R.I. Freshney. – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. – 732 p.
438. Оптимизация метода приготовления вакцин на основе аутологичных генетически модифицированных опухолевых клеток для лечения больных диссеминированной меланомой кожи / А.О. Данилов, С.С. Ларин, А.Б. Данилова [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 47–53.
439. Detection of p53 mutations in benign and dysplastic nevi / D.B. Levin, K. Wilson, G. Valadares de Amorim [et al.] // *Cancer Research*. – 1995. – 55, № 19. – P. 4278–4282.
440. Восстановление соединительной ткани в результате трансплантации на раны экспериментальных животных дермального эквивалента на основе фибрина / Н.М. Юдинцева, Н.М. Плескач, Л.В. Смагина [и др.] // *Цитология*. – 2010. – Т. 52, № 9. – С. 724–728.
441. Александрова, А.Ю. Механизмы миграции культивируемых клеток / А.Ю. Александрова // *Методы культивирования клеток* / eds. Г.П. Пинаев, М.С. Богданова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – С. 40–55.
442. Böyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction / A. Böyum // *Clin. Lab. Invest. Suppl.* – 1968. – Vol. 97. – P. 7.
443. Isolation of human mononuclear cell subsets by counterflow centrifugal elutriation (CCE). I. Characterization of B-lymphocyte-, T-lymphocyte-, and monocyte-enriched fractions by flow cytometric analysis / L.M. Wahl, I.M. Katona, R.L. Wilder [et al.] // *Cellular Immunology*. – 1984. – Vol. 85, № 2. – P. 373–383.
444. Нехаева, Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями / Т.Л. Нехаева // *Сибирский онкологический журнал*. – 2013. – Vol. 57, № 3. – С. 52–56.
445. Generation of activated and antigen-specific T cells with cytotoxic activity after co-culture with dendritic cells / A. Märten, T. Greten, C. Ziske [et al.]. – Text: electronic // *Cancer Immun., Immunother.* – 2002. – Vol. 51, № 1. – P. 25–32. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11845257/> (date accessed: 09.03.2022).
446. *The principles of clinical cytogenetics* / eds. S.L. Gersen, M.B. Keagle. – 2nd. – Humana Press, Totowa, NJ, 2005. – 595 p.
447. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature (2009) / International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature; eds. L.G. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell. – Karger, 2009. – 138 p.

448. Simple and Fast Microscale Procedure for Transfection and Quantification of Reporter Gene Expression in Eukaryotic Cells / A. Surovoy, I. Flechsler, F. Gaunitz [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 1998. – Vol. 451. – P. 457–460.
449. Sanes, J.R. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos / J.R. Sanes, J.L. Rubenstein, J.F. Nicolas // *The EMBO Journal*. – 1986. – Vol. 5, № 12. – P. 3133–3142.
450. Phase I/II trial of gene therapy with autologous tumor cells modified with tag7/PGRP-S gene in patients with disseminated solid tumors / V.M. Moiseyenko, A.O. Danilov, I.A. Baldueva [et al.]. – Text: electronic // *Annals of Oncology*. – 2005. – Vol. 16, № 1. – P. 162–168. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598955/> (date accessed: 20.12.2020).
451. Chomczynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi. – Text: electronic // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 162, № 1. – P. 156–159. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/> (date accessed: 22.06.2022).
452. Biophysical Properties and Motility of Human Mature Dendritic Cells Deteriorated by Vascular Endothelial Growth Factor through Cytoskeleton Remodeling / Z.-Q. Hu, H. Xue, J. Long [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17, № 11. – P. 1756.
453. Interleukin-10 reorganizes the cytoskeleton of mature dendritic cells leading to their impaired biophysical properties and motilities / X. Xu, X. Liu, J. Long [et al.] // *Plos ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. e0172523.
454. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells / J.K. Peper, H. Schuster, M.W. Löffler [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Immunological Methods*. – 2014. – Vol. 405. – P. 192–198. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486140/> (date accessed: 06.10.2022).
455. Everitt, B.S. *Statistical Aspects of the Design and Analysis of Clinical Trials* / B.S. Everitt, A. Pickles. – Published by Imperial College Press and distributed by World Scientific Publishing Co, 2004. – 320 p.
456. Scherer, W.F. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix / W.F. Scherer, J.T. Syverton, G.O. Gey // *J. Exp. Med.* – 1953. – Vol. 97, № 5. – P. 695–710.
457. From clinical specimens to human cancer preclinical models – a journey the NCI-cell line database – 25 years later / J.L. Mulshine, P. Ujhazy, M. Antman [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2020. – Vol. 121, № 8–9. – P. 3986–3999. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31803961/> (date accessed: 30.09.2022).
458. Derivation and basic characterization of colorectal carcinoma primary cell lines / L. Krbal, J. Soukup, S. John, V. Hanusova // *Biomedical Papers*. – 2017. – Vol. 161, № 4. – P. 360–368.
459. Establishment and characterization of the NCC-SS1-C1 synovial sarcoma cell line / F. Kito, R. Oyama, Y. Takai [et al.] // *Human Cell*. – 2018. – Vol. 31, № 2. – P. 167–174.
460. Cybula, M. Review Patient-derived tumor models are attractive tools to repurpose drugs for ovarian cancer treatment: pre-clinical updates / M. Cybula, M. Bieniasz. – Text: electronic // *Oncotarget*. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 553–575. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35359749/> (date accessed: 30.09.2022).
461. Patient-derived cancer models: Valuable platforms for anticancer drug testing / S. Genta, B. Coburn, D.W. Cescon, A. Spreafico. – Text: electronic // *Front. Oncol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 976065. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36033445> (date accessed: 03.10.2022).
462. Choosing the right cell line for renal cell cancer research / K.K. Brodaczewska, C. Szczylik, M. Fiedorowicz [et al.] // *Molecular Cancer*. – 2016. – Vol. 15, № 1. – P. 83.
463. Culture of low passage colorectal cancer cells and demonstration of variation in selected tumour marker expression / M. Arul, A.C. Roslani, C.L.L. Ng, S.H. Cheah // *Cytotechnology*. – 2014. – Vol. 66, № 3. – P. 481–491.

464. Berg, E.L. Consideration of the cellular microenvironment: Physiologically relevant co-culture systems in drug discovery / E.L. Berg, Y.-C. Hsu, J.A. Lee // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2014. – Vols. 69–70. – P. 190–204.
465. Establishment and characterization of a prostate cancer cell line from a prostatectomy specimen for the study of cellular interaction / R. Wang, G.C.Y. Chu, X. Wang [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 145, № 8. – P. 2249–2259.
466. Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis / N.M. Navone, M. Olive, M. Ozen [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 1997. – Vol. 3, № 12, pt. 1. – P. 2493–2500.
467. Rebecca, V.W. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma / V.W. Rebecca, R. Somasundaram, M. Herlyn. – Text: electronic // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32504051/> (date accessed: 16.08.2021).
468. Усовершенствование метода приготовления аутологичных модифицированных противоопухолевых вакцин для активной специфической иммунотерапии больных с диссеминированными солидными опухолями / А.О. Данилов, С.С. Ларин, А.Б. Данилова [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 219–227.
469. Establishment and Characterization of Human Renal Cancer and Normal Kidney Cell Lines / T. Ebert, N.H. Bander, C.L. Finstad [et al.] // *Cancer Res*. – 1990. – Vol. 50, № 1. – P. 5531–5536.
470. Molecular and Cellular Characterization of Human Renal Cell Carcinoma Cell Lines / P. Anglard, E. Trahan, S. Liu [et al.] // *Cancer Res*. – 1992. – Vol. 52, № 2. – P. 348–356.
471. Short-term tumor cell lines from renal cell carcinoma for use as autologous tumor cell vaccines in the treatment of kidney cancer / R.O. Dillman, L.D. Beutel, A.N. Cornforth, S.K. Nayak // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. – 2000. – Vol. 15, № 2. – P. 161–168.
472. Short-term autologous tumor cell lines for the active specific immunotherapy of patients with metastatic melanoma / R.O. Dillman, C. DeLeon, L.D. Beutel [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2001. – Vol. 39, № 1–2. – P. 115–123.
473. Establishment and characterization of colon carcinoma and renal cell carcinoma primary cultures / B. Trojanek, S. Niemitz, B. Micka [et al.] // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. – 2000. – Vol. 15, № 2. – P. 169–174.
474. Novel cell lines derived by long-term culture of primary uveal melanomas / G. Nareyek, M. Zeschneck, N. Bornfeld, G. Anastassiou // *Ophthalmologica*. – 2009. – Vol. 223, № 3. – P. 196–201.
475. Establishment and characterization of clear cell renal cell carcinoma cell lines with different metastatic potential from Chinese patients / X. Tan, S. He, Y. Han [et al.] // *Cancer Cell International*. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 20.
476. Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies / X. Pan, A. Yoshida, A. Kawai, T. Kondo // *Expert Rev. Proteomics*. – 2016. – Vol. 13, № 2. – P. 227–240.
477. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping / X. Dai, H. Cheng, Z. Bai, J. Li // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8, № 16. – P. 3131–3141.
478. Establishment and characterization of a novel cell line (cc-006cpm8) of moderately/poorly differentiated colorectal adenocarcinoma derived from a primary tumor of a patient / X. Chu, Y. Xue, X. Huo [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2019. – Vol. 55, № 1. – P. 243–256.
479. Brain metastasis cell lines panel: A public resource of organotropic cell lines / M. Valiente, A.E.D. van Swearingen, C.K. Anders [et al.]. – Text: electronic // *Cancer Research*. – 2020. – Vol. 80, № 20. – P. 4314–4323. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32641416/> (date accessed: 03.10.2022).
480. Development and Characterization of Human Primary Cholangiocarcinoma Cell Lines / A. Isidan, A. Yenigun, D. Soma [et al.]. – Text: electronic // *The American Journal of Pathology*. – 2022. – Vol. 192, № 9. – P. 1200–1217. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35640676/> (date accessed: 03.10.2022).
481. Establishment, authenticity, and characterization of cervical cancer cell lines / M. de L. Zuñiga Martinez, C.M. López Mendoza, J. Tenorio Salazar [et al.]. – Text: electronic // *Mol. Cell. Oncol.* –

2022. – Vol. 9, № 1. – P. 2078628. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35692560/> (date accessed: 03.10.2022).
482. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro [et al.] // *JNCI*. – 1973. – Vol. 51, № 5. – P. 1417–1423.
483. Human Neoplastic and Normal Cells in Tissue Culture. I. Cell Lines Derived From Malignant Melanomas and Normal Melanocytes / B.C. Giovanella, J.S. Stehlin, C. Santamaria [et al.] // *JNCI*. – 1976. – Vol. 56, № 6. – P. 1131–1142.
484. Establishment of 15 cancer cell lines from patients with lung cancer and the potential tools for immunotherapy / M. Sugaya, M. Takenoyama, T. Osaki [et al.] // *Chest*. – 2002. – Vol. 122, № 1. – P. 282–288.
485. Establishment and molecular characterisation of seven novel soft-tissue sarcoma cell lines / A. Salawu, M. Fernando, D. Hughes [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 115, № 9. – P. 1058–1068.
486. Establishment of epithelial and fibroblast cell cultures and cell lines from primary renal cancer nephrectomies / N.Y. Yap, T.A. Ong, C. Morais [et al.] // *Cell Biology International*. – 2019. – Vol. 43, № 6. – P. 715–725.
487. Establishment of a Primary Culture of Patient-derived Soft Tissue Sarcoma / A. De Vita, L. Mercatali, G. Miserocchi [et al.] // *J. Visual. Exp.* – 2018. – Vol. 2018, № 134. – P. e56767.
488. Efficient generation of patient-matched malignant and normal primary cell cultures from clear cell renal cell carcinoma patients: clinically relevant models for research and personalized medicine / N.C. Lobo, C. Gedye, A.J. Apostoli [et al.] // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 485.
489. Melanoma antigens and related immunological markers / J. Pitcovski, E. Shahar, E. Aizenshtein, R. Gorodetsky // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2017. – Vol. 115. – P. 36–49.
490. Therapeutic cancer vaccines / M. Saxena, S. H. van der Burg, C.J.M. Melief, N. Bhardwaj. – Text : electronic // *Nat. Rev. Cancer*. – 2021. – Vol. 21, № 6. – P. 360–378. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33907315/> (date accessed: 23.06.2022).
491. Mukherji, B. Immunology of melanoma / B. Mukherji // *Clinics in Dermatology*. – 2013. – Vol. 31, № 2. – P. 156–165.
492. Melanoma-specific antigen-associated antitumor antibody reactivity as an immune-related biomarker for targeted immunotherapies / A. Rähni [et al.]. – Text : electronic // *Communications Medicine*. – 2022. – Vol. 2, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35603273/> (date accessed: 23.06.2022).
493. Faramarzi, S. Melanoma: A prototype of cancer-testis antigen-expressing malignancies / S. Faramarzi, S. Ghafouri-Fard // *Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 9, № 13. – P. 1103–1113.
494. Expression of cancer/testis antigens in cutaneous melanoma: A systematic review / D. Tio, F.R. Kasiem, M. Willemsen [et al.]. – Text : electronic // *Melanoma Res*. – 2019. – Vol. 29, № 4. – P. 349–357. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30615012/> (date accessed: 23.06.2022).
495. Xiong, T.F. Expression and clinical significance of S100 family genes in patients with melanoma / T.F. Xiong, F.Q. Pan, D. Li // *Melanoma Research*. – 2019. – Vol. 29, № 1. – P. 23–29.
496. CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor / Z. Wang, Q. Xu, N. Zhang [et al.]. – Text : electronic // *Transduction and Targeted Therapy*. – 2020. – Vol. 5. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32782280/> (date accessed: 23.06.2022).
497. ER-aminopeptidase 1 determines the processing and presentation of an immunotherapy-relevant melanoma epitope / K. Textoris-Taube, C. Cammann, P. Henklein [et al.]. – Text : electronic // *European Journal of Immunology*. – 2020. – Vol. 50, № 2. – P. 270–283. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31729751/> (date accessed: 23.06.2022).
498. Boon, T. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes / T. Boon, P. van der Bruggen // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – Vol. 183, № 3. – P. 725–729.
499. Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy / P.F. Robbins, M. El-Gamil, Y. Kawakami [et al.] // *Cancer Research*. – 1994. – Vol. 54, № 12. – P. 3124–3126.

500. Prognostic and predictive biomarkers in stage III melanoma: Current insights and clinical implications / L. Tonella, V. Pala, R. Ponti [et al.]. – Text : electronic // MDPI. – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 4561. – URL: [pmc/articles/PMC8123895/](https://pmc/articles/PMC8123895/) (date accessed: 03.10.2022).
501. Finn, O.J. Human tumor antigens yesterday, today, and tomorrow / O.J. Finn // *Cancer Immunology Research*. – 2017. – Vol. 5, № 5. – P. 347–354.
502. Algarra, I. The HLA crossroad in tumor immunology / I. Algarra, T. Cabrera, F. Garrido // *Human Immunology*. – 2000. – Vol. 61, № 1. – P. 65–73.
503. Distinct molecular mechanisms of altered HLA class II expression in malignant melanoma / S. Meyer, D. Handke, A. Mueller [et al.]. – Text : electronic // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, № 15. – P. 3907. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34359808/> (date accessed: 23.06.2022).
504. MAGE-6 encodes HLA-DRbeta1\*0401-presented epitopes recognized by CD4+ T cells from patients with melanoma or renal cell carcinoma / T. Tatsumi, L.S. Kierstead, E. Ranieri [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2003. – Vol. 9, № 3. – P. 947–954.
505. Byrne, S.N. High levels of Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and a decreased CD4+ T cell infiltration, enables murine skin tumours to progress / S.N. Byrne, G.M. Halliday // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2003. – Vol. 52, № 6. – P. 396–402.
506. Song, Q. Therapeutic cancer vaccines: From initial findings to prospects / Q. Song, C. Zhang, X. Wu // *Immunology Letters*. – 2018. – Vol. 196. – P. 11–21.
507. Radford, K.J. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491) / K.J. Radford, J. Mallesch, P. Mersey // *International Journal of Cancer*. – 1995. – Vol. 62, № 5. – P. 631–635.
508. Mejia, O. CD63 expression in metastatic melanoma and melanocytic nevi in lymph nodes / O. Mejia, T. Vazquez, J. Alexis. – Text : electronic // *Pathology, Research and Practice*. – 2021. – Vol. 223. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34051511/> (date accessed: 23.06.2022).
509. CD63 tetraspanin is a negative driver of epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma cells / A. Lupia, S. Peppicelli, E. Witort [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2014. – Vol. 134, № 12. – P. 2947–2956.
510. Ordóñez, N.G. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: A review and update / N.G. Ordóñez // *Human Pathology*. – 2014. – Vol. 45, № 2. – P. 191–205.
511. Gajjar, N.A. Is MAGE-1 expression in metastatic malignant melanomas really helpful? / N.A. Gajjar, A.J. Cochran, S.W. Binder // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2004. – Vol. 28, № 7. – P. 883–888.
512. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: Controversial in name and in function / A.C. Theos, S.T. Truschel, G. Raposo, M.S. Marks // *Pigment Cell Research*. – 2005. – Vol. 18, № 5. – P. 322–336.
513. Ex Vivo Derived Primary Melanoma Cells: Implications for Immunotherapeutic Vaccines / R. Suriano, S. Rajoria, A.L. George [et al.] // *Cancer*. – 2013. – Vol. 4, № 5. – P. 371–382.
514. Steingrímsson, E. Melanocytes and the Microphthalmia Transcription Factor Network / E. Steingrímsson, N.G. Copeland, N.A. Jenkins // *Annual Review of Genetics*. – 2004. – Vol. 38, № 1. – P. 365–411.
515. Seberg, H.E. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma / H.E. Seberg, E. Van Otterloo, R.A. Cornell // *Pigment Cell and Melanoma Research*. – 2017. – Vol. 30, № 5. – P. 454–466.
516. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma / J.L. Simmons, C.J. Pierce, F. Al-Ejeh, G.M. Boyle // *Sci. Rep*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 10909.
517. Heterogeneity of Metastatic Melanoma / S. Zand, E. Buzney, L.M. Duncan, S.S. Dadras // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2016. – Vol. 146, № 3. – P. 353–360.
518. Goding, C.R. MITF – the first 25 years / C.R. Goding, H. Arnheiter. – Text : electronic // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2019. – Vol. 33, № 15–16. – P. 983–1007. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31123060/> (date accessed: 24.06.2022).

519. MITF induces escape from innate immunity in melanoma / L. Sánchez-del-Campo, R. Martí-Díaz, M.F. Montenegro [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 40, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33789714/> (date accessed: 24.06.2022).
520. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression / X. Lei, C.-W. Guan, Y. Song, H. Wang // *Cancer Cell International*. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 3.
521. Wang, Z. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion / Z. Wang, X. Yan // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 330, № 2. – P. 150–162.
522. E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression / J. Lade-Keller, R. Riber-Hansen, P. Guldberg [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2013. – Vol. 169, № 3. – P. 618–628.
523. A central role for cadherin signaling in cancer / A. Kourtidis, R. Lu, L.J. Pence, P.Z. Anastasiadis // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 358, № 1. – P. 78–85.
524. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer / K.M. Mrozik, O.W. Blaschuk, C.M. Cheong [et al.] // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 939.
525. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications / C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J.W. Freeman // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 64.
526. CD44 expression level and isoform contributes to pancreatic cancer cell plasticity, invasiveness, and response to therapy / S. Zhao, C. Chen, K. Chang [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – № 22. – P. 5592–5604.
527. Expression of differentiation melanoma-associated antigen genes is associated with favorable disease outcome in advanced-stage melanomas. / H. Takeuchi, C. Kuo, D. L. Morton [et al.] // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63, № 2. – P. 441–448.
528. Fernandez-Flores, A. Prognostic factors for melanoma progression and metastasis: from Hematoxylin-Eosin to genetics / A. Fernandez-Flores // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2012. – Vol. 53, № 3. – P. 449–459.
529. Expression of gp100, MART-I, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: Implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC melanoma cooperative group / T.J. De Vries, M. Smeets, R. De Graaf [et al.] // *Journal of Pathology*. – 2001. – Vol. 193, № 1. – P. 13–20.
530. The Spatial Landscape of Progression and Immunoediting in Primary Melanoma at Single-Cell Resolution / A.J. Nirmal, Z. Maliga, T. Vallius [et al.] // *Cancer Discov*. – 2022. – Vol. 12, № 6. – P. 1518–1541.
531. From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression / O. Schmidt-Kittler, T. Ragg, A. Daskalakis [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100, № 13. – P. 7737–7742.
532. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271 / A.D. Boiko, O. V Razorenova, M. Van De Rijn [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 466, № 7302. – P. 133–137.
533. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells / T. Schatton, U. Schütte, N.Y. Frank [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70, № 2. – P. 697–708.
534. Hachey, S.J. Therapeutic implications of melanoma heterogeneity / S.J. Hachey, A.D. Boiko // *Experimental Dermatology*. – 2016. – Vol. 25, № 7. – P. 497–500.
535. Expression of melanoma-associated antigens in melanoma cell cultures / M. Urosevic, B. Braun, J. Willers [et al.] // *Experimental Dermatology*. – 2005. – Vol. 14, № 7. – P. 491–497.
536. Molecular detection of MART-1, tyrosinase and MIA in peripheral blood, lymph nodes and metastatic sites of stage III/IV melanoma patients / C.D. Enk, M. Lotem, Z. Gimón, M. Hochberg // *Melanoma Research*. – 2004. – Vol. 14, № 5. – P. 361–365.
537. Standard melanoma-associated markers do not identify the MM127 metastatic melanoma cell line / P. Haridas, J.A. McGovern, A.S. Kashyap [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 24569.

538. Down-regulation of HLA Class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: Association with disease progression / T. Kageshita, S. Hirai, T. Ono [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 1999. – Vol. 154, № 3. – P. 745–754.
539. Major histocompatibility complex class I and tumour immuno-evasion: how to fool T cells and natural killer cells at one time / D. Fruci, M. Benevolo, L. Cifaldi [et al.] // *Current Oncology*. – 2012. – Vol. 19, № 1. – P. 39–41.
540. Shklovskaya, E. MHC class I deficiency in solid tumors and therapeutic strategies to overcome it / E. Shklovskaya, H. Rizos. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 6741. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34201655/> (date accessed: 10.11.2021).
541. Fishman, D. Non-immune functions of MHC class I glycoproteins in normal and malignant cells / D. Fishman, S. Elhyany, S. Segal // *Folia Biologica*. – 2004. – Vol. 50, № 2. – P. 35–42.
542. Wier, M.L. Effects of cell density and extracellular matrix on the lateral diffusion of major histocompatibility antigens in cultured fibroblasts / M.L. Wier, M. Edidin // *Journal of Cell Biology*. – 1986. – Vol. 103, № 1. – P. 215–222.
543. Potential Role of HLA Class I Antigens in the Glycolytic Metabolism and Motility of Melanoma Cells / S. Peppicelli, Ruzzolini, Andreucci [et al.] // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, № 9. – P. 1249.
544. HSP-70, C-myc and HLA-DR expression in patients with cutaneous malignant melanoma metastatic in lymph nodes / A. Kalogeraki, F. Garbagnati, K. Darivianaki [et al.] // *Anticancer Research*. – 2006. – Vol. 26. – P. 3551–3554.
545. Solitary fibrous tumor of the orbit: A clinicopathologic study of six cases with review of the literature / S. Krishnakumar, N. Subramanian, E.R. Mohan [et al.]. – Text : electronic // *Surv. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 48, № 5. – P. 544–554. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14499820/> (date accessed: 10.11.2021).
546. MHC antigens in human melanomas / D.J. Ruiter, V. Mattijssen, E.B. Broecker, S. Ferrone // *Seminars in Cancer Biology*. – 1991. – Vol. 2, № 1. – P. 35–45.
547. Aberrant expression of MHC class II in melanoma attracts inflammatory tumor-specific CD4+T-cells, which dampen CD8+T-cell antitumor reactivity / M. Donia, R. Andersen, J.W. Kjeldsen [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75, № 18. – P. 3747–3759. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26183926/> (date accessed: 03.10.2022).
548. Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors / L. Zitvogel, P.D. Robbins, W.J. Storkus [et al.]. – Text : electronic // *European Journal of Immunology*. – 1996. – Vol. 26, № 6. – P. 1335–1341. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8647214/> (date accessed: 14.08.2020).
549. Marijt, K.A. TEIPP antigens for T-cell based immunotherapy of immune-edited HLA class II low cancers / K.A. Marijt, E.M. Doorduyn, T. van Hall. – Text : electronic // *Mol. Immunol.* – 2019. – Vol. 113. – P. 43–49. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29627136/> (date accessed: 10.11.2021).
550. Moll, R. The human keratins: Biology and pathology / R. Moll, M. Divo, L. Langbein. – Text : electronic // *Histochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 129, № 6. – P. 705–733. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18461349/> (date accessed: 23.07.2020).
551. Werner, S. Epithelial keratins: Biology and implications as diagnostic markers for liquid biopsies / S. Werner, L. Keller, K. Pantel. – Text : electronic // *Mol. Aspects Med.* – 2020. – Vol. 72. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31563278/> (date accessed: 10.11.2021).
552. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: An optimal and practical panel for differential diagnosis / L. Liu, J. Qian, H. Singh [et al.]. – Text : electronic // *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. – 2007. – Vol. 131, № 8. – P. 1290–1297. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17683191/> (date accessed: 23.07.2020).
553. Recent advances of immunohistochemistry for diagnosis of renal tumors / N. Kuroda, A. Tanaka, C. Ohe, Y. Nagashima. – Text : electronic // *Pathol. Int.* – 2013. – Vol. 63, № 8. – P. 381–390. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23957913/> (date accessed: 23.07.2020).

554. Association of cytokeratin 7 and 19 expression with genomic stability and favorable prognosis in clear cell renal cell cancer / K.D. Mertz, F. Demichelis, A. Sboner [et al.]. – Text : electronic // *Int. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 123, № 3. – P. 569–576. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18478571/> (date accessed: 23.07.2020).
555. Clinical significance of circulating tumour cells and Ki-67 in renal cell carcinoma / J. Song, Z. Yu, B. Dong [et al.]. – Text : electronic // *World Journal of Surgical Oncology.* – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 156. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34034739/> (date accessed: 03.10.2022).
556. Truong, L.D. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms / L.D. Truong, S.S. Shen. – Text : electronic // *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* – 2011. – Vol. 135, № 1. – P. 92–109. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21204715/> (date accessed: 23.07.2020).
557. Sanghvi-Shah, R. Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development / R. Sanghvi-Shah, G.F. Weber. – Text : electronic // *Frontiers Media S.A.* – 2017. – Vol. 5. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28959689/> (date accessed: 23.07.2020).
558. Karantza, V. Keratins in health and cancer: More than mere epithelial cell markers / V. Karantza. – Text : electronic // *Oncogene.* – 2011. – Vol. 30, № 2. – P. 127–138. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20890307/> (date accessed: 23.07.2020).
559. Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion / Y.W. Chu, R.B. Runyan, R.G. Oshima, M.J.C. Hendrix. – Text : electronic // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1993. – Vol. 90, № 9. – P. 4261–4265. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7683431/> (date accessed: 23.07.2020).
560. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells / K. Paňková, D. Rösel, M. Novotný, J. Brábek. – Text : electronic // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 63–71. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19707854/> (date accessed: 23.07.2020).
561. Schaefer, I.M. Diagnostic Immunohistochemistry for Soft Tissue and Bone Tumors: An Update / I.M. Schaefer, J.L. Hornick. – Text : electronic // *Advances in Anatomic Pathology.* – 2018. – Vol. 25, № 6. – P. 400–412. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30134255/> (date accessed: 23.07.2020).
562. Miettinen, M. Immunohistochemistry of soft tissue tumours – review with emphasis on 10 markers / M. Miettinen – Text : electronic // *Histopathology.* – 2014. – Vol. 64, № 1. – P. 101–118. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111893/> (date accessed: 23.07.2020).
563. Семнадцатилетний опыт повседневной молекулярной диагностики рака. Возможности и ограничения иммуногистохимического анализа в клинической онкологии / С.В. Петров, Д.Э. Цыплаков, Р.Н. Кулагин [и др.] // *Бюллетень СО РАМН.* – 2011. – Т. 31, № 2. – С. 75–80.
564. Fisher, C. Calponin and H-caldesmon expression in synovial sarcoma; the use of calponin in diagnosis / C. Fisher, E. Montgomery, V. Healy. – Text : electronic // *Histopathology.* – 2003. – Vol. 42, № 6. – P. 588–593. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12786895/> (date accessed: 23.07.2020).
565. Calponin-3 is critical for coordinated contractility of actin stress fibers / K. Ciuba, W. Hawkes, S. Tojkander [et al.]. – Text : electronic // *Scientific Reports.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30518778/> (date accessed: 23.07.2020).
566. Mammalian calponin. Identification and expression of genetic variants / P. Strasser, M. Gimona, H. Moessler [et al.]. – Text : electronic // *FEBS Letters.* – 1993. – Vol. 330, № 1. – P. 13–18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8370452/> (date accessed: 23.07.2020).
567. Expression and clinical significance of H-caldesmon in gastrointestinal stromal tumor: is it a specific marker for myogenic differentiation? / G. Yu, J. Xu, L. Jiang [et al.]. – Text : electronic // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* – 2019. – Vol. 12, № 7. – P. 2566–2571. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31934084/> (date accessed: 23.07.2020).
568. H-Caldesmon in leiomyosarcoma and tumors with smooth muscle cell-like differentiation: Its specific expression in the smooth muscle cell tumor / K. Watanabe, T. Kusakabe, N. Hoshi [et al.]. – Text : electronic // *Human Pathology.* – 1999. – Vol. 30, № 4. – P. 392–396. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10208459/> (date accessed: 23.07.2020).



569. Satelli, A. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy / A. Satelli, S. Li. – Text : electronic // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68, № 18. – P. 3033–3046. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637948/> (date accessed: 23.07.2020).
570. A novel function for vimentin: The potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis / M. Li, B. Zhang, X. Wang [et al.]. – Text : electronic // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 29, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20701774/> (date accessed: 23.07.2020).
571. Kidd, M.E. The role of Vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer / M.E. Kidd, D.K. Shumaker, K.M. Ridge. – Text : electronic // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 50, № 1. – P. 1–6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23980547/> (date accessed: 23.07.2020).
572. Vimentin on the move: New developments in cell migration [version 1; referees: 2 approved] / R.A. Battaglia, S. Delic, H. Herrmann, N.T. Snider. – Text : electronic // F1000 Research Ltd. – 2018. – Vol. 7. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30505430/> (date accessed: 23.07.2020).
573. Seledtsov, V.I. Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies / V.I. Seledtsov, A.G. Goncharov, G.V. Seledtsova // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 851–869.
574. Cancer-testis antigens in triple-negative breast cancer: Role and potential utility in clinical practice / R.A. Lam, T.Z. Tien, C.R. Joseph [et al.]. – Text : electronic // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 15. – P. 3875. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34359776/> (date accessed: 03.10.2022).
575. Ludwig Institute for Cancer Research. CTpedia. – Text : electronic. – URL: <http://www.cta.lncc.br/> (date accessed: 10.11.2021).
576. Genomic Organization, Incidence, and Localization of the SPAN-X Family of Cancer-Testis Antigens in Melanoma Tumors and Cell Lines / V.A. Westbrook, P.D. Schoppee, A.B. Diekman [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10, № 1, pt. 1. – P. 101–112. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14734458/> (date accessed: 23.07.2020).
577. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers / J. Yao, O.L. Caballero, W.K.A. Yung [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Immunology Research*. – 2014. – Vol. 2, № 4. – P. 371–379. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24764584/> (date accessed: 24.07.2020).
578. Lezcano, C. PRAME Immunohistochemistry as an Ancillary Test for the Assessment of Melanocytic Lesions / C. Lezcano, A.A. Jungbluth, K.J. Busam. – Text : electronic // *Surg. Pathol. Clin.* – 2021. – Vol. 14, № 2. – P. 165–175. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34023098/> (date accessed: 02.11.2021).
579. Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters / J.R. Peng, H.S. Chen, D.C. Mou [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Letters*. – 2005. – Vol. 219, № 2. – P. 223–232. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15723723/> (date accessed: 10.11.2021).
580. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer / A.O. Gure, R. Chua, B. Williamson [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, № 22. – P. 8055–8062.
581. Zhang, Y. Expression of cancer–testis antigens in esophageal cancer and their progress in immunotherapy / Y. Zhang, Y. Zhang, L. Zhang. – Text : electronic // Springer. – 2019. – Vol. 145, № 2. – P. 281–291. – URL: <https://pmc/articles/PMC6373256/> (date accessed: 10.11.2021).
582. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 in Primary and Metastatic Cancers / T.S. Park, E.M. Groh, K. Patel [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Immunotherapy*. – 2016. – Vol. 39, № 1. – P. 1–7. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26641256/> (date accessed: 23.07.2020).
583. Cancer-testis antigen SLLP1 represents a promising target for the immunotherapy of multiple myeloma / S. Yousef, J. Heise, N. Lajmi [et al.]. – Text : electronic // *J. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 13, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26088750/> (date accessed: 23.07.2020).
584. SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoal / A. Mandal, K.L. Klotz, J. Shetty [et al.]. – Text : electronic // *Biol. Reprod.* –

2003. – Vol. 68, № 5. – P. 1525–1537. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606493/> (date accessed: 23.07.2020).
585. The spermatozoa protein, SLLP1, is a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies / Z. Wang, Y. Zhang, A. Mandal [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10, № 19. – P. 6544–6550. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15475442/> (date accessed: 23.07.2020).
586. Scanlan, M.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary / M.J. Scanlan. – Text : electronic // *Cancer Immun.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14738373/> (date accessed: 11.11.2021).
587. 5 MAGE-A4, NY-ESO-1 and SAGE mRNA expression rates and co-expression relationships in solid tumours / M. Ishihara, S. Kageyama, Y. Miyahara [et al.]. – Text : electronic // *BMC cancer*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 606. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32600281/> (date accessed: 23.07.2020).
588. Demethylation-mediated upregulation of melanoma-associated antigen-A11 correlates with malignant progression of esophageal squamous cell carcinoma / L. Gu, M. Sang, J. Li [et al.]. – Text : electronic // *Digestive and Liver Disease*. – 2019. – Vol. 51, № 10. – P. 1475–1482. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31155488/> (date accessed: 23.07.2020).
589. Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients / N. Soga, Y. Hori, K. Yamakado [et al.] // *Mol. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 1, № 2. – P. 326–330.
590. Immunohistochemical expression and clinicopathological assessment of the cancer testis antigens NY-ESO-1 and MAGE-A4 in high-grade soft-tissue sarcoma / T. Kakimoto, A. Matsumine, S. Kageyama [et al.]. – Text : electronic // *Oncology Letters*. – 2019. – Vol. 17, № 4. – P. 3937–3943. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30881511/> (date accessed: 23.07.2020).
591. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor / H. Ikeda, B. Lethé, F. Lehmann [et al.]. – Text : electronic // *Immunity*. – 1997. – Vol. 6, № 2. – P. 199–208. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9047241/> (date accessed: 23.07.2020).
592. Gene expression profiling using Nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy / R.E. Beard, D. Abate-Daga, S.F. Rosati [et al.]. – Text : electronic // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, № 18. – P. 4941–4950. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24021875/> (date accessed: 23.07.2020).
593. Мисюрин, В.А. Прогностическое значение экспрессии гена PRAME при солидных опухолях / В.А. Мисюрин. – Text : electronic. // *Иммунология*. – 2018. – Т. 39, № 1. – С. 67–73. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/prognosticheskoe-znachenie-ekspressii-gena-prame-pri-solidnyh-opuholyah> (date accessed: 11.11.2021).
594. Lezcano, C. Comparison of Immunohistochemistry for PRAME With Cytogenetic Test Results in the Evaluation of Challenging Melanocytic Tumors / C. Lezcano, A.A. Jungbluth, K.J. Busam. – Text : electronic // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2020. – Vol. 44, № 7. – P. 893–900. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32317605/> (date accessed: 23.07.2020).
595. Overexpressed PRAME is a potential immunotherapy target in sarcoma subtypes / J. Roszik, W.-L. Wang, J.A. Livingston [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Sarcoma Research*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28630682/> (date accessed: 23.07.2020).
596. Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma / J.A. Hemminger, A.E. war. Toland, T.J. Scharschmidt [et al.] // *Modern Pathology*. – 2014. – Vol. 27, № 9. – P. 1238–1245.
597. Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma / P. Tan, C. Zou, B. Yong [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 419, № 4. – P. 801–808.
598. Cancer-testis antigens expressed in osteosarcoma identified by gene microarray correlate with a poor patient prognosis / C. Zou, J. Shen, Q. Tang [et al.] // *Cancer*. – 2012. – Vol. 118, № 7. – P. 1845–1855.

599. Zhao, Q. PRAME Is a Potential Carcinogenic Biomarker that Correlates with Patient Prognosis and Tumor Immunity Based on Pan-Cancer Analysis / Q. Zhao, Z. Zhang, Y. Wu. – Text : electronic // *Annals of Clinical and Laboratory Science*. – 2022. – Vol. 52, № 2. – P. 185–195. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35414497/> (date accessed: 22.06.2022).
600. NY-ESO-1 expression in synovial sarcoma and other mesenchymal tumors: Significance for NY-ESO-1-based targeted therapy and differential diagnosis / J.P. Lai, P.F. Robbins, M. Raffeld [et al.]. – Text : electronic // *Modern Pathology*. – 2012. – Vol. 25, № 6. – P. 854–858. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22388761/> (date accessed: 11.11.2021).
601. Cancer-testis antigen expression in synovial sarcoma: NY-ESO-1, PRAME, MAGEA4, and MAGEA1 / K. Iura, A. Maekawa, K. Kohashi [et al.] // *Human Pathology*. – 2017. – Vol. 61. – P. 130–139.
602. NY-ESO-1 is a ubiquitous immunotherapeutic target antigen for patients with myxoid/round cell liposarcoma / S.M. Pollack, A.A. Jungbluth, B.L. Hoch [et al.] // *Cancer*. – 2012. – Vol. 118, № 18. – P. 4564–4570.
603. Spontaneous peripheral T-cell responses toward the tumor-associated antigen cyclin D1 in patients with clear cell renal cell carcinoma / S.R. Dannenmann, T. Hermanns, A. Bransi [et al.] // *Cancer Immunology Research*. – 2013. – Vol. 1, № 5. – P. 288–295.
604. PRAME promotes epithelial-to-mesenchymal transition in triple negative breast cancer // *11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis* / G. Al-Khadairi, A. Naik, R. Thomas [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 17, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30602372/> (date accessed: 23.07.2020).
605. Mahmoud, A.M. Cancer testis antigens as immunogenic and oncogenic targets in breast cancer / A.M. Mahmoud. – Text : electronic // *Immunotherapy*. – 2018. – Vol. 10, № 9. – P. 769–778. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926750/> (date accessed: 24.07.2020).
606. Breast cancer is a promising target for vaccination using cancer-testis antigens known to elicit immune responses / M. Taylor, L.M. Bolton, P. Johnson [et al.]. – Text : electronic // *Breast Cancer Research*. – 2007. – Vol. 9, № 4. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17650306/> (date accessed: 24.07.2020).
607. Mohsenzadegan, M. Co-expression of cancer-testis antigens of MAGE-A6 and MAGE-A11 is associated with tumor aggressiveness in patients with bladder cancer / M. Mohsenzadegan [et al.] // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 599.
608. Tumor-associated antigen profiling in breast and ovarian cancer: mRNA, protein or T cell recognition? / S. Kayser, I. Watermann, C. Rentzsch [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2003. – Vol. 129, № 7. – P. 397–409.
609. Pillars Article: Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA // *Science*. – 1999. – Vol. 285, № 5428. – P. 727–729. / S. Bauer, V. Groh, J. Wu [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2018. – Vol. 200, № 7. – P. 2231–2233.
610. Inhibition of MICA and MICB shedding elicits NK-cell-mediated immunity against tumors resistant to cytotoxic T cells / L.F. De Andrade, S. Kumar, A.M. Luoma [et al.] // *Cancer Immunology Research*. – 2020. – Vol. 8, № 6. – P. 769–780.
611. Endoglin is necessary for angiogenesis in human ovarian carcinoma-derived primary endothelial cells / Y. Xu, D. Wang, L.M. Zhao [et al.] // *Cancer Biology and Therapy*. – 2013. – Vol. 14, № 10. – P. 937–948.
612. Prognostic value of serum levels of soluble MICA (sMICA) in patients with prostate cancer / Y. Liu, X. Guo, M. Xing [et al.] // *Brit. J. Biomed. Sci.* – 2018. – Vol. 75, № 2. – P. 98–100.
613. High expression of MICA in human kidney cancer tissue and renal cell carcinoma lines / H.Y. Jia, J.L. Liu, C.J. Zhou [et al.]. – Text : electronic // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 1715–1717. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24641397/> (date accessed: 24.07.2020).
614. Zhang, J. NKG2D ligands in tumor immunity: Two sides of a coin / J. Zhang, F. Basher, J.D. Wu. – Text : electronic // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 97. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25788898/> (date accessed: 24.07.2020).

615. NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy / N. Guerra, Y.X. Tan, N.T. Joncker [et al.]. – Text : electronic // *Immunity*. – 2008. – Vol. 28, № 4. – P. 571–580. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18394936/> (date accessed: 24.07.2020).
616. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients / N.F.S. Watson, I. Spendlove, Z. Madjd [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 118, № 6. – P. 1445–1452.
617. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: An observational study / E.M. de Kruijf, A. Sajet, J.G.H. van Nes [et al.]. – Text : electronic // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 24. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22257486/> (date accessed: 24.07.2020).
618. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma / Z. Madjd, I. Spendlove, R. Moss [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Immunity*. – 2007. – Vol. 7. – P. 17. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17948965/> (date accessed: 24.07.2020).
619. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients / R.W. McGilvray, R.A. Eagle, P. Rolland [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2010. – Vol. 127, № 6. – P. 1412–1420.
620. Expression of MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) in colorectal cancer / I. Espinoza, S. Agarwal, M. Sakiyama [et al.] // *Front. Biosci.* – Landmark. *Front Biosci (Landmark Ed.)*, 2021. – Vol. 26, № 10. – P. 765–776.
621. Prognostic value of MICA/B in cancers: A systematic review and meta-analysis / Y. Zhao, N. Chen, Y. Yu [et al.]. – Text : electronic // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 56. – P. 96384–96395. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29221214/> (date accessed: 24.07.2020).
622. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands / B.K. Kaiser, D. Yim, I.T. Chow [et al.]. – Text : electronic // *Nature*. – 2007. – Vol. 447, № 7143. – P. 482–486. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17495932/> (date accessed: 03.08.2020).
623. Opposing effects of interferon- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors / C. Zhang, J. Niu, J. Zhang [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Science*. – 2008. – Vol. 99, № 6. – P. 1279–1286. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18422748/> (date accessed: 03.08.2020).
624. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells / A. Zingoni, F. Cecere, E. Vulpis [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2015. – Vol. 195, № 2. – P. 736–748.
625. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) media la eliminación de MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) en el cáncer de células renales / F.Q. Yang, M. Liu, F.P. Yang [et al.] // *Actas Urológicas Españolas*. – 2014. – Vol. 38, № 3. – P. 172–178.
626. Cooperative therapeutic anti-tumor effect of IL-15 agonist ALT-803 and co-targeting soluble NKG2D ligand sMIC / F. Basher, E.K. Jeng, H. Wong, J. Wu // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 814–830.
627. Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape / S. Duan [et al.]. – Text : electronic // *BioMed Central Ltd*, 2019. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30813924/> (date accessed: 03.08.2020).
628. Antibody targeting tumor-derived soluble NKG2D ligand sMIC reprograms NK cell homeostatic survival and function and enhances melanoma response to PDL1 blockade therapy / F. Basher, P. Dhar, X. Wang [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2020. – Vol. 13, № 1. – P. 74.
629. Ngiow, S.F. Re-education of the tumor microenvironment with targeted therapies and immunotherapies / S.F. Ngiow, A. Young. – Text : electronic // *Front. Immunol.* 2020. – Vol. 11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849557/> (date accessed: 11.11.2021).
630. Combinations take centre stage in PD1/PDL1 inhibitor clinical trials / S. Upadhaya, S.T. Neftelino, J.P. Hodge [et al.]. – Text : electronic // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2021. – Vol. 20, № 3. – P. 168–169. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33177720/> (date accessed: 11.11.2021).

631. Stuelten, C.H. Transforming Growth Factor- $\beta$ : An Agent of Change in the Tumor Microenvironment / C.H. Stuelten, Y.E. Zhang. – Text: electronic // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34712672/> (date accessed: 11.11.2021).
632. Mishra, S. CD8+ Regulatory T Cell – A Mystery to Be Revealed / S. Mishra // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 708874.
633. TGF- $\beta$  signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies / X. Shi, J. Yang, S. Deng [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2022. – Vol. 15, № 1. – P. 135.
634. Transforming growth factor- $\beta$  signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy / A. Ahmadi, M. Najafi, B. Farhood, K. Mortezaee // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. – Vol. 234, № 8. – P. 12173–12187.
635. Regulatory T lymphocytes and transforming growth factor beta in epithelial ovarian tumors-prognostic significance / I. Winkler, B. Wilczynska, A. Bojarska-Junak [et al.]. – Text: electronic // *J. Ovar. Res.* – 2015. – Vol. 8, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077607/> (date accessed: 28.07.2020).
636. Tschernia, N.P. Tumor in the Crossfire: Inhibiting TGF- $\beta$  to Enhance Cancer Immunotherapy / N.P. Tschernia, J.L. Gulley // *BioDrugs*. – 2022. – Vol. 36, № 2. – P. 153–180.
637. TGF- $\beta$  signaling networks in the tumor microenvironment / M.K.K. Chan, J.Y. Chung, P.C. Tang [et al.] // *Cancer Letters*. – 2022. – Vol. 550. – P. 215925.
638. Lippitz, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review / B.E. Lippitz // *Lancet Publishing Group*. – 2013. – Vol. 14, № 6. – P. e218–e228.
639. Alterations of expression and regulation of transforming growth factor  $\beta$  in human cancer prostate cell lines / M. Blanchère, E. Saunier, C. Mestayer [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 82, № 4–5. – P. 297–304. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12589936/> (date accessed: 05.08.2020).
640. Bennicelli, J.L. Production of multiple cytokines by cultured human melanomas / J.L. Bennicelli, D.P. Guerry. – Text: electronic // *Experimental Dermatology*. – 1993. – Vol. 2, № 4. – P. 186–190. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7512880/> (date accessed: 06.08.2020).
641. TGF- $\beta$ -induced (TGFBI) protein in melanoma: A signature of high metastatic potential / L. Laudén, J. Siewiera, W. Boukouaci [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2014. – Vol. 134, № 6. – P. 1675–1685. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24499734/> (date accessed: 06.08.2020).
642. Transforming growth factor- $\beta$ 1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin / G. Giannelli, E. Fransvea, F. Marinosci [et al.]. – Text: electronic // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161, № 1. – P. 183–193. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12107103/> (date accessed: 04.08.2020).
643. Katsuno, Y. Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- $\beta$  family / Y. Katsuno, R. Derynck. – Text: electronic // *Dev. Cell*. – 2021. – Vol. 56, № 6. – P. 726–746. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33756119/> (date accessed: 11.11.2021).
644. Brown, N.F. Integrin-mediated TGF $\beta$  activation modulates the tumour microenvironment / N.F. Brown, J.F. Marshall. – Text: electronic // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, № 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31438626/> (date accessed: 04.08.2020).
645. TGF- $\beta$  signaling in cancer metastasis / F. Xie, L. Ling, H. van Dam [et al.]. – Text: electronic // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2018. – Vol. 50, № 1. – P. 121. – 132. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29190313/> (date accessed: 04.08.2020).
646. Hao, Y. TGF- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis / Y. Hao, D. Baker, P. Ten Dijke. – Text: electronic // *MDPI AG*. – 2019. – Vol. 20. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195692/> (date accessed: 04.08.2020).
647. Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer / J. Nemunaitis, R.O. Dillman, P.O. Schwarzenberger [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Clinical Oncology*. – 2006. – Vol. 24,

- № 29. – P. 4721–4730. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16966690/> (date accessed: 04.08.2020).
648. A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer / G. Giaccone, L.A. Bazhenova, J. Nemunaitis [et al.]. – Text : electronic // *European Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 51, № 16. – P. 2321–2329. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26283035/> (date accessed: 04.08.2020).
649. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients / N. Ahmad, A. Ammar, S.J. Storr [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2018. – Vol. 67, № 4. – P. 537–549. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29256156/> (date accessed: 05.08.2020).
650. IL-10 in cancer: an essential thermostatic regulator between homeostatic immunity and inflammation – a comprehensive review / K.S. Rallis, A.E. Corrigan, H. Dadah [et al.] // *Future Oncology* (London, England). – 2022. – Vol. 29. – P. 3349–3365.
651. Gonzalez-Garza, T.M. IL10 as Cancer Biomarker / M.T. Gonzalez-Garza, D.E. Cruz-Vega, C. Maldonado-Bernal. – Text : electronic // *Translational Research in Cancer*. – IntechOpen. – 2021. – Vol. 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3530989/> (date accessed: 27.09.2022).
652. Scientific reports concerning the impact of interleukin 4, interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$  on cancer cells / K. Kwasniak, J. Czarnik-Kwasniak, A. Maziarz [et al.]. – Text : electronic // *Central European Journal of Immunology*. – 2019. – Vol. 44, № 2. – P. 190–200. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31530989/> (date accessed: 05.08.2020).
653. Colon carcinoma cell lines stimulate monocytes and lamina propria mononuclear cells to produce IL-10 / T. Kucharzik [et al.]. – Text : electronic // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1997. – Vol. 110, № 2. – P. 296–302. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9367416/> (date accessed: 07.08.2020).
654. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma / J. Nemunaitis, T. Fong, P. Shabe [et al.] // *Cancer Investigation*. – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 239–247.
655. Interleukin 10 production by human melanoma / T. Sato, P. McCue, K. Masuoka [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 1996. – Vol. 2, № 8. – P. 1383–1390. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9816311/> (date accessed: 07.08.2020).
656. Ascites IL-10 Promotes Ovarian Cancer Cell Migration / D. Lane, I. Matte, P. Garde-Granger [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Microenvironment*. – 2018. – Vol. 11, № 2–3. – P. 115–124. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30039195/> (date accessed: 07.08.2020).
657. Wang, K. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer / K. Wang, M. Karin. – Text : electronic // *Advances in Cancer Research*. – Vol. 128. – P. 173–196. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216633/> (date accessed: 11.08.2020).
658. Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10 / F. Salazar-Onfray, J. Charo, M. Petersson [et al.]. – Text : electronic // *J. Immunol.* (Baltimore, Md.: 1950). – 1997. – Vol. 159, № 7. – P. 3195–3202. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9317117/> (date accessed: 05.08.2020).
659. Preoperative plasma level of IL-10 but not of proinflammatory cytokines is an independent prognostic factor in patients with gastric cancer / A. Szaflarska, A. Szczepanik, M. Siedlar [et al.]. – Text : electronic // *Anticancer Research*. – 2009. – Vol. 29, № 12. – P. 5005–5012. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20044609/> (date accessed: 11.08.2020).
660. Prognostic value of circulating cytokines on overall survival and disease-free survival in cancer patients / L. Visconti, K. Nelissen, L. Deckx [et al.]. – Text : electronic // *Biomarkers in Medicine*. – 2014. – Vol. 8, № 2. – P. 297–306. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24521026/> (date accessed: 11.08.2020).
661. Tolerogenic Dendritic Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases / O. Morante-Palacios, F. Fondelli, E. Ballestar, E.M. Martínez-Cáceres. – Text : electronic // *Trends Immunol.* – 2021. – Vol. 42, № 1. – P. 59–75. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33293219/> (date accessed: 04.10.2022).

662. Mosser, D.M. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine / D.M. Mosser, X. Zhang. – Text : electronic // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – Vol. 226, № 1. – P. 205–218. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19161426/> (date accessed: 11.08.2020).
663. Zhao, Y. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor / Y. Zhao, A.A. Adjei. – Text : electronic // *The Oncologist*. – 2015. – Vol. 20, № 6. – P. 660–673. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26001391/> (date accessed: 28.07.2020).
664. Apte, R.S. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development / R.S. Apte, D.S. Chen, N. Ferrara // *Cell*. – 2019. – Vol. 176, № 6. – P. 1248–1264.
665. Wiszniak, S. Exploring the intracrine functions of VEGF-A / S. Wiszniak, Q. Schwarz. – Text : electronic // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 128. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33478167/> (date accessed: 19.11.2021).
666. Роль COX-2 в регуляции метастатического потенциала опухолевых клеток молочной железы человека / М.А. Таипов, З.Н. Никифорова, И.А. Кудрявцев [и др.] // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2014. – № 1. – С. 8–14.
667. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment / M. Murakami, Y. Zheng, M. Hirashima [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2008. – Vol. 28, № 4. – P. 658–664.
668. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance / W. Zou // *Nature Reviews Cancer*. – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 263–274.
669. Gasser, S. The role of the tumour microenvironment in immunotherapy / S. Gasser, L.H.K. Lim, F.S.G. Cheung // *BioScientifica Ltd*. – 2017. – Vol. 24, № 12. – P. T283–T295.
670. Leenders, W.P.J. Vessel co-option: How tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis / W.P.J. Leenders, B. Küsters, R.M.W. De Waal. – Text : electronic // *Endothelium*. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 83–87. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12200959/> (date accessed: 29.07.2020).
671. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis / A. Takahashi, H. Sasaki, S.J. Kim [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Research*. – 1994. – Vol. 54, № 15. – P. 4233–4237. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7518352> (date accessed: 29.07.2020).
672. Kim, K.J. Role of placenta growth factor in cancer and inflammation / K.J. Kim, C.S. Cho, W.U. Kim // *Experimental and Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 44, № 1. – P. 10–19.
673. PIGF knockdown attenuates hypoxia-induced stimulation of cell proliferation and glycolysis of ung adenocarcinoma through inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway / W. Zhang, Y. Zhang, W. Zhou [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Cell International*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33407494/> (date accessed: 19.11.2021).
674. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation / G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, P. Allavena. – Text : electronic // *J. Leukoc. Biol*. – 2009. – Vol. 86, № 5. – P. 1065–1073. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19741157/> (date accessed: 29.07.2020).
675. Geindreau, M. Vascular endothelial growth factor, a key modulator of the anti-tumor immune response / M. Geindreau, F. Ghiringhelli, M. Bruchard. – Text : electronic // *MDPI*. – 2021. – Vol. 22. – URL: <https://pmc/articles/PMC8124522/> (date accessed: 19.11.2021).
676. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor / M. Marcellini, N. De Luca, T. Riccioni [et al.]. – Text : electronic // *Am. J. Pathol*. – 2006. – Vol. 169, № 2. – P. 643–654. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16877362/> (date accessed: 29.07.2020).
677. Continuous endoglin (CD105) overexpression disrupts angiogenesis and facilitates tumor cell metastasis / C. Ollauri-Ibáñez, E. Núñez-Gómez [et al.]. – Text : electronic // *Angiogenesis*. – 2020. – Vol. 23, № 2. – P. 231–247. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31897911/> (date accessed: 19.11.2021).
678. Endoglin expression on cancer-associated fibroblasts regulates invasion and stimulates colorectal cancer metastasis / M. Paauwe, M.J.A. Schoonderwoerd, R.F.C.P. Helderma [et al.]. – Text :

- electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2018. – Vol. 24, № 24. – P. 6331–6344. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29945992/> (date accessed: 12.11.2020).
679. Weaver, A.M. Invadopodia: Specialized cell structures for cancer invasion / A.M. Weaver // *Clin. Exp. Metastasis*. – 2006. – Vol. 23, № 2. – P. 97–105.
680. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype / D. Oxmann, J. Held-Feindt, A.M. Stark [et al.] // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27. – P. 3567–3575.
681. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology / R.G. Akwii, M.S. Sajib, F.T. Zahra, C.M. Mikelis. – Text : electronic // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 5. – P. 471. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31108880/> (date accessed: 12.11.2020).
682. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling / M. Felcht, R. Luck, A. Schering [et al.]. – Text : electronic // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, № 6. – P. 1991–2005. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22585576/> (date accessed: 12.11.2020).
683. Effect of the vascular endothelial growth factor expression level on angiopoietin-2-mediated nasopharyngeal carcinoma growth / H.H. Chen, B.Q. Weng, K.J. Cheng [et al.]. – Text : electronic // *BioMed Centra Ltd.* – 2014. – Vol. 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24581323/> (date accessed: 12.11.2020).
684. Systemic overexpression of angiopoietin-2 promotes tumor microvessel regression and inhibits angiogenesis and tumor growth / Y. Cao, P. Sonveaux [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 8. – P. 3835–3844. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17440098/> (date accessed: 12.11.2020).
685. Madunić, J. The Urokinase Plasminogen Activator System in Human Cancers: An Overview of Its Prognostic and Predictive Role / J. Madunić. – Text : electronic // *Georg Thieme Verlag*. – 2018. – Vol. 118, № 12. – P. 2020–2036. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30419600/> (date accessed: 12.11.2020).
686. uPAR: An essential factor for Tumor development / T. Lv. [et al.]. – Text : electronic // *J. Cancer*. – 2021. – Vol. 12, № 23. – P. 7026–7040. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34729105> (date accessed: 19.11.2021).
687. Plasminogen activation and cancer / K. Danø, N. Behrendt, G. Høyer-Hansen [et al.]. – Text : electronic // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 93, № 4. – P. 676–681. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841311/> (date accessed: 12.11.2020).
688. Tumor budding, uPA, and PAI-1 in colorectal cancer: Update of a prospective study / B. Märkl, J. Hardt, S. Franz [et al.]. – Text : electronic // *Gastroenterology Research and Practice*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 6504960. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286517/> (date accessed: 19.11.2021).
689. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes the Recruitment and Polarization of Macrophages in Cancer / M.H. Kubala, V. Punj, V.R. Placencio-Hickok [et al.]. – Text : electronic // *Cell Reports*. – 2018. – Vol. 25, № 8. – P. 2177–2191.e7. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30419600/> (date accessed: 12.11.2020).
690. Nicolini, A. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future / A. Nicolini, P. Ferrari, M.J. Duffy // *Semin. Cancer Biol.* – 2018. – Vol. 52, pt. 1. – P. 56–73.
691. Schlessinger, J. Receptor tyrosine kinases: Legacy of the first two decades / J. Schlessinger. – Text : electronic // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6, № 3. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24591517/> (date accessed: 12.11.2020).
692. Yarden, Y. The ERBB network: At last, cancer therapy meets systems biology / Y. Yarden, G. Pines. – Text : electronic // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12, № 8. – P. 553–563. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22785351/> (date accessed: 12.11.2020).
693. Sigismund, S. Emerging functions of the EGFR in cancer / S. Sigismund, D. Avanzato, L. Lanzetti // *Mol. Oncol.* – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 3–20.
694. Sasaki, T. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment / T. Sasaki, K. Hiroki, Y. Yamashita. – Text : electronic // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – Vol. 13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23986907/> (date accessed: 12.11.2020).



695. Singh, B. EGF receptor ligands: Recent advances / B. Singh, G. Carpenter, R.J. Coffey. – Text : electronic // Faculty of 1000 Ltd. – 2016. – Vol. 5. – P. F1000. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27635238/> (date accessed: 12.11.2020).
696. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy / P. Seshacharyulu, M.P. Ponnusamy, D. Haridas [et al.]. – Text : electronic // Expert Opin. Ther. Targets. – 2012. – Vol. 16, № 1. – P. 15–31. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22239438/> (date accessed: 12.11.2020).
697. Photo-immobilized EGF chemical gradients differentially impact breast cancer cell invasion and drug response in defined 3D hydrogels / S.A. Fisher, R.Y. Tam, A. Fokina [et al.] // Biomaterials. – 2018. – Vol. 178. – P. 751–766.
698. Immunolocalization of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) as a possible immunotarget in diagnosis of some soft tissue sarcomas / G. Musumeci, S. Travali, M. Di Rosa [et al.]. – Text : electronic // Acta Histochemica. – 2013. – Vol. 115, № 7. – P. 719–727. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597914/> (date accessed: 13.11.2020).
699. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities / S. Yamazaki, R. Iwamoto, K. Saeki [et al.]. – Text : electronic // J. Cell. Biol. – 2003. – Vol. 163, № 3. – P. 469–475. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14597776/> (date accessed: 13.11.2020).
700. Zheng, Y. IGFBP-1 Expression Promotes Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells via Erk Pathway Activation / Y. Zheng, J.Y. Sowers, K.D. Houston. – Text : electronic // Frontiers in Endocrinology. – 2020. – Vol. 11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32435229/> (date accessed: 13.11.2020).
701. Ekyalongo, R.C. Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target / R.C. Ekyalongo, D. Yee. – Text : electronic // npj Precision Oncology. – 2017. – Vol. 1, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29152592/> (date accessed: 19.11.2021).
702. Bach, L.A. 40 years of IGF1: IGF-binding proteins / L.A. Bach. – Text : electronic // Journal of Molecular Endocrinology. – 2018. – Vol. 61, № 1. – P. T11–T28. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255001/> (date accessed: 19.11.2021).
703. Christopoulos, P.F. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer / P.F. Christopoulos, P. Msaouel, M. Koutsilieris. – Text : electronic // Mol. Cancer. – 2015. – Vol. 14. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25743390/> (date accessed: 19.11.2021).
704. Insulin-like growth-factor-binding protein gene expression and protein production by human tumour cell lines / J.G. Reeve, L.B. Kirby, A. Brinkman [et al.] // International Journal of Cancer. – 1992. – Vol. 51, № 5. – P. 818–821.
705. Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells / M. Pacher, M.J. Seewald, M. Mikula [et al.] // Carcinogenesis. – 2007. – Vol. 28, № 1. – P. 49–59.
706. Expression of insulin-like growth factor family genes in clear cell renal cell carcinoma / R. Braczkowski, M. Biaoyt, M. Plato [et al.] // Wspolczesna Onkologia. – 2016. – Vol. 20, № 2. – P. 130–136.
707. 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.
708. IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  levels correlate with disease stage in breast cancer patients / Y. Ma, Y. Ren, Z.J. Dai [et al.]. – Text : electronic // Advances in Clinical and Experimental Medicine. – 2017. – Vol. 26, № 3. – P. 421–426. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791816/> (date accessed: 17.11.2020).
709. The role of interleukins in colorectal cancer / J. Li, L. Huang, H. Zhao [et al.]. – Text : electronic // Int. J. Biol. Sci. – 2020. – Vol. 16, № 13. – P. 2323–2339. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32760201/> (date accessed: 04.10.2022).
710. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance / N. Kumari, B.S. Dwarakanath, A. Das, A.N. Bhatt // Tumor Biology. – 2016. – Vol. 37. – P. 11553–11572.

711. Interleukin-6 induces drug resistance in renal cell carcinoma / K. Ishibashi, T. Koguchi, K. Matsuoka [et al.]. – Text : electronic // NLM (Medline). – 2018. – Vol. 64, № 3. – P. 103–110. – URL: [/pmc/articles/PMC6305783/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781510/) (date accessed: 17.11.2020).
712. Johnson, D.E. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer / D.E. Johnson, R.A. O’Keefe, J.R. Grandis // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 15, № 4. – P. 234–248.
713. IL-6 and IL-8 Are Linked With Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation and Correlate With Poor Clinical Outcomes in Melanoma Patients / R.P. Tobin, K.R. Jordan, P. Kapoor [et al.]. – Text : electronic // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781510/> (date accessed: 17.11.2020).
714. The diagnostic and prognostic value of interleukin-6 in patients with soft tissue sarcomas / T. Hagi, T. Nakamura, T. Iino [et al.]. – Text : electronic // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – URL: [/pmc/articles/PMC5575335/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781510/) (date accessed: 18.11.2020).
715. Interaction between human osteosarcoma and mesenchymal stem cells via an interleukin-8 signaling loop in the tumor microenvironment / M. Kawano, K. Tanaka, I. Itonaga [et al.]. – Text : electronic // *Cell Communication and Signaling.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – URL: [/pmc/articles/PMC5889532/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781510/) (date accessed: 18.11.2020).
716. Melanoma cells secrete follistatin, an antagonist of activin-mediated growth inhibition / C. Stove, F. Vanrobaeys, B. Devreese [et al.]. – Text : electronic // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23, № 31. – P. 5330–5339. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15064726/> (date accessed: 19.11.2020).
717. Clinical and therapeutic implications of follistatin in solid tumours / L. Shi, J. Resaul, S. Owen [et al.] // *International Institute of Anticancer Research.* – 2016. – Vol. 13, № 6. – P. 425–436.
718. Serum Follistatin Is Increased in Thyroid Cancer and Is Associated with Adverse Tumor Characteristics in Humans / G. Panagiotou, W. Ghaly, J. Upadhyay [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2021. – Vol. 106, № 5. – P. E2137–E2150.
719. Profiling Activins and Follistatin in Colorectal Cancer According to Clinical Stage, Tumour Sidedness and Smad4 Status / B. Refaat, J. Zekri, A. Aslam [et al.] // *Pathol. Oncol. Res. Pathol. Oncol. Res.* – 2021. – Vol. 27. – P. 1610032.
720. Association of serum follistatin levels with histological types and progression of tumor in human lung cancer / P. Zhang, Y. Ruan, J. Xiao [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 162.
721. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery / K. Matsumoto, M. Umitsu, D.M. De Silva [et al.] // *Cancer Science.* – 2017. – Vol. 108, № 3. – P. 296–307.
722. Hepatocyte growth factor, a key tumor-promoting factor in the tumor microenvironment / B.Y. Owusu, R. Galemno, J. Janetka, L. Klampfer. – Text : electronic // *MDPI.* – 2017. – Vol. 9. – URL: [/pmc/articles/PMC5406710/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781510/) (date accessed: 23.11.2020).
723. Inhibition of pro-HGF activation by SRI31215, a novel approach to block oncogenic HGF/MET signaling / B.Y. Owusu, N. Bansal, P.K.M. Venukadasula [et al.]. – Text : electronic // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 20. – P. 29492–29506. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27121052/> (date accessed: 23.11.2020).
724. Targeted therapy in melanoma and mechanisms of resistance / A.M. Czarnecka, E. Bartnik, M. Fiedorowicz, P. Rutkowski. – Text : electronic // *MDPI.* – 2020. – Vol. 21. – URL: [/pmc/articles/PMC7369697/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781510/) (date accessed: 23.11.2020).
725. Genomic instability causes HGF gene activation in colon cancer cells, promoting their resistance to necroptosis / D. Seneviratne, J. Ma, X. Tan [et al.]. – Text : electronic // *Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 148, № 1. – P. 181–191.e17. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25244939/> (date ccessed: 23.11.2020).
726. Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer / J. Ma, M. C. DeFrances, C. Zou [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Clinical Investigation.* – 2009. – Vol. 119, № 3. – P. 478–491. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19188684/> (date accessed: 23.11.2020).
727. Hepatocyte growth factor levels in bone marrow plasma of patients with leukaemia and its gene expression in leukaemic blast cells / M. Hino, M. Inaba, H. Goto [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 1996. – Vol. 73, № 1. – P. 119–123.

728. Functional and therapeutic relevance of hepatocyte growth factor/c-MET signaling in synovial sarcoma / Y. Imura, T. Nakai, S. Yamada [et al.]. – Text : electronic // *Cancer Science*. – 2016. – Vol. 107, № 12. – P. 1867–1876. – URL: [/pmc/articles/PMC5198956/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33006711/) (date accessed: 23.11.2020).
729. Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression / L.M. Castello, D. Raineri, L. Salmi [et al.]. – Text : electronic // *Hindawi Limited*. – 2017. – Vol. 2017. – URL: [/pmc/articles/PMC5523273/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33006711/) (date accessed: 23.11.2020).
730. Osteopontin-4 and Osteopontin-5 splice variants are expressed in several tumor cell lines / G.R. Silva, D.S. Mattos, A.C.F. Bastos [et al.]. – Text : electronic // *Mol. Biol. Rep.* – 2020. – Vol. 47, № 10. – P. 8339–8345. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33006711/> (date accessed: 23.11.2020).
731. Osteopontin is differentially expressed in renal cell tumors / M. Woźniak, A. Pawelak, S. Makuch [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Histotechnology*. – 2020. – Vol. 43, № 2. – P. 90–96. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31914887/> (date accessed: 23.11.2020).
732. Osteopontin as a therapeutic target for cancer / M. Bandopadhyay, A. Bulbule, R. Butti [et al.] // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2014. – Vol. 18, № 8. – P. 883–895.
733. Osteopontin as a regulator of colorectal cancer progression and its clinical applications / K. Amilca-Seba, M. Sabbah, A.K. Larsen, J.A. Denis. – Text : electronic // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34359694/> (date accessed: 19.11.2021).
734. Osteopontin: A key regulator of tumor progression and immunomodulation / H.R. Moorman, D. Poschel, J.D. Klement [et al.]. – Text : electronic // *Cancer MDPI AG*. – 2020. – Vol. 12. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33203146/> (date accessed: 23.11.2020).
735. Best serum biomarker combination for ovarian cancer classification / H.J. Song, E.S. Yang, J.D. Kim [et al.]. – Text : electronic // *BioMedical Engineering Online*. – 2018. – Vol. 17, Suppl. 2. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30396341/> (date accessed: 23.11.2020).
736. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications / T. Ishiguro, H. Ohata, A. Sato [et al.]. – Text : electronic // *Blackwell Publishing Ltd*. – 2017. – Vol. 108. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28064442/> (date accessed: 27.11.2020).
737. Development of organoid-based drug metabolism model / E. Park, H.K. Kim, J.H. Jee [et al.]. – Text : electronic // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2019. – Vol. 385. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31678242/> (date accessed: 01.10.2021).
738. Nazari, S.S. Generation of 3D Tumor Spheroids with Encapsulating Basement Membranes for Invasion Studies / S.S. Nazari. – Text : electronic // *Current Protocols in Cell Biology*. – 2020. – Vol. 87, № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32436628/> (date accessed: 23.07.2020).
739. Knockout of MMP3 weakens solid tumor organoids and cancer extracellular vesicles / E.A. Taha, C. Sogawa, Y. Okusha [et al.]. – Text : electronic // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 5. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32429403/> (date accessed: 02.12.2020).
740. Jensen, C. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? / C. Jensen, Y. Teng. – Text : electronic // *Frontiers Media S.A.* – 2020. – Vol. 7. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32211418/> (date accessed: 02.12.2020).
741. Baker, B.M. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues / B.M. Baker, C.S. Chen // *J. Cell. Sci.* – 2012. – Vol. 125, № 13. – P. 3015–3024.
742. Tatullo, M. Organoids in Translational Oncology / M. Tatullo, B. Marrelli, C. Benincasa [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9, № 9. – P. 2774.
743. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models / E.C. Costa, V.M. Gaspar, P. Coutinho, I.J. Correia. – Text : electronic // *Biotechnol. Bioeng.* – 2014. – Vol. 111, № 8. – P. 1672–1685. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615162/> (date accessed: 02.12.2020)..
744. Quail, D.F. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis / D.F. Quail, J.A. Joyce // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 1423–1437.

745. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis / S.Y. Lim, A.E. Yuzhalin, A.N. Gordon-Weeks, R.J. Muschel. – Text : electronic // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 19. – P. 28697–28710. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26885690/> (date accessed: 02.12.2020).
746. Ntanasis-Stathopoulos, I. CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment / I. Ntanasis-Stathopoulos, D. Fotiou, E. Terpos // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 1231. – P. 13–21.
747. Li, B.H. Chemokines and their receptors promoting the recruitment of myeloid-derived suppressor cells into the tumor / B.H. Li, M.A. Garstka, Z.F. Li // *Molecular Immunology*. – 2020. – Vol. 117. – P. 201–215.
748. Loss of SMAD4 promotes lung metastasis of colorectal cancer by accumulation of CCR1+ tumor-associated neutrophils through CCL15-CCR1 axis / T. Yamamoto, K. Kawada, Y. Itatani [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23, № 3. – P. 833–844. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27492974/> (date accessed: 03.12.2020).
749. International union of pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors / F. Bachelier, A. Ben-Baruch, A.M. Burkhardt [et al.] // *Pharmacol Rev.* – 2014. – Vol. 66, № 1. – P. 1–79.
750. Three-dimensional tumor model mimics stromal – breast cancer cells signaling / S.L. Ham, P.S. Thakuri, M. Plaster [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 249–267.
751. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer / A. Schmall, H.M. Al-Tamari, S. Herold [et al.]. – Text : electronic // *American Journal of Respiratory and Critical Care Med.* – 2015. – Vol. 191, № 4. – P. 437–447. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25536148/> (date accessed: 02.12.2020).
752. Expression of chemokine XCL2 and CX3CL1 in lung cancer / B. Zhou, H. Xu, K. Ni [et al.]. – Text : electronic // *Medical Science Monitor*. – 2016. – Vol. 22. – P. 1560–1565. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156946/> (date accessed: 02.12.2020).
753. Chemokine-chemokine receptor axes in melanoma brain metastasis / S. Izraely, A. Klein, O. Sagi-Assif [et al.] // *Immunology Letters*. – 2010. – Vol. 130, № 1–2. – P. 107–114.
754. CXCL11 promotes tumor progression by the biased use of the chemokine receptors CXCR3 and CXCR7 / M. Puchert, J. Obst, C. Koch [et al.]. – Text : electronic // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 125. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31437604/> (date accessed: 03.12.2020).
755. Balogh, K.N. Macrophage migration inhibitory factor protects cancer cells from immunogenic cell death and impairs anti-tumor immune responses / K.N. Balogh, D.J. Templeton, J.V. Cross. – Text : electronic // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13, № 6. – URL: [/pmc/articles/PMC5986154/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3005986154/?report=abstract) (date accessed: 03.12.2020).
756. Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts / M. Tarnowski, K. Grymula, R. Liu [et al.]. – Text : electronic // *Molecular Cancer Research*. – 2010. – Vol. 8, № 10. – P. 1328–1343. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20861157/> (date accessed: 02.12.2020).
757. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment / L. Bu, H. Baba, N. Yoshida [et al.] // *Oncogene*. – 2019. – Vol. 38, № 25. – P. 4887–4901.
758. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance / M.E. Fiori, S. Di Franco, L. Villanova [et al.]. – Text : electronic // *BioMed Central Ltd.* – 2019. – Vol. 18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927908/> (date accessed: 03.12.2020).
759. Denton, A.E. Stromal cells in the tumor microenvironment / A.E. Denton, E.W. Roberts, D.T. Fearon. – Text : electronic // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2018. – Vol. 1060. – P. 99–114. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30155624/> (date accessed: 19.07.2021).
760. Sonnemann, K.J. Wound repair: Toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses / K.J. Sonnemann, W.M. Bement. – Text : electronic // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 27. – P. 237–263. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21721944/> (date accessed: 30.07.2020).

761. Friedl, P. Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration / P. Friedl // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 16, № 1. – P. 14–23.
762. Nikolaou S. The stressful tumour environment drives plasticity of cell migration programmes, contributing to metastasis / S. Nikolaou, L.M. Machesky // *J. Pathol.* – 2020. – Vol. 250, № 5. – P. 612–623.
763. *Systems Biology of Cancer Metastasis* / Y. Suhail, M.P. Cain, K. Vanaja [et al.] // *Cell Systems.* – 2019. – Vol. 9, № 2. – P. 109–127.
764. Yilmaz, M. Mechanisms of motility in metastasizing cells / M. Yilmaz, G. Christofori // *Molecular Cancer Research.* – 2010. – Vol. 8, № 5. – P. 629–642.
765. *The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis* / M. Ehnman, W. Chaabane, F. Haglund, P. Tsagkozis // *Curr. Oncol. Rep.* – 2019. – Vol. 21, № 10. – P. 90.
766. Mierke, C.T. The matrix environmental and cell mechanical properties regulate cell migration and contribute to the invasive phenotype of cancer cells / C.T. Mierke // *Reports on Progress in Physics.* – 2019. – Vol. 82, № 6. – P. 064602.
767. Murakami, T. Chemokine receptors and melanoma metastasis / T. Murakami, A.R. Cardones, S.T. Hwang // *J. Dermatol. Sci.* – 2004. – Vol. 36, № 2. – P. 71–78.
768. Overexpression of the chemokine receptors CXCR4, CCR7, CCR9, and CCR10 in human primary cutaneous melanoma: A potential prognostic value for CCR7 and CCR10? / L. Kühnelt-Leddihn, H. Müller, K. Eisendle [et al.] // *Arch. Dermatol. Res.* – 2012. – Vol. 304, № 3. – P. 185–193.
769. Involvement of TIMP-1 in PECAM-1-mediated tumor dissemination / V. Abraham, G. Cao, A. Parambath [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2018. – Vol. 53, № 2. – P. 488–502.
770. Иммуносупрессивный потенциал периферических регуляторных Т-лимфоцитов в процессе опухолевой прогрессии у больных метастатическими саркомами мягких тканей / Н.П. Пипиа, И.А. Балдуева, А.Б. Данилова [и др.] // *Вопросы онкологии.* – 2018. – Т. 64 (3). – С. 400–407.
771. CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL-10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury / J. Giri, R. Das, E. Nylen [et al.] // *Cell Reports.* – 2020. – Vol. 30, № 6. – P. 1923–1934.e4.
772. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature / K.S. Hoek, N.C. Schlegel, P. Brafford [et al.] // *Pigment Cell Research.* – 2006. – Vol. 19, № 4. – P. 290–302.
773. Placental Growth Factor Promotes Ovarian Cancer Cell Invasion via ZEB2 / N. Song, H. Liu, X. Ma, S. Zhang // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2016. – Vol. 38, № 1. – P. 351–358.
774. Discovery of HB-EGF binding peptides and their functional characterization in ovarian cancer cell lines / Y. Shen, L. Ruan, C. Lian [et al.] // *Cell Death Discovery.* – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 82.
775. Yagi, H. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes transcoelomic metastasis in ovarian cancer through epithelial-mesenchymal transition / H. Yagi, F. Yotsumoto, S. Miyamoto // *Molecular Cancer Therapeutics.* – 2008. – Vol. 7, № 10. – P. 3441–3451.
776. Follistatin is a metastasis suppressor in a mouse model of HER2-positive breast cancer / D.D. Seachrist, S.T. Sizemore, E. Johnson [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 66.
777. Targeting FSTL1 prevents tumor bone metastasis and consequent immune dysfunction / C. Kudo-Saito, T. Fuwa, K. Murakami, Y. Kawakami // *Cancer Research.* – 2013. – Vol. 73, № 20. – P. 6185–6193.
778. Follistatin as potential therapeutic target in prostate cancer / M.V. Sepporta, F.M. Tumminello, C. Flandina [et al.] // *Target. Oncol.* – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. 215–223.
779. Increased expression of follistatin in breast cancer reduces invasiveness and clinically correlates with better survival / C. Zabkiewicz, J. Resaul, R. Hargest [et al.] // *Cancer Genomics and Proteomics.* – 2017. – Vol. 14, № 4. – P. 241–251.
780. Erythropoietin, Stem Cell Factor, and Cancer Cell Migration / M.J. Vazquez-Mellado, L. Rocha-Zavaleta, V. Monjaras-Embriz, L. Rocha-Zavaleta // *Vitamins and Hormones.* – 2017. – Vol. 105. – P. 273–296.

781. Stem cell factor/c-kit signaling enhances invasion of pancreatic cancer cells via HIF-1 $\alpha$  under normoxic condition / M. Zhang, Q. Ma, H. Hu [et al.] // *Cancer Letters*. – 2011. – Vol. 303, № 2. – P. 108–117.
782. Oct4 promoted proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colon cancer cells by activating the SCF/c-Kit signaling pathway / X. Bu, Y. Liu, L. Wang [et al.] // *Cell Cycle*. – 2022. – Vol. oct 18. – P. 1–12.
783. SCF, regulated by HIF-1 $\alpha$ , promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell progression / C. Gao, S. Li, T. Zhao [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. e0121338.
784. MAGE-A1 promotes melanoma proliferation and migration through C-JUN activation / D. Wang, J. Wang, N. Ding [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 473. – P. 959–965.
785. Downstream and intermediate interactions of synovial sarcoma-associated fusion oncoproteins and their implication for targeted therapy / J. Przybyl, M. Jurkowska, P. Rutkowski [et al.] // *Sarcoma*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 249219.
786. PASD1 promotes STAT3 activity and tumor growth by inhibiting TC45-mediated dephosphorylation of STAT3 in the nucleus / Z.S. Xu, H.X. Zhang, Y.L. Zhang [et al.] // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 221–231.
787. Verneau, J. Dendritic cells in the tumor microenvironment: prognostic and theranostic impact / J. Verneau, C. Sautés-Fridman, C.M. Sun // *Semin. Immunol.* – 2020. – Vol. 48. – P. 101410.
788. Dendritic cells in the cancer microenvironment / Y. Ma, G. V. Shurin, Z. Peiyuan, M. R. Shurin // *J. Cancer*. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 36–44.
789. Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy / T.A. Patente, M.P. Pinho, A.A. Oliveira [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10, № 9. – P. 3176.
790. Melanoma-derived factors alter the maturation and activation of differentiated tissue-resident dendritic cells / K.M. Hargadon, J.D. Bishop, J.P. Brandt [et al.] // *Immunology and Cell Biology*. – 2016. – Vol. 94, № 1. – P. 24–38.
791. Tang, M. Molecular mechanisms involved in dendritic cell dysfunction in cancer / M. Tang, J. Diao, M.S. Cattral // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2017. – Vol. 74, № 5. – P. 761–776.
792. Veglia, F. Dendritic cells in cancer: the role revisited / F. Veglia, D.I. Gabrilovich // *Current Opinion in Immunology*. – 2017. – Vol. 45, P. 43–51.
793. Dendritic Cells Revisited / M. Cabeza-Cabrerizo, A. Cardoso, C.M. Minutti [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* – 2021. – Vol. 39. – P. 131–166.
794. Inactivation of tumor-specific CD8+CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells / H. Harimoto, M. Shimizu, Y. Nakagawa [et al.] // *Immunology and Cell Biology*. – 2013. – Vol. 91, № 9. – P. 545–555.
795. Larsen, S.K. Cellular immune responses towards regulatory cells / S.K. Larsen // *Danish Medical Journal*. – 2016. – Vol. 63, № 1. – P. 1–21.
796. Tumor-Infiltrating Programmed Death Receptor-1 + Dendritic Cells Mediate Immune Suppression in Ovarian Cancer / J. Krempsi, L. Karyampudi, M.D. Behrens [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, № 12. – P. 6905–6913.
797. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer / A.J. Michielsen, A.E. Hogan, J. Marry [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, № 11. – P. e27944.
798. Biorheological changes of dendritic cells at the different differentiation stages / X. Wang, D. Chen, X. Zhang [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcir.* – 2010. – Vol. 46, № 4. – P. 265–273.
799. Biophysical studies on the differentiation of human CD14+ monocytes into dendritic cells / Z. Zeng, X. Liu, Y. Jiang [et al.] // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – Vol. 45, № 1. – P. 19–30.
800. Tumor stroma-derived factors skew monocyte to dendritic cell differentiation toward a suppressive CD14 + PD-L1 + phenotype in prostate cancer / L.K. Spary, J. Salimu, J.P. Webber [et al.] // *OncoImmunology*. – 2014. – Vol. 3, № 9. – P. e955331.
801. Regulation of cell migration via the EGFR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cells / Y. Ohnishi, H. Yasui, K. Kakudo, M. Nozaki // *Oncol. Letters*. – 2017. – Vol. 13. – P. 930–936.

802. Интравасация опухолевых клеток – важнейшее звено метастазирования (обзор) / М.В. Завьялова, Е.В. Денисов, Л.А. Таширева [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84, № 7. – С. 972–984.
803. Hübel, J. HGF/Met-signaling contributes to immune regulation by modulating tolerogenic and motogenic properties of dendritic cells / J. Hübel, T. Hieronymus. – Text : electronic // MDPI. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 138–148. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28536404/> (date accessed: 31.07.2020).
804. 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.
805. Prendergast, G.C. Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition. Cancer Immunother. Immune Suppr. Tumor Growth Second Ed. / G.C. Prendergast, E.M. Jaffee. – Text : electronic. – Elsevier Inc., 2013. – 1–655 p. – URL: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/cancer-immunotherapy-immune-suppression-and-tumor-growth-second-e-5> (date accessed: 31.07.2020).
806. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state / I.J.M. De Vries, D.J.E.B. Krooshoop, N.M. Scharenborg [et al.] // Cancer Research. – 2003. – Vol. 63, № 1. – P. 12–17.
807. The Therapeutic Potential of Tackling Tumor-Induced Dendritic Cell Dysfunction in Colorectal Cancer / B. Subtil, A. Cambi, D.V.F. Tauriello, I.J.M. de Vries // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – P. 724883.
808. A correlative and quantitative imaging approach enabling characterization of primary cell-cell communication: Case of human CD4+ T cell-macrophage immunological synapses / R. Kaspruwicz, E. Rand, P.J. O'Toole, N. Signoret // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 8003.
809. Dustin, M.L. The immunological synapse / M.L. Dustin // Cancer Immunol. Res. – 2014. – Vol. 2, № 11. – P. 1023–1033.
810. Modulation of tumor immunity by soluble and membrane-bound molecules at the immunological synapse / P.A. González, L.J. Carreño, P.F. Céspedes [et al.]. – Text : electronic // Hindawi Limited. – 2013. – Vol. 2013. – URL: [/pmc/articles/PMC3606757/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811111/) (date accessed: 15.12.2020).
811. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling / M.T. Epping, L. Wang, M.J. Edel [et al.] // Cell. – 2005. – Vol. 122, № 6. – P. 835–847.
812. Gradecki, S.E. PRAME expression in 155 cases of metastatic melanoma / S.E. Gradecki, C.L. Slingluff, A.A. Gru // J. Cutan. Pathol. – 2021. – Vol. 48, № 4. – P. 479–485.
813. Cytolytic T-cell response to the PASD1 cancer testis antigen in patients with diffuse large B-cell lymphoma / K. Ait-Tahar, A.P. Liggins, G.P. Collins [et al.] // Br. J. Haematol. – 2009. – Vol. 146, № 4. – P. 396–407.
814. The landscape of tumor-specific antigens in colorectal cancer / N.A.A.R. Bakarurraini, N.S.A. Mutalib, R. Jamal, N. Abu // Vaccines. MDPI AG. – 2020. – Vol. 8, № 3. – P. 1–17.
815. Cytolytic Activity of Effector T-lymphocytes Against Hepatocellular Carcinoma is Improved by Dendritic Cells Pulsed with Pooled Tumor Antigens / T. Chieochansin, C. Thepmalee, J. Grainok [et al.] // Sci. Rep. Nature Research. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 17668.
816. Enhanced cytotoxic activity of effector T-cells against cholangiocarcinoma by dendritic cells pulsed with pooled mRNA / M. Junking, J. Grainok, C. Thepmalee [et al.] // Tumor Biology. – 2017. – Vol. 39, № 10. – P. 1–13.
817. Distinct patterns of cytolytic T-cell activation by different tumour cells revealed by Ca<sup>2+</sup> signalling and granule mobilization / M. Frick, P. Mouchacca, G. Verdeil [et al.] // Immunology. – 2017. – Vol. 150, № 2. – P. 199–212.
818. Comrie, W.A. F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse / W.A. Comrie, A. Babich, J.K. Burkhardt // Journal of Cell Biology. – 2015. – Vol. 208, № 4. – P. 475–491.

819. Actin Cytoskeleton Straddling the Immunological Synapse between Cytotoxic Lymphocytes and Cancer Cells / H. Wurzer, C. Hoffmann, A. Al Absi, C. Thomas // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 5. – P. 463.
820. Long-Term Survival after Complete Surgical Resection and Adjuvant Immunotherapy for Distant Melanoma Metastases / M.B. Faries, N. Mozzillo, M. Kashani-Sabet [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2017. – Vol. 24, № 13. – P. 3991–4000.
821. MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy for patients with resected, MAGE-A3-positive, stage III melanoma (DERMA): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / B. Dreno, J.F. Thompson, B.M. Smithers [et al.] // *The Lancet Oncology*. – 2018. – Vol. 19, № 7. – P. 916–929.
822. Dendritic cells as cancer therapeutics / C.E. Bryant, S. Sutherland, B. Kong [et al.] // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 86. – P. 77–88.
823. Follow-up analysis of a randomized phase III immunotherapeutic clinical trial on melanoma / R. Suriano, S. Rajoria, A.L. George [et al.] // *Mol. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 1, № 3. – P. 466–472.
824. Hdeib, A. Dendritic cell immunotherapy for solid tumors: evaluation of the DCVax® platform in the treatment of glioblastoma multiforme / A. Hdeib, A.E. Sloan // *CNS Oncology*. – 2015. – Vol. 4, № 2. – P. 63–69.
825. Dillman, R.O. An update on the relevance of vaccine research for the treatment of metastatic melanoma / R.O. Dillman // *Melanoma Management*. – 2017. – Vol. 4, № 4. – P. 203–215.
826. Тридцатилетний опыт лекарственного лечения меланомы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова: важные уроки для будущих исследований / А.В. Новик, С.А. Проценко, Е.М. Анохина [и др.] // *Эффективная фармакотерапия*. – 2020. – Т. 16, № 18. – С. 20–29.
827. Real-world data on PD-1 inhibitor therapy in metastatic melanoma / A. Arheden, J. Skalenius, S. Bjursten [et al.] // *Acta Oncologica*. – 2019. – Vol. 58, № 7. – P. 962–966.
828. Adjuvant anti-PD-1 antibody treatment in stage III/IV melanoma: real-world experience and health economic considerations / P. Koelblinger, M. Hoellwerth, M.T. Dermoscheg [et al.] // *JDDG*. – 2021. – Vol. 19, № 8. – P. 1186–1198.
829. Chen, D.S. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point / D.S. Chen, I. Mellman // *Nature*. – 2017. – Vol. 541, № 7637. – P. 321–330.
830. Оценка динамики иммунологических показателей в начале терапии в качестве прогностических и предиктивных факторов у больных меланомой / А.В. Новик, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева [и др.] // *Фарматека*. – 2021. – Т. 28, № 7. – С. 118–126.
831. Прогностическое и предиктивное значение Т-клеток памяти в периферической крови у больных неоперабельной или метастатической меланомой / А.В. Новик, И.В. Кудрявцев, Т.Л. Нехаева [и др.] // *Эффективная фармакотерапия*. – 2021. – Т. 17, № 11. – С. 10–14.
832. Pinto, C. In Vitro and Ex Vivo Models – The Tumor Microenvironment in a Flask / C. Pinto, M.F. Estrada, C. Brito // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 1219. – P. 431–443.

## БЛАГОДАРНОСТИ

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

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

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