









DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-452-465

EDN GTLLVX

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Молекулярно-биологические и иммуногистохимические особенности недифференцированных плеоморфных сарком


А.М. Косырева^{1,2} , Э.Д. Джуманиязова¹  ,
Д.Ш. Джалилова^{1,2} , А.В. Сентябрева^{1,2} ,
Е.А. Мирошниченко^{1,2} , Т.И. Фетисов³ , А.В. Лохонина^{1,4} 

¹Научно-исследовательский Институт молекулярной и клеточной медицины Российского университета дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

²Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, г. Москва, Российская Федерация

⁴Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, г. Москва, Российская Федерация

 enar2017@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* Недифференцированная плеоморфная саркома (НПС) является одним из наиболее распространенных подтипов сарком мягких тканей. Полиморфизм опухолевых клеток и высокая степень злокачественности обуславливают агрессивный потенциал НПС. В связи с редкостью встречаемости и высокой гетерогенностью НПС количество исследований, описывающих клеточный состав и молекулярно-биологические характеристики, весьма ограничено. *Цель работы* — оценка клеточного состава и экспрессии генов НПС. *Материалы и методы.* В исследовании проанализировали биоматериал от 10 пациентов с НПС. В исследовании использовали первичные антитела к CD163 (маркер M2 макрофагов) и Fibroblast activation protein (FAP — маркер фибробластов) и вторичные Caprine-Anti-Rabbit IgG HRP. HRP-метки вторичных антител проявляли с помощью ДАВ. Для оценки микроокружения использовали антитела для автоматизированного ИГХ стейнера BOND-III: CD68-маркер макрофагов, CD19-маркер В-лимфоцитов, CD56-маркер нейроэндокринных опухолей, белок мета-

© Косырева А.М., Джуманиязова Э.Д., Джалилова Д.Ш., Сентябрева А.В., Мирошниченко Е.А., Фетисов Т.И., Лохонина А.В., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

стазирования, Ki67 антигену-маркер пролиферации, Bcl-2-онкопротеину. Окрашивание на автоматизированном ИГХ стейнере BOND-III проводили по стандартным протоколам. В гомогенизированных образцах опухолевой ткани и перитуморальной области с количеством клеток 10^6 /мл с целью оценки микроокружения опухоли и окружающей ткани проводили цитофлуориметрическое исследование относительного количества CD14+ и CD16+ моноцитов, CD68+ макрофагов, CD86+ M1 макрофагов, CD163+ и CD206+ M2 макрофагов, CD4+ Т-лимфоцитов хелперов и CD45+ лейкоцитов на приборе MACSQuant Analyzer. Методом ПЦР в образцах опухолевой ткани и перитуморальной области определяли уровни экспрессии мРНК *HIF1A*, *VEGF*, *MMP2*, *ARG1*, *NOS2*, и *EGFR*. Для выделения РНК использовали набор RNA Solo, а для обратной транскрипции — MMLV RT Kit. Реакцию амплификации с детектированием в режиме реального времени проводили на Real-Time амплификаторе DTrime. *Результаты и обсуждение.* Для НПС характерна экспрессия CD56, FAP, CD68. Среди клеток микроокружения в НПС преобладают макрофаги и CD16-моноциты. В опухолевых клетках НПС увеличен уровень экспрессии *EGFR* по сравнению с перитуморальной областью. Уровни экспрессии *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* в опухолях имеют индивидуальные различия и не являются специфическими для НПС. *Выводы.* В ходе исследования были проанализированы клеточный состав и экспрессия генов в образцах НПС. Для оценки клинической значимости каждого из маркеров необходимо дальнейшее наблюдение за пациентами.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей, недифференцированные плеоморфные саркомы, микроокружение опухоли, клеточный состав, экспрессия генов

Информация о финансировании. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-65-00003). Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1356 от 7.10.2021 (идентификатор РФ 0951.61321X0012, № 15.СИН.21.0011).

Вклад авторов. А.М. Косырева — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание первого варианта рукописи; Э.Д. Джуманиязова — анализ полученных данных, написание окончательного варианта текста рукописи; А.В. Лохонина — концепция и дизайн исследования, проверка интеллектуального содержимого рукописи; Д.Ш. Джалилова, А.В. Сентябрева, Е.А. Мирошниченко — проведение эксперимента; Т.И. Фетисов — сбор клинического биоматериала. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось в соответствии с решением Этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва.






Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных.

Поступила 06.08.2024. Принята 03.09.2024.

Для цитирования: Косырева А.М., Джуманиязова Э.Д., Джалилова Д.Ш., Сентябрева А.В., Мирошниченко Е.А., Фетисов Т.И., Лохонина А.В. Молекулярно-биологические и иммуногистохимические особенности недифференцированных плеоморфных сарком // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 452–465. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-452-465. EDN: GTLLVX


Molecular-biologic and immunohistochemical features of undifferentiated pleomorphic sarcomas

Anna M. Kosyreva^{1,2} , Enar D. Jumaniyazova¹  ,
Dzhuliia Sh. Dzhaliilova^{1,2} , Alexandra V. Sentyabreva^{1,2} ,
Ekaterina A. Miroshnichenko^{1,2} , Timur I. Fetisov³ , Anastasia V. Lokhonina^{1,4} 

¹ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University, Moscow, Russian Federation

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

³ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

⁴ National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, Russian Federation
 enar2017@yandex.ru

Abstract. Relevance. Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) is one of the most common subtypes of soft tissue sarcomas. The polymorphism of tumor cells and high degree of malignancy account for the aggressive potential of UPS. Due to the rarity of occurrence and high heterogeneity of UPS, the number of studies describing the cellular composition and molecular-biological characteristics is very limited. Objective is to assess the cellular composition and gene expression of UPS. **Materials and Methods.** Biomaterial from 10 patients with UPS was analyzed in the study. In this study we used primary antibodies to CD163 (marker of M2 macrophages) and Fibroblast activation protein (FAP — marker of fibroblasts) and secondary Caprine-Anti-Rabbit IgG HRP were used. HRP-tagged secondary antibodies were manifested using DAB. Antibodies for automated BOND-III IHC stainer were used to evaluate the microenvironment: CD68—marker of macrophages, CD19—marker of B-lymphocytes, CD56—marker of neuroendocrine tumors, metastasis protein, Ki67 antigen-proliferation marker, Bcl-2—oncprotein. Staining on an automated BOND-III IHC stainer was performed according to standard protocols. In homogenized samples of tumor tissue and peritumoral area with the number of cells 10⁶/ml in order to assess the microenvironment of the tumor and surrounding tissue, cytofluorimetric study of the relative number of CD14+ and CD16+ monocytes, CD68+ macrophages, CD86+ M1 macrophages, CD163+ and CD206+ M2 macrophages, CD4+ helper T-lymphocytes and CD45+ leukocytes was performed on the MACS Quant Analyzer device. The mRNA expression levels of *HIF1A*, *VEGF*, *MMP2*, *ARG1*, *NOS2*, and *EGFR* were determined in tumor tissue and peritumoral samples by PCR. The RNA Solo RNA kit was used for RNA isolation, and the MMLV RT Kit was used for reverse transcription. The amplification reaction with real-time detection was performed on a DTprime Real-Time Amplifier. **Results and Discussion.** The expression of CD56, FAP, CD68 is characteristic for UPS. Among the cells of the microenvironment, macrophages and CD16-monocytes predominate in UPS. *EGFR* expression level is increased in tumor cells of the UPS compared to the peritumoral region. The expression levels of *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF*, and *MMP2* in tumors have individual differences and are not specific to the UPS. **Conclusion.** In our study, we analyzed the cellular composition and gene expression in UPS samples. Further follow-up of patients is necessary to evaluate the clinical significance of each marker.

Keywords: soft tissue sarcomas, undifferentiated pleomorphic sarcomas, tumor microenvironment, cellular composition, gene expression

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-65-00003). This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1356 dated 7.10.2021 (RF identifier 0951.61321X0012, No. 15.SIN.21.0011))

Author contributions. A.M. Kosyreva — conception and design of the study, analyzing the data obtained, writing the first draft of the manuscript; E.D. Jumaniyazova — analyzing the obtained data, writing the final manuscript text; A.V. Lokhonina — conception and design of the study, verification of the intellectual content of the manuscript; D. Sh. Dzhaliilova, A.V. Sentyabreva, E.A. Miroshnichenko-

conducting an experiment; T.I. Fetisov- clinical biomaterial collection. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. Authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted in accordance with the decision of the Ethical committee of the N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow.

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication. All patients provided voluntary informed consent to participate in the study in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), the processing of personal data and consent to publication.

Received 06.08.2024. Accepted 03.09.2024.

For citation: Kosyreva AM, Jumaniyazova ED, Dzhililova DSh, Sentyabreva AV, Miroshnichenko EA, Fetisov TI, Lokhonina AV. Molecular-biologic and immunohistochemical features of undifferentiated pleomorphic sarcomas. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):452–465. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-452-465. EDN: GTLLVX

Введение

Саркомы мягких тканей (СМТ) представляют гетерогенную группу злокачественных новообразований (ЗНО), первично возникающих в мягких тканях и имеющих мезенхимальное происхождение. Среди всех диагностированных случаев ЗНО на СМТ приходится не более 1 % [1] [Siegel и др., 2023].

Классификация ВОЗ 2020 года признает более 70 гистологических и молекулярных подтипов СМТ, для каждого из которых характерны особенности клинического течения и прогноза. Недифференцированная плеоморфная саркома (НПС), которую когда-то называли злокачественной фиброзной гистиоцитомой, является одним из наиболее распространенных подтипов СМТ [2, 3]. Полиморфизм опухолевых клеток и высокая степень злокачественности обуславливают агрессивный потенциал НПС [4]. Как правило, пациентам с НПС на первом этапе лечения предлагается хирургическая резекция, при необходимости с последующей химио- и лучевой терапией. Для пациентов, у которых хирургическое вмешательство невозможно, рекомендуется назначение лучевой терапии или химиотерапии. Однако эффективность противоопухолевого лечения остается неудовлетворительной, а 5-летняя выживаемость составляет 30—50 % [5].

В связи с редкостью встречаемости и высокой гетерогенностью НПС количество исследований, описывающих клеточный состав и молекулярно-биологические характеристики данного подтипа СМТ, весьма ограничено.

Цель исследования: оценка клеточного состава и экспрессии генов НПС.

Материалы и методы

Пациенты

Биопсийный материал опухолевой и перитуморальной ткани (расположенной на расстоянии 1 см от границы опухоли) пациентов получали из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследовании проанализировали биоматериал от 10 пациентов, полученный в ходе хирургического этапа лечения, информация о пациентах представлена в Таблице 1. У всех пациентов была диагностирована и гистологически верифицирована недифференцированная плеоморфная саркома мягких тканей. Данное исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, всеми пациентами было подписано письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Таблица 1/ Table 1

**Общая характеристика пациентов/
General characteristics of patients**

Параметры / Parameters	Пациенты, n (%) / Patients, n (%)
Общее количество / Total number	10 (100 %)
Пол / Gender	
Мужчины / Men Женщины / Women	7 (70 %) 3 (30 %)
Возраст (годы) / Age (years)	
Медиана / Median Диапазон / Range	64 59–82
Т стадия / T stage	
1 2 3 4	1 (10 %) 8 (80 %) 0 (0 %) 1 (10 %)
Н стадия / N stage	
0 1	10 (100 %) 0 (0 %)
М стадия / M stage	
0 1	8 (80 %) 2 (20 %)
Локализация / Localization	
Верхняя конечность / Upper extremity Нижняя конечность / Lower extremity	5 (50 %) 5 (50 %)
Эпизод заболевания / Disease episode	
Впервые выявленная опухоль / Tumor detected for the first time Рецидив / Recurrence	4 (40 %) 6 (60 %)

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

Фрагменты опухоли фиксировали в 10 % забуференном формалине, проводили по спиртам возрастающей концентрации, заливали в гистомикс, изготавливали гистологические срезы, монтировали их на стекла для иммуногистохимического исследования Super-Frost. Гистологические срезы депарафинизировали по стандартному протоколу и демаскировали в цитратном буфере pH 6,0 с 0,5 % Твин-20 при 100 °С. После промывки в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,2) блоки-

ровали эндогенную пероксидазу 3 % раствором H₂O₂, затем блокировали белковым буфером (PBS с 0,1 % бычьим сывороточным альбумином) при комнатной температуре в течение 30 минут для минимизации неспецифического связывания антител. Использовали первичные антитела к CD163 (ab182422) (маркер M2 макрофагов) и Fibroblast activation protein (FAP — маркер фибробластов) (ab28246) и вторичные Caprine-Anti-Rabbit IgG HRP (SAA544Rb19, CloudClone). HRP-метки вторичных антител проявляли с помощью DAB.

Для оценки микроокружения использовали антитела для автоматизированного ИГХ стейнера BOND-III:

- CD68 (514H12) общий панмакрофагальный маркер;
- CD19 (BT51E) маркер В-лимфоцитов;
- CD56 (CD564) маркер нейроэндокринных опухолей, белок метастазирования;
- Ki67 антигену (MM1) маркер пролиферации;
- Vcl-2 онкопротеину.

Окрашивание на автоматизированном ИГХ стейнере BOND-III проводили по стандартным протоколам.

Проточная цитофлуориметрия

В гомогенизированных образцах опухолевой ткани и перитуморальной области с количеством клеток 10⁶/мл с целью оценки микроокружения опухоли и окружающей ткани проводили цитофлуориметрическое исследование относительного количества CD14+ и CD16+ моноцитов, CD68+ макрофагов, CD86+ M1 макрофагов, CD163+ и CD206+ M2 макрофагов, CD4+ Т-лимфоцитов хелперов и CD45+ лейкоцитов на приборе MACSQuant® Analyzer («Miltenyi Biotec», Германия) с использованием следующих антител («Miltenyi Biotec», Германия): anti-Human CD4-FITC; anti-Human CD163-APC; anti-Human CD16-PE; anti-Human CD68-PE-Vio-770; anti-Human CD45-VioBlue; anti-Human CD14-FITC; anti-Human CD86-PE; anti-Human CD206-PerCPVio700. Гейтирование выполняли с использованием анти-CD14 и анти-CD45 моноклональных антител.

ПЦР-РВ

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в образцах опухолевой ткани и перитуморальной области определяли уровни экспрессии мРНК генов *HIF1A*, *VEGF*, *MMP2*, *ARG1*, *NOS2* и *EGFR*. Для выделения РНК использовали набор RNA Solo, а для обратной транскрипции — MMLV RT Kit («Евроген», Россия). Реакцию амплификации с детектированием в режиме реального времени проводили на Real-Time амплификаторе

DTprime («ДНК-Технология», Россия). Относительную концентрацию мРНК указанных генов рассчитывали методом прямого сравнения данных по формуле: $[A]_0/[B]_0 = E^{\Delta C(T)}$, где $[A]_0$ — начальная концентрация мРНК гена в ПЦР-смеси, $[B]_0$ — начальная концентрация мРНК *GAPDH* в ПЦР-смеси, E — эффективность реакции (принимали равной 1,98), $\Delta C(T)$ — разность пороговых циклов *GAPDH* и искомого гена.

Таблица 2/ Table 2

Последовательности используемых праймеров/Sequences of used primers

Ген Gene	Последовательность Sequence	
GAPDH	Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	Reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGGGA
ARG1	Forward	TCATCTGGGTGGATGCTCACAC
	Reverse	GAGAATCCTGGCACATCGGGAA
HIF1-A	Forward	GCCCATTCCGCGTCTGAGT
	Reverse	ACTTGTGGGTGCTGGCACTG
MMP2	Forward	CGCTACGATGGAGGCGCTAA
	Reverse	GGGGCAGCCATAGAAGGTGT
NOS2	Forward	GCTCTACACCTCCAATGTGACC
	Reverse	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG
EGFR	Forward	CCCCCTGACTCCGTCCAGTA
	Reverse	CCCAACTGCGTGAGCTTGT
VEGF	Forward	GGGCAGAATCATCACGAAGT
	Reverse	GGTGAGGTTTGATCCGCATA

Статистические методы

Статистический анализ полученных данных проводили в программе «Statistica 8.0». Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха Ме (LQ(25 %); UQ(75 %)). Для установления достоверности различий между показателями, в зависимости от характера распределения полученных данных, использовали критерии множественного

сравнения Краскела — Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С помощью ИГХ исследования была оценена экспрессия белков, отвечающих за пролиферацию (Ki-67), апоптоз (Bcl2), маркеров макрофагов (CD68, CD163), В-лимфоцитов (CD19), белка клеточной адгезии (CD56), маркера фибробластов (FAP).

Таблица 3/ Table 3

ИГХ исследование уровня экспрессии белков, отвечающих за пролиферацию (Ki-67), апоптоз (Bcl-2), маркеров макрофагов (CD68, CD163), В-лимфоцитов (CD19), белка клеточной адгезии (CD56), маркера фибробластов (FAP) в опухолевом узле плеоморфных сарком/

IGC study of the expression level of proteins responsible for proliferation (Ki-67), apoptosis (Bcl-2), markers of macrophages (CD68, CD163), B-lymphocytes (CD19), cell adhesion protein (CD56), fibroblast marker (FAP) in the tumor node of pleomorphic sarcomas

№	Ki-67	Bcl-2	CD68	CD19	CD56	CD163	FAP
1	<<30 %	+	<30 %	Единичные Single	+++	Отр Neg	+++
2	30 %	+	30 %	Отр Neg	Отр Neg	Отр Neg	+
3	>50 %	+	~30	Единичные Single	+++	Отр Neg	+
4	<30 %	+++	<30 %	Отр Neg	Отр Neg	Отр Neg	+
5	>50 %	+++	~30–50 %	Отр Neg	+	Отр Neg	+
6	>50 %	+++	~30–50 %	Отр Neg	Отр Neg	Отр Neg	±
7	30–50 %	+	~30–50 %	Отр Neg	+	+	Отр Neg
8	<30 %	+++	30–50 %	Отр Neg	+	Единичные Single	+++
9	<30 %	+	<30 %	+	+	Отр Neg	+
10	<30 %	Отр Neg	30–50 % Гигантские клетки Giant cells	Отр Neg	+++	Отр Neg	Отр Neg

Примечания: Отр – отрицательная реакция.

Note: Neg – negative reaction

Согласно ИГХ исследованию из 10 образцов плеоморфных сарком 4 характеризовалось высокой экспрессией Ki-67 (более 30 % Ki-67+ клеток в препарате) (Рис. 1А), тогда как в 6 образцах уровень экспрессии Ki-67 был ниже 30 % (Рис. 1Б). В 4 образцах плеоморфных сарком выявлялся высокий уровень экспрессии Bcl-2 (Рис. 1В), низкая экспрессия Bcl-2 обнаружена в 4 образцах (Рис. 1Г) и в одном образце Bcl-2-положительные клетки не выявлялись (Рис. 1Д).

Экспрессия Ki-67 является одним из самых надежных индикаторов пролиферативной активности раковых клеток. Ki-67 представляет собой ядерный антиген, экспрессирующийся во всех фазах клеточного цикла, за исключением G0. Как и для других ЗНО, высокий уровень экспрессии Ki-67 при СМТ коррелирует с неблагоприятным прогно-

зом [6]. Кроме этого, высокий уровень экспрессии Ki-67 в образцах СМТ значительно коррелирует с частотой локальных рецидивов [7]. ЗНО с индексом Ki-67 > 20 % характеризуются быстрым метастазированием и низкими показателями общей выживаемости [8].

Другим оцениваемым ИГХ-маркером явился белок В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), являющийся ключевым регулятором антиапоптотической активности. Высокий уровень экспрессии Bcl-2 обнаружен при большом количестве ЗНО [9]. Повышение уровня экспрессии Bcl-2 характерно в период эмбрионального развития, а также его гиперэкспрессия наблюдается в ответ на клеточный стресс. Нарушения в процессе апоптоза играют важную роль в инициации и прогрессии опухолевого роста. Кроме того, патологии апоптоза снижают эффективность химиотерапии.

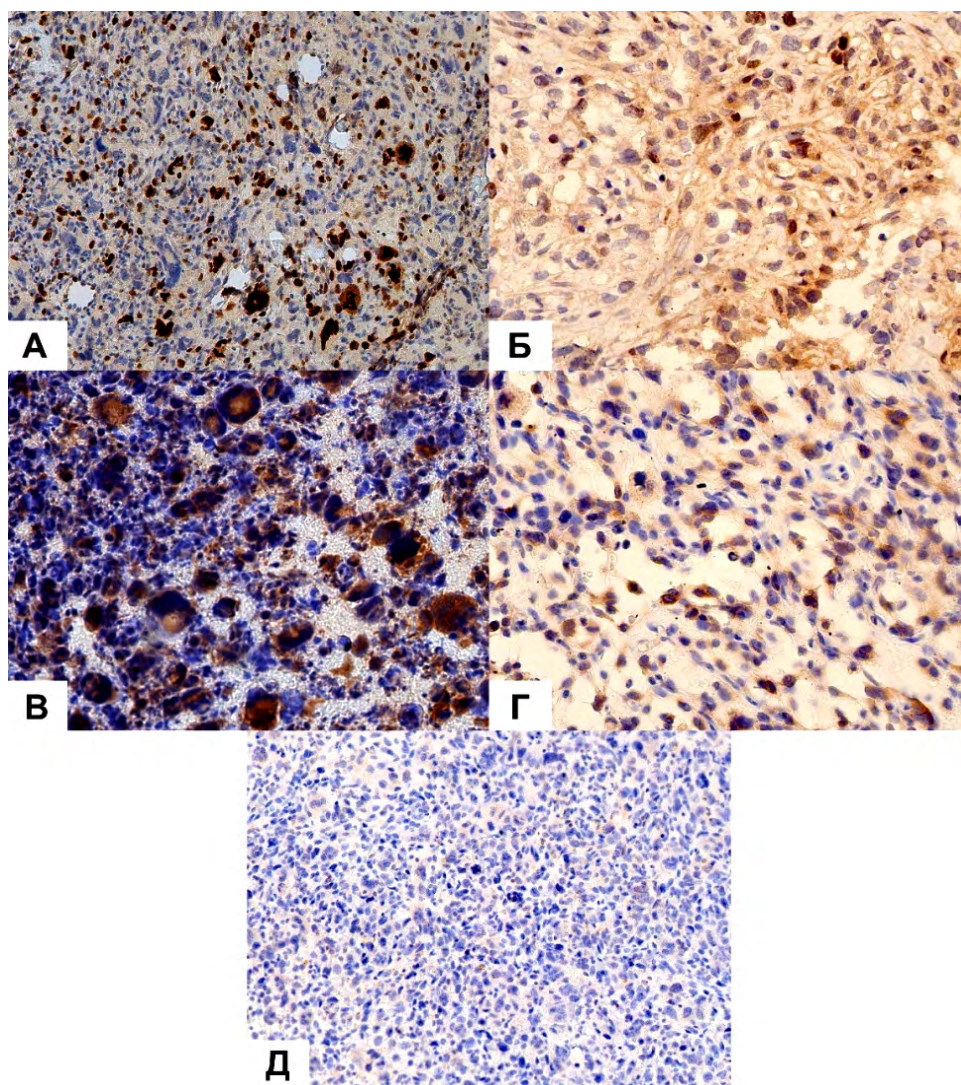


Рисунок 1. Гетерогенность экспрессии Ki-67 (А, Б) и Bcl-2 (В–Д) на гистологических срезах НПС.
А – экспрессия Ki-67 более 50 % клеток (x200, Об. 3); Б – экспрессия Ki-67 менее 30 % клеток (x200, Об.1);
В – выраженная экспрессия Bcl-2 (x200, Об.5); Г – низкая экспрессия Bcl-2 (x200, Об.7);
Д – отрицательная реакция с антителами к Bcl-2 (x200, Об.10)

Figure 1. Heterogeneity of Ki-67 (А, Б) and Bcl-2 (В–Д) expression on histologic sections of UPS.
А – Ki-67 expression more than 50 % of cells (x200, Ob.3); Б – Ki-67 expression less than 30 % of cells (x200, Ob.1);
В – marked expression of Bcl-2 (x200, Ob.5); Г – low expression of Bcl-2 (x200, Ob.7); Д – negative reaction with antibodies to Bcl-2 (x200, Ob.10)

По данным литературы высокая экспрессия Bcl-2 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом заболевания [10]. BCL-2 и ассоциирован с неблагоприятным прогнозом заболевания [10]. В СМТ высокую экспрессию данного маркера связывают с химиорезистентностью, так, ингибирование членов

семейства Bcl-2 привело к более эффективному ответу клеточных линий лейомиосаркомы на введение доксорубина [11]. В 4 из 10 нами исследуемых образцов был обнаружен высокий уровень экспрессии Bcl-2, что вероятнее всего, прогнозирует агрессивное течение заболевания у данных пациентов.

В исследовании The Cancer Genome Atlas (TCGA), включающем 206 СМТ, в НПС были выявлены высокие уровни опухоль-ассоциированных макрофагов [12]. В другом исследовании [13] количественно оценили уровень опухоль-ассоциированных макрофагов, с помощью иммуногистохимических маркеров CD68 (общего маркера макрофагов) и CD163 (маркера M2 макрофагов). Плеоморфные типы саркомы продемонстрировали самые высокие показатели как макрофагов CD68+, так и CD163+. В ходе нашего исследования мы получили несколько несколько различающиеся результаты.

Во всех исследуемых гистологических препаратах были выявлены CD68+ макрофаги. Их число варьировало: в 5 образцах наблюдалось высокое количество CD68+ клеток (30—50 %) (Рис. 2А), менее 30 % макрофагов выявлено в других 5 образцах. В одном случае определялись гигантские CD68+ клетки (Рис. 2Б). Однако CD163+ макрофаги (M2 фенотипа) не определялись (Рис. 2Г), только в 2 образцах наблюдалась положительная реакция с антителами к CD163 (Рис. 2В). Мы объясняем подобное явление, в первую очередь, небольшим количеством образцов, взятых для исследования.

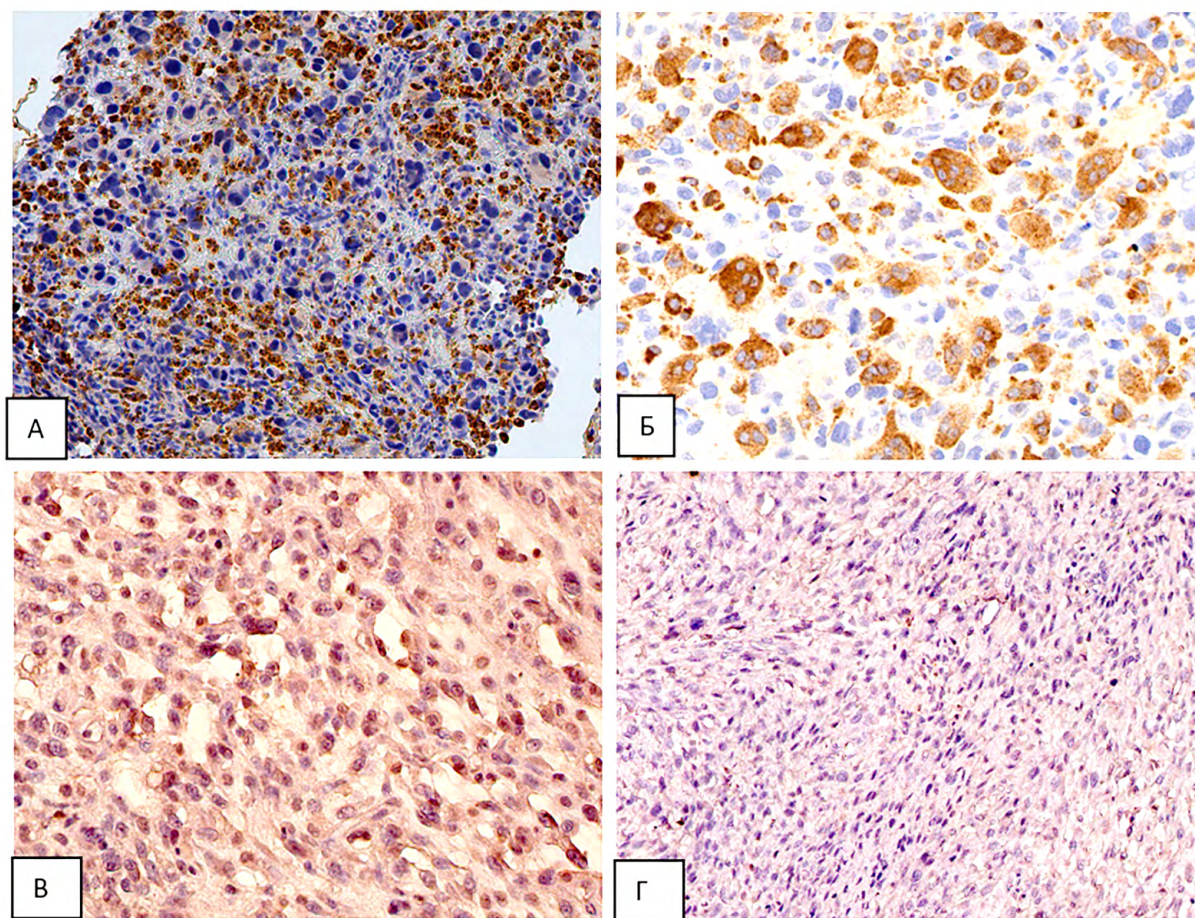


Рисунок 2. CD68+ макрофаги (А, Б) и CD163+ макрофаги (В-Д) в НПС. А — высокое число CD68+ макрофагов (x200, Об.5); Б — гигантские CD68+ клетки (x400, Об.10); В — CD163+ макрофаги (x400, Об.7); Г — отрицательная реакция с антителами к CD163+ (x200, Об.10)

Figure 2. CD68+ macrophages (A, B) and CD163+ macrophages (C-D) in UPS.

A — high number of CD68+ macrophages (x200, Ob.5); Б — giant CD68+ cells (x400, Ob.10); В — CD163+ macrophages (x400, Ob.7); Г — negative reaction with antibodies to CD163+ (x200, Ob.10)

Несмотря на то, что молекула адгезии нервных клеток-1 (NCAM1) или CD56 известна своей ролью фенотипического маркера естественных киллеров (NK) клеток, на самом деле он может экспрессироваться многими другими подпопуляциями иммунных клеток, включая НКТ-клетки, гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки, CD8 Т-клетки, моноциты, дендритные клетки [14]. Этот гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов экспрессируется при различных ЗНО и вовлечен в процессы межклеточной адгезии, роста аксонов, синаптической пластичности, клеточной памяти [15]. В 7 образцах плеоморфных сарком (табл. 2) была обнаружена положительная реакция с антителами к CD56. Причем в этих образцах плеоморфных сарком НК клетки не были идентифицированы, а окрашивание наблюдалось вокруг опухолевых клеток (Рис. 3А-Б). Максимально выраженная экспрессия опухолевыми клетками CD56 была выявлена в 3 образцах (Рис. 3А), в других 4-х опухолевых образцах (Рис. 3Б) CD56 экспрессировался на низком уровне.

CD19+ В-лимфоциты выявлены только в 3 образцах из 10, при этом только в одном образце наблюдалось высокое число CD19+ лимфоцитов, которые образовывали очаговые скопления (Рис. 3В). В двух других образцах CD19+ В-лимфоциты были единичными в препарате (Рис. 3Г). В остальных случаях в опухолях не было обнаружено CD19+ лимфоцитов. По данным литературы НПС характеризуются доминированием опухоль-ассоциированных макрофагов над лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль [13].

Белок активации фибробластов- α (FAP) представляет собой сериновую протеазу II типа, которая специфически экспрессируется активированными фибробластами. В последние годы большое внимание уделяется исследованию про- и противоопухолевых свойств FAP в связи с его высокой экспрессией в ЗНО. Результаты показывают, что экспрессия FAP связана с ростом опухоли; оказывает влияние на пролиферацию и инвазию опухолевых клеток, ангиогенез, эпителиально-мезенхимальный переход, иммуносупрессию и лекарственную устойчивость [16]. При окрашивании антителами к FAP была

обнаружена его экспрессия в 8 из 10 исследованных образцов (Рис. 3 В, Г).

По данным проточной цитометрии, среди клеток микроокружения НПС преобладали CD16 моноциты и CD68 макрофаги (Рис. 4А). Из общей тенденции выбивался образец (OT4), в котором преобладали CD206-макрофаги над CD86 и CD163 (Рис. 4Б). Из анамнеза заболевания пациента известно, что в ходе длительного течения НПС (продолжительность 2 года) проводилась химиотерапия, лучевая терапия и назначался таргетный препарат. Возможно, именно предшествующие методы лечения вызвали изменения клеточного состава микроокружения опухоли.

Методом ПЦР-РВ была оценена экспрессия генов в образцах от 8 пациентов, что связано с нехваткой биоматериала от пациентов 9 и 10 после предшествующих методов исследования. По данным ПЦР-РВ, уровни экспрессии *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* не различались между образцами опухоли и ткани перитуморальной области, которую мы использовали в качестве контроля. Выявлено увеличение уровня экспрессии *EGFR* в НПС по сравнению с тканью перитуморальной области (Рис. 5). По данным литературы, высокий уровень экспрессии *EGFR* в НПС коррелирует с неблагоприятным прогнозом [4].

У двух пациентов (2 и 7) наблюдалась низкая экспрессия *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* в опухоли по сравнению с перитуморальной областью (табл. 3). Попытка сопоставления таких результатов с клиническими особенностями течения заболевания у этих пациентов на данном этапе не привела к успеху. Пациент 8 характеризовался увеличением уровня экспрессии *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2*. Высокая экспрессия данных генов, возможно, связана с длительным рецидивирующим течением заболевания (с 2018 г.) и предшествующей химиотерапией и лучевой терапией.

По сравнению с перитуморальной областью у 3 пациентов из 8 наблюдалось снижение уровня экспрессии маркера M2 противовоспалительных макрофагов — *ARG1*, у 3 пациентов, напротив, его повышение. Уровень экспрессии *NOS2* — маркера провоспалительных реакций возрастал по сравне-

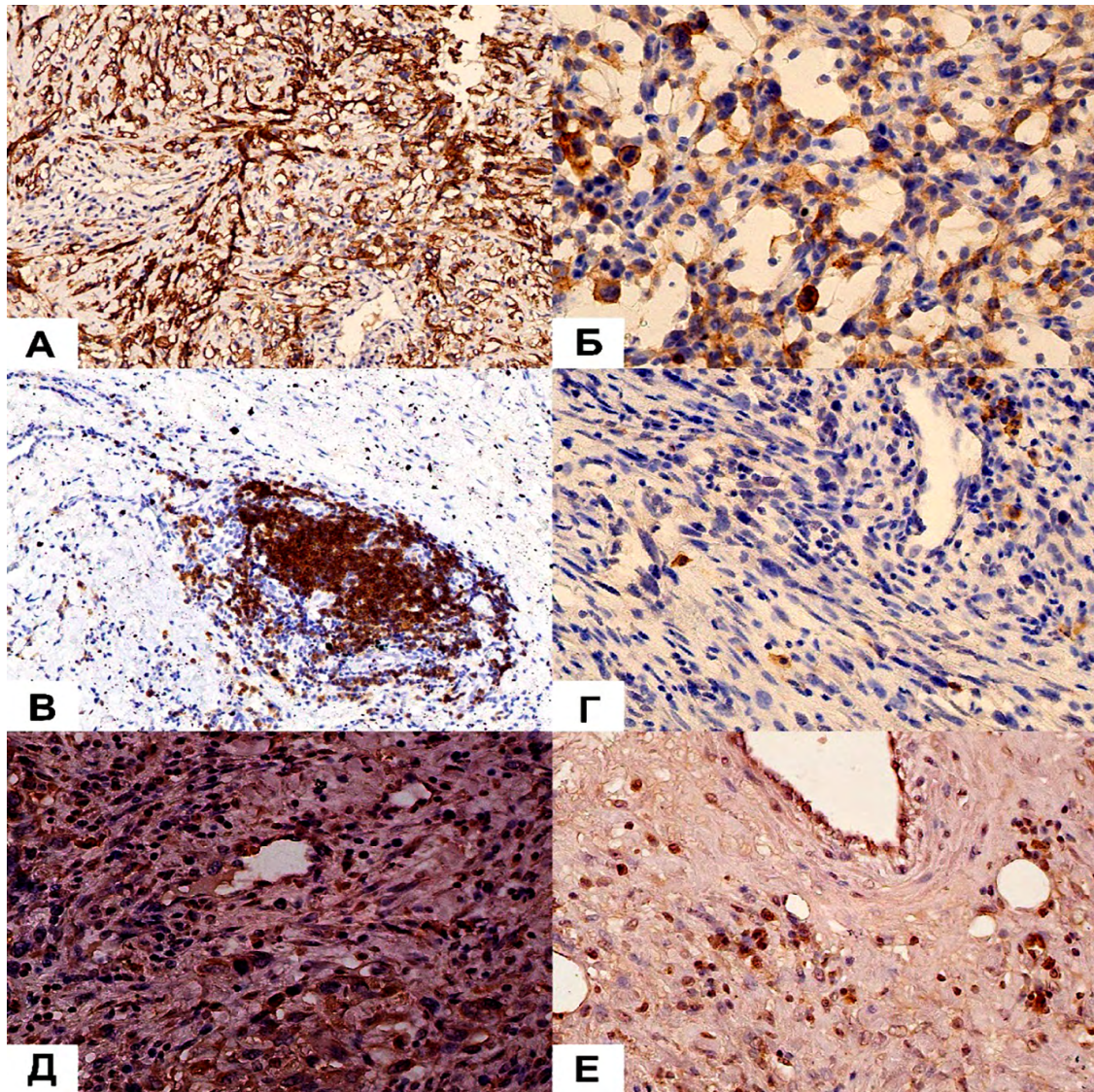


Рисунок 3. CD56+ опухолевые клетки (А, Б), CD163+ макрофаги (В, Г) и FAP+ фибробласты (Д, Е) в НПС. А – выраженная экспрессия CD56+ (x400, Об.1); Б – умеренная экспрессия CD56+ в опухолевых клетках (x400, Об.7); В – скопление CD19+ лимфоцитов (x200, Об.9); Г – единичные CD19+ лимфоциты (x400, Об.1); Д – высокое число FAP+ фибробластов (x400, Об.4); Е – умеренное число FAP+ фибробластов (x400; Об.9)

Figure 3. CD56+ tumor cells (А, Б), CD163+ macrophages (В, Г) and FAP+ fibroblasts (Д, Е) in UPS. А – marked expression of CD56+ (x400, Ob.1); Б – moderate expression of CD56+ in tumor cells (x400, Ob.7); В – cluster of CD19+ lymphocytes (x200, Ob.9); Г – single CD19+ lymphocytes (x400, Ob.1); Д – high number of FAP+ fibroblasts (x400, Ob.4); Е – moderate number of FAP+ fibroblasts (x400; Ob.9)

нию с перитуморальной областью у 3 пациентов, у 2, напротив, снижался. Уровень экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией, *HIF1A* возрастал у 4 пациентов, а у 3 из 8 наблюдалось снижение уровня экспрессии по сравнению с перитуморальной областью. По данным литературы, увеличение уровня

экспрессии *HIF1A* коррелирует с формированием некроза и негативным прогнозом [17]. Уровень экспрессии *VEGF* (фактора роста эндотелия сосудов) был снижен по сравнению с перитуморальной областью у 4 пациентов, что характерно для НПС [18]. Тогда как у 2 пациентов, напротив, наблюдалось

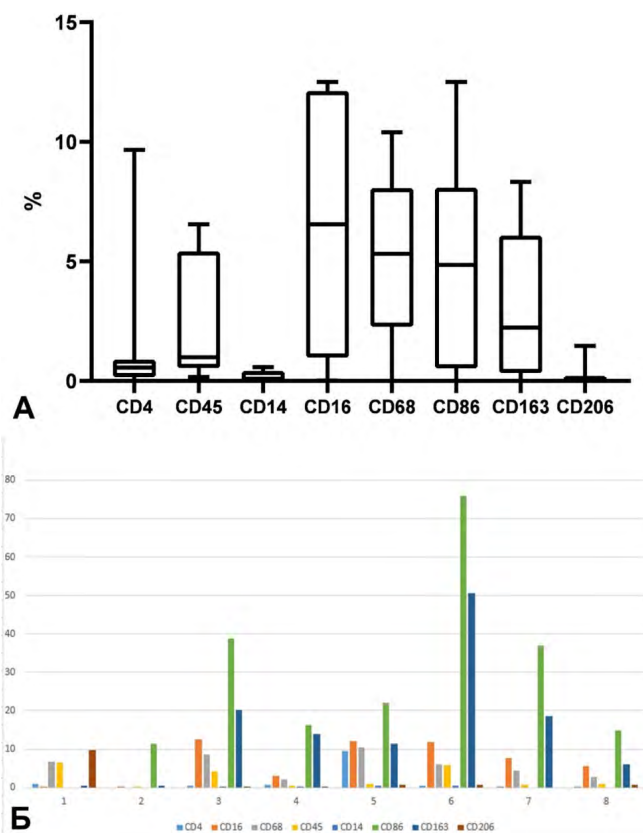


Рисунок 4. Микроокружение НПС. **А** — относительное число **CD4** — Т-лимфоцитов хелперов, **CD45** — лейкоцитов, **CD14** — моноцитов, **CD16** — моноцитов, **CD68** — макрофагов, **CD86** — М1 макрофагов, **CD163** — М2 макрофагов, **CD206** — М2 макрофагов. **Б** — относительное число лимфоцитов и моноцитов у 8 пациентов

Figure 4. UPS microenvironment. **A** — relative number of **CD4** — helper T-lymphocytes, **CD45** — leukocytes, **CD14** — monocytes, **CD16** — monocytes, **CD68** — macrophages, **CD86** — M1 macrophages, **CD163** — M2 macrophages, **CD206** — M2 macrophages. **Б** — relative number of lymphocytes and monocytes in 8 patients

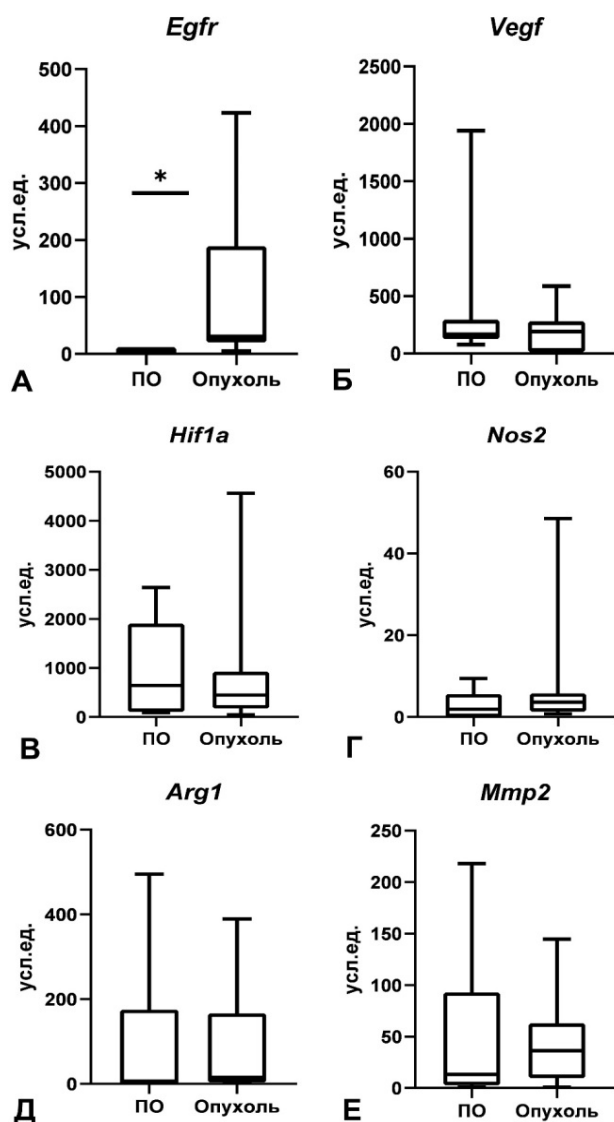


Рисунок 5. Уровни экспрессии *EGFR*, *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* в перитуморальной области (ПО) и в образцах НПС. Критерий Манна-Уитни, * $p < 0,05$

Примечание: ПО — перитуморальная область.

Figure 5. Expression levels of *EGFR*, *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* and *MMP2* in the peritumoral region (ПО) and in tumor samples of UPS. Mann-Whitney criterion, * $p < 0.05$

Note: ПО — peritumoral area.

увеличение уровня экспрессии VEGF. VEGF представляет собой один из ключевых индукторов ангиогенеза. Взаимодействие VEGF-A с рецептором VEGF 2 (VEGFR2) активирует широкий спектр внутри- и внеклеточных событий, способствуя выживанию, пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также дифференцировку эндотелиальных клеток, расширение сосудов и повышение проницаемости сосудистой стенки [19].

У 3 пациентов наблюдалось снижение уровня экспрессии MMP2, а у 3, напротив, ее повышение. По данным литературы, MMP2 играет важную роль в инвазии опухолевых клеток и метастазировании [20].

Таблица 4/ Table 4

Изменение уровней экспрессии ARG1, NOS2, HIF1A, VEGF и MMP2 в НПС по отношению к перитуморальной области/
Changes in expression levels of ARG1, NOS2, HIF1A, VEGF, and MMP2 in the UPS relative to the peritumoral region

Пациент № / Patient №	ARG1	NOS2	HIF1A	VEGF	MMP2
1	0,05	0,84	0,71	0,62	0,16
2	0,06	0,25	0,08	1	11,3
3	1,1	17,0	4,8	0,01	0,64
4	2,6	0	0,08	4,8	5,0
5	3,2	0,08	4,7	0,1	0,01
6	236,2	6,1	8,6	0,03	0,009
7	0,3	0	0,14	0,24	1,85
8	1,0	16,5	3,3	2,0	186,0

В опухолевых клетках НПС было отмечено увеличение уровня экспрессии *EGFR* по сравнению с перитуморальной областью. Уровни экспрессии *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* в опухолях имели индивидуальные различия.

Выводы

В ходе оценки клеточного состава и экспрессии генов в образцах опухоли от 10 пациентов с НПС обнаружено, что для данного типа СМТ характерна экспрессия CD56, FAP, CD68. Среди клеток микроокружения в НПС преобладают макрофаги и CD16-моноциты. В опухолевых клетках НПС

увеличен уровень экспрессии *EGFR*, а уровни экспрессии *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* в опухолях имеют индивидуальные различия и не являются специфическими для НПС.

Для оценки клинической значимости каждого из маркеров необходимо дальнейшее наблюдение за пациентами. Ввиду редкости и высокой гетерогенности данного подтипа СМТ даже незначительное дополнение к молекулярно-биологическому «портрету» НПС послужит основой для будущих исследований данного заболевания.

Библиографический список/References

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17—48. doi:10.3322/caac.21763
2. Fuchs JW, Schulte BC, Fuchs JR, Agulnik M. Targeted therapies for the treatment of soft tissue sarcoma. *Front Oncol.* 2023;13:1122508. Published 2023 Mar 9. doi:10.3389/fonc.2023.1122508
3. Sun H, Liu J, Hu F. Current research and management of undifferentiated pleomorphic sarcoma/myofibrosarcoma. *Front Genet.* 2023;14:1109491. Published 2023 Feb 16. doi:10.3389/fgene.2023.1109491
4. Lu Y, Chen D, Wang B. Single-cell landscape of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Oncogene.* 2024;43(18):1353—1368. doi:10.1038/s41388-024-03001-8
5. Canter RJ, Beal S, Borys D, Martinez SR, Bold RJ, Robbins AS. Interaction of histologic subtype and histologic grade in predicting survival for soft-tissue sarcomas. *J Am Coll Surg.* 2010;210(2):191—198.e2. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2009.10.007
6. Yıldırım S, Çiftdemir M, Ustabaşoğlu FE, Üstün F, Usta U. Evaluation of the factors affecting survival and local recurrence in thigh soft tissue sarcomas. *Jt Dis Relat Surg.* 2024;35(1):130—137. doi:10.52312/jdrs.2023.1289
7. Campos M, DE Campos SG, Ribeiro GG. Ki-67 and CD100 immunohistochemical expression is associated with local recurrence and poor prognosis in soft tissue sarcomas, respectively. *Oncol Lett.* 2013;5(5):1527—1535. doi:10.3892/ol.2013.1226
8. Atik OŞ. Writing for Joint Diseases and Related Surgery (JDRS): There is something new and interesting in this article!. *Jt Dis Relat Surg.* 2023;34(3):533. doi:10.52312/jdrs.2023.57916
9. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol.* 2022;12:985363. Published 2022 Oct 12. doi:10.3389/fonc.2022.985363
10. Janik AM, Terlecka A, Spalek MJ. Diagnostics and Treatment of Extrameningeal Solitary Fibrous Tumors. *Cancers (Basel).* 2023;15(24):5854. doi:10.3390/cancers15245854
11. de Graaff MA, de Rooij MA, van den Akker BE. Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br J Cancer.* 2016;114(11):1219—1226. doi:10.1038/bjc.2016.117

12. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: elizabeth.demicco@sinaihealthsystem.ca; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*. 2017;171(4):950—965.e28. doi:10.1016/j.cell.2017.10.014
13. Dancsok AR, Gao D, Lee AF. Tumor-associated macrophages and macrophage-related immune checkpoint expression in sarcomas. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1747340. doi:10.1080/2162402X.2020.1747340
14. Van Acker HH, Van Acker ZP, Versteven M. CD56 Homodimerization and Participation in Anti-Tumor Immune Effector Cell Functioning: A Role for Interleukin-15. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1029. doi:10.3390/cancers11071029
15. Jaiswal P, Cd A, John JJ. A Spectrum of Histomorphological and Immunohistochemical Expression Profiles of S-100, CD56 and Calretinin in Benign Peripheral Nerve Sheath Tumours. *Cureus*. 2023;15(6): e40751. doi:10.7759/cureus.40751
16. Xin L, Gao J, Zheng Z. Fibroblast Activation Protein- α as a Target in the Bench-to-Bedside Diagnosis and Treatment of Tumors: A Narrative Review. *Front Oncol*. 2021;11:648187. doi:10.3389/fonc.2021.648187
17. Nyström H, Jönsson M, Werner-Hartman L, Nilbert M, Carneiro A. Hypoxia-inducible factor 1 α predicts recurrence in high-grade soft tissue sarcoma of extremities and trunk wall. *J Clin Pathol*. 2017;70(10):879—885. doi:10.1136/jclinpath-2016-204149
18. Washimi K, Kasajima R, Shimizu E, et al. Histological markers, sickle-shaped blood vessels, myxoid area, and infiltrating growth pattern help stratify the prognosis of patients with myxofibrosarcoma/undifferentiated sarcoma. *Sci Rep*. 2023;13(1):6744. doi:10.1038/s41598-023-34026-w
19. Ghalebandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI, Pourgholami MH. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol*. 2023;949:175586. doi:10.1016/j.ejphar.2023.175586
20. Ahlén J, Enberg U, Larsson C. Malignant Fibrous Histiocytoma, Aggressive Fibromatosis and Benign Fibrous Tumors Express mRNA for the Metalloproteinase Inducer EMMPRIN and the Metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP. *Sarcoma*. 2001;5(3):143—149. doi:10.1080/13577140120048601

Ответственный за переписку: Джуманиязова Э.Д. — аспирант, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского института Российского университета дружбы народов, стажер-исследователь лаборатории молекулярной патофизиологии клетки Научно-исследовательского института молекулярной и клеточной медицины Российского Университета дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: enar2017@yandex.ru

Джуманиязова Э.Д. SPIN 1780-5326, ORCID 0000-0002-8226-0433

Лохонина А.В. SPIN 4521-2250, ORCID 0000-0001-8077-2307

Сентябрева А.В. SPIN 6966-9959, ORCID 0000-0001-5064-219x

Косырева А.М. SPIN 5421-5520, ORCID 0000-0002-6182-1799

Джалилова Д.Ш. SPIN 3660-5827, ORCID 0000-0002-1337-7160

Мирошниченко Е.А. SPIN 2436-4104, ORCID 0000-0002-0020-958X

Фетисов Т.И. SPIN 6890-8393, ORCID 0000-0002-5082-9883

Corresponding author: Jumaniyazova Enar Denisovna — PhD student, assistant at the Department of Histology, Cytology and Embryology of the Medical Institute of the Russian Peoples' Friendship University, researcher at the Laboratory of Molecular Cell Pathophysiology of the Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya st., 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: enar2017@yandex.ru

Jumaniyazova E.D. ORCID 0000-0002-8226-0433

Lokhonina A.V. ORCID 0000-0001-8077-2307

Sentyabreva A.V. ORCID 0000-0001-5064-219X

Kosyreva A.M. ORCID 0000-0002-6182-1799

Dzhalilova D. Sh. ORCID 0000-0002-1337-7160

Miroshnichenko E.A. ORCID 0000-0002-0020-958X

Fetisov T.I. ORCID 0000-0002-5082-9883