

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЭКСТРЕННОЙ И РАДИАЦИОННОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ А.М. НИКИФОРОВА» МЧС РОССИИ

На правах рукописи

КУЗЬМИН

Юрий Борисович

**РАСТВОРИМАЯ ФОРМА СУПРЕССОРА АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК
VISTA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КАК МАРКЕР ПРИ
НОВООБРАЗОВАНИЯХ КОСТЕЙ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Н.Е. Кушлинский

Санкт-Петербург - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. НОВАЯ КОНТРОЛЬНАЯ ТОЧКА ИММУНИТЕТА VISTA (V-DOMAIN IMMUNOGLOBULIN SUPPRESSOR OF T CELL ACTIVATION) ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ КОСТЕЙ (Обзор литературы)	13
1.1. Общая характеристика наиболее часто выявляемых опухолей костей.....	13
1.2. Характеристика ключевой контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 при новообразованиях костей.....	16
1.3. Общая характеристика контрольной точки иммунитета VISTA.....	17
1.4. Клинические и экспериментальные исследования VISTA при онкологических заболеваниях.....	23
1.5. Растворимая форма VISTA (sVISTA).....	33
1.6. Основные направления исследований иммунотерапии опухолей в клинике.....	33
1.7. Система RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей.....	37
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Общие данные о группах больных и контроля.....	42
2.2. Общая характеристика обследованных больных новообразованиями костей и здоровых доноров.....	43
2.3. Специальные биохимические методы исследования.....	58
2.4. Статистический анализ результатов исследования.....	58
ГЛАВА III. СОДЕРЖАНИЕ sVISTA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ КОСТЕЙ (собственные результаты исследования)	60
3.1. Содержание sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных новообразованиями костей.....	60
3.2. Концентрации sVISTA в сыворотке крови в контроле и у больных новообразованиями костей в зависимости от пола и возраста.....	65
3.3. Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей в зависимости от клинических и морфологических характеристик заболевания.....	71
3.4. Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от основных критериев системы TNM.....	78
3.5. Связь концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с показателями sPD-1, sPD-L1 и sRANKL.....	83
ГЛАВА IV. ОБЩАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ (собственные результаты исследования)	96

4.1. Общая выживаемость больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от клинико-морфологических факторов.....	96
4.2. Связь отдаленных результатов лечения больных злокачественными новообразованиями костей с учетом концентрации sVISTA в сыворотке крови.....	100
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	103
ВЫВОДЫ	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	117
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последнее десятилетие в лечении больных с онкологическими заболеваниями все чаще стали применяться препараты с ингибирующим действием на так называемые «контрольные точки иммунитета (immune checkpoint) в соответствии с известными данными о роли экспрессии контрольных точек иммунитета в феномене «ускользания» опухоли от иммунного ответа [127].

Особый интерес у исследователей вызывает новая отрицательная иммунная контрольная точка VISTA, которая подобна лиганду клеточной смерти I (PD-L1) и относится к семейству B7 [185].

Повышенная экспрессия VISTA отмечена на инфильтрирующих опухоль лейкоцитах, миелоидных клетках, таких как CD11b⁺ моноциты, CD11c⁺ дендритные клетки и, в меньшей степени, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках [112, 185]. Через сигнализацию VISTA эти иммунные клетки предотвращают эффективную презентацию антигена и косвенно способствуют росту опухоли.

Показано, что присутствие VISTA приводит к снижению активации и пролиферации Т-клеток. Механизм действия этого эффекта, до конца не исследован, при этом, считают, что VISTA может функционировать и как лиганд, и как рецептор. Как лиганд, VISTA экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках и связывает неизвестный рецептор на Т-клетках, чтобы ингибировать последующую активацию Т-клеток [118, 185]. Как рецептор, VISTA экспрессируется на Т-клетках и трансдуцирует внутриклеточные ингибирующие сигналы после связывания лиганда, чтобы ограничить активность Т-клеток [64, 65]. Предлагаемый лиганд для VISTA недавно был идентифицирован как V-set и Ig-домен 3 (VSIG3) [202].

Кроме того, обнаружена тесная связь VISTA с развитием некоторых злокачественных опухолей человека, включая меланому [92], рак простатыр

[68], поджелудочной железы [119], яичников [142], эндометрия [142], немелкоклеточный рак легкого [179].

Кроме того, впервые обнаружено, что уровни VISTA повышаются после лечения анти-CTLA-4 при раке простаты [68] и после лечения анти-PD-1 при метастатической меланоме [92]. Основная гипотеза настоящего исследования - выделение уровней sVISTA в сыворотке крови как маркера характеризующего основные клинико-морфологические характеристики опухоли и ее прогноз, что позволяет использовать этот маркер как важную мишень иммунотерапии рака и стимулирует разработку новых лекарственных препаратов.

Степень разработанности темы исследования

Исследование клеточных сигнальных систем, связанных с ключевыми характеристиками опухолевого процесса, а именно, контрольных точек иммунитета (immune checkpoint), считают актуальным и современным направлением в клинической лабораторной диагностике онкологических заболеваний [142, 153, 179]. Мнение большинства исследователей совпадает в том, что контрольные точки иммунитета связаны со многими изменениями в первичной опухоли и ее микроокружении, способствуя прогрессированию онкологического процесса [6]. Следовательно, контрольные точки иммунитета являются необходимыми факторами в опухолевой прогрессии, а именно, в инвазии и метастазировании [60, 128].

Контрольные точки иммунитета выявлены относительно недавно и представляют различные молекулы, способные регулировать у человека развитие иммунной реакции [127]. Известно, что механизмы, связанные с экспрессией контрольных точек иммунитета, могут быть использованы опухолью для ускользания от иммунного ответа и стали понятными только в 2018 году, когда группа американских и японских исследователей были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины за открытие ингибиторов контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1.

В отличие от других негативных регуляторов Т-клеток, которые экспрессируются после их активации, VISTA экспрессируется на наивных Т-клетках для поддержания состояния покоя. Взаимодействие с VISTA может приводить к гибели наивных Т-клеток или к снижению активации сигнальных путей, активируемых Т-клеточным рецептором (TCR) и их пролиферации. Именно поэтому блокирование VISTA может способствовать увеличению числа Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам, а также повышению их активации в микроокружении опухоли.

Кроме того, показано, что VISTA тесно связана с развитием некоторых типов рака человека, включая меланому [92], рак простаты [68], поджелудочной железы [119], яичников [142], эндометрия [142], немелкоклеточный рак легкого [179]. Кроме того, обнаружено, что уровни VISTA повышаются после лечения анти-CTLA-4 при раке простаты [68] и после лечения анти-PD-1 при метастатической меланоме [92].

Известно, что костеобразующие остеосаркомы экспрессируют VISTA и, полагают, что данный белок может участвовать в процессах инвазии и метастазирования этих опухолей. В настоящее время различные контрольные точки иммунитета рассматривают также как возможные маркеры прогноза злокачественных новообразований [205, 209]. В современной литературе представлено мало клинических исследований по изучению sVISTA при опухолях костей. Однако, авторы полагают, что sVISTA у больных саркомами костей может стать перспективным маркером в оценке клинического течения заболевания и прогноза, а также может служить мишенью соответствующей целенаправленной иммунотерапии.

Цель исследования

Оценка эффективности лабораторной диагностики и возможности прогноза злокачественных новообразований костей на основании анализа частоты выявления и содержания растворимой формы супрессора активации Т-клеток VISTA в сыворотке крови пациентов опухолями костей, его связи с основными клиническими и морфологическими характеристиками опухолей.

Задачи исследования.

1. Сравнить уровни растворимой формы супрессора активации Т клеток VISTA в крови лиц контрольной группы и пациентов с опухолями костей.
2. Оценить различия уровней супрессора активации Т клеток VISTA в группах больных новообразованиями костей в зависимости от морфологии и степени дифференцировки опухоли, распространенности опухолевого процесса.
3. Установить взаимосвязь исследованных показателей (sVISTA, sPD-1, sPD-L1 и sRANKL) с основными клиническими и морфологическими особенностями опухолей костей в группе пациентов с пограничными и злокачественными опухолями костей.
4. Оценить прогностическую значимость уровней sVISTA в сыворотке крови на основе анализа их связи с показателями общей выживаемости больных первичными злокачественными опухолями костей.

Научная новизна исследования

Впервые у большой группы больных новообразованиями костей (125 пациентов злокачественными и пограничными опухолями костей) проведено комплексное сравнительное иммуноферментное исследование содержания sVISTA, рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганда sPD-L1, а также лиганда sRANKL рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF-κB в сыворотке крови с учетом их ассоциации с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания, прогнозом выживаемости.

Получены новые данные о значимом снижении уровня супрессора активации Т клеток VISTA в сыворотке крови больных злокачественными и пограничными новообразованиями костей. При этом у большинства пациентов концентрация данного показателя была ниже 2,0 нг/мл.

Концентрации sVISTA не зависели от пола, как в группе контроля, так и в общей группе больных новообразованиями костей мужчин и женщин. Однако, медиана концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей женщин была незначимо низкой (1,0 нг/мл) по сравнению с контролем (4,9 нг/мл; $p=0,2$). При этом, у больных саркомами костей отмечена обратная корреляционная зависимость между возрастом и концентрацией sVISTA в сыворотке крови.

Обнаружена связь сывороточных уровней sVISTA с гистологическим строением злокачественных новообразований костей и степенью их дифференцировки, локализацией опухоли в костях скелета, видом и типом пораженной кости и некоторыми критериями системы TNM.

Продемонстрированы разнонаправленные изменения уровней растворимых форм белков-мишеней таргетной иммунотерапии sPD-1 и sPD-L1, а также лиганда sRANKL рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF- κ B в периферической крови больных злокачественными и пограничными опухолями костей. В наибольшей степени они выражены при новообразованиях особой природы – пограничной гигантоклеточной опухоли кости и саркоме Юинга, имеющей нейроэктодермальное происхождение. Можно предположить, что именно эти заболевания являются наиболее вероятными кандидатами для иммунотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Наиболее важный теоретический вывод, который необходимо сделать на основании данных представленного исследования, заключается в том, что выявлено статистически значимое снижение уровня маркера sVISTA в сыворотке крови пациентов с опухолями костей по сравнению группой здоровых доноров соответствующего возраста и пола.

Практическая значимость данной работы заключается в том, что отдаленные результаты лечения больных первичными саркомами костей статистически значимо определяет преимущественно гистологический

вариантом строения опухоли ($p=0,001$). При этом следует отметить значимые различия в уровнях sVISTA между здоровыми донорами и больными хордовой кости ($p=0,018$), у последних концентрации маркера в сыворотке крови резко снижены, что может быть связано с их низкой чувствительностью при лечении ингибиторами контрольных точек иммунитета.

Наилучшие показатели 3-летней общей выживаемости отмечены у больных хордовой кости, а неблагоприятный прогноз общей выживаемости был характерен для больных типичной остеосаркомой кости.

В качестве дополнительного лабораторного маркера оценки прогноза общей выживаемости первичных больных хрящобразующей типичной хондросаркомой кости следует использовать исходные до лечения уровни растворимой формы супрессора активации Т-клеток sVISTA: концентрации маркера sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл в сыворотке крови свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе 3-летней общей выживаемости.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является иммуноферментное исследование содержания растворимой формы отрицательной иммунной контрольной точки sVISTA и ее ассоциации с биохимическими маркерами: рецептором sPD-1, лигандами sPD-L1 и sRANKL, выполненной с использованием современного оборудования и высокочувствительных методик. Анализ полученных результатов был проведен в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухолей костей. Сведения о прогностической способности исследованных показателей основаны на статистическом анализе с учетом данных о безрецидивной и общей выживаемости.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Растворимая форма отрицательной контрольной точки иммунитета sVISTA – новое направление клинических иммунологических исследований в онкоosteологии, тесно связано с развитием первичных злокачественных (мезенхимальные саркомы) опухолей костей, при этом у преобладающего числа больных содержание маркера снижено в сыворотке крови по сравнению со здоровыми донорами.

2. Сывороточные уровни sVISTA, sPD-1, sPD-L1, sRANKL могут быть использованы как дополнительные лабораторные маркеры при анализе клинических и морфологических характеристик у больных злокачественными опухолями костей, а также в оценке прогноза общей выживаемости больных злокачественными новообразованиями костей.

Степень статистической значимости результатов

Достоверность и обоснованность результатов исследования обеспечена достаточным количеством обследованных пациентов (112 больных первичными злокачественными и 13 пограничными опухолями костей) и лиц контрольной группы, корректным дизайном исследования, использованием современных клинических и лабораторных методов, адекватных поставленным цели и задачам. В процессе выполнения работы соблюдались общепринятые этические принципы. Анализ результатов, полученных в ходе исследования, был проведен с использованием современных методов вариационной статистики. Изучение 210 литературных источников позволило осуществить обоснованную интерпретацию результатов работы.

Выводы и практические рекомендации диссертационного исследования обоснованы, соответствуют цели и задачам исследований.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на: XXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика клинической лабораторной диагностики» (Москва, Крокус-Экспо, 21-23

марта 2017 г.); III Российском Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 11-13 октября 2017 г.); IV Российском Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 3-5 октября 2018 г.); VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 21-23 декабря 2021 г.); на XXVII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: вклад в борьбу с пандемией» (Москва, 4-6 апреля 2022 г.)

Внедрение результатов работы в практику

Полученные результаты исследования внедрены в клиническую практику лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России. Материалы диссертации используются на лекционных, семинарских занятиях с курсантами циклов повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова МЗ РФ.

Личный вклад автора

Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор лично принимал участие в заборе материала, проводил биохимические исследования у больных первичными опухолями костей и здоровых доноров. Диссертантом осуществлены статистическая обработка, анализ и интерпретация собранных материалов, сформулированы выводы и практические рекомендации, оформлена диссертационная работа.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 13 печатных работ по теме диссертации, 4 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства

образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (биологические науки).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», глав «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя цитируемой литературы. Общий объем диссертации 138 листов машинописного текста, иллюстрирован 30 таблицами и 37 рисунками. Указатель литературы содержит 210 источников, из них 21 работа отечественных и 189 зарубежных авторов.

ГЛАВА I.

НОВАЯ КОНТРОЛЬНАЯ ТОЧКА ИММУНИТЕТА VISTA (V-DOMAIN IMMUNOGLOBULIN SUPPRESSOR OF T CELL ACTIVATION) ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ КОСТЕЙ

(обзор литературы)

1.1. Общая характеристика наиболее часто выявляемых опухолей костей.

Опухоли костей – достаточно редкая гетерогенная группа новообразований соединительной ткани [147, 86, 102, 135]. Существует широкий диапазон руководств по ведению и выбору индивидуального решения по лечению конкретного пациента, включая диагностику, подходы к хирургическому лечению и химио- и лучевой терапии, лечению рецидива и паллиативной помощи. Следует указать, что работа опытной междисциплинарной команды по комплексному лечению больных ОС кости привела к более долгосрочному выживанию двух третей пациентов с локализованным заболеванием [155, 191].

Вместе с тем, саркомы костей характеризуются крайне агрессивным клиническим течением, в ряде наблюдений резистентны к проводимой лекарственной терапии, отличаются быстрым гематогенным метастазированием и неблагоприятным прогнозом [52, 102, 169, 175, 207].

Пристальный интерес онкологов к саркомам костей связан прежде всего с тем, что эти новообразования характеризуются определенными биологическими и клиническими особенностями. Так, например, СЮ как и ОС кости, наиболее часто обнаруживаются в возрасте 1-2 десятилетий жизни [191] с пиком заболеваемости у детей, в пубертатном периоде (16-18 лет), когда начинают активно функционировать половые железы, при этом другие типы сарком костей (ХС) наиболее часто выявляются у молодых людей 3-го и 4-го десятилетий жизни [59, 160]. Некоторые злокачественные опухоли костей связаны с полом и возрастом пациентов [36, 152]. Так, ОС кости в 2

раза чаще выявляется у мужчин, чем у женщин, а экспериментальные исследования убедительно доказали, что стимулятором роста ОС является тестостерон, а ингибитором – эстрадиол-17 β [5]. При этом, подтверждена гормоночувствительность ОС к половым стероидным гормонам на основании выявления в цитозольной фракции опухолей РА и РЭ [3]. Известно, что ХС кости чаще поражает женщин в возрасте 3-4 десятилетий [57]. В литературе также представлены наблюдения вторичной ОС кости (на фоне болезни Педжета), которая поражает людей в возрасте 50-70 лет [191].

В настоящее время в России единый регистр опухолей костей только начинает формироваться. В США саркомы костей составляют 0,2% ежегодно среди вновь выявленных злокачественных опухолей. По данным реестра SEER с 2011 по 2015 г.г. число новых случаев злокачественных опухолей костей составило 0,9 на 100000 человек в год, а число смертей - 0,4 на 100000 человек каждый год.

По данным отечественных и зарубежных авторов средний возраст установления злокачественного новообразования кости составляет 42 года, самые высокие показатели смертности от сарком костей отмечены среди пациентов в возрасте от 70 лет и старше, показатель 5-летней общей выживаемости при саркомах костей составляет около 70%. При этом наиболее часто выявляемой злокачественной опухолью кости является костеобразующая ОС (36%), за ней следуют хрящеобразующая ХС (20-25%) и далее СЮ (16%) [43, 72, 191].

У большинства опухолей, в том числе и сарком костей, этиология не известна, патогенез исследован не достаточно [11, 14]. Однако, доказано, что молекулярно-генетические нарушения, в том числе и механизмы противоопухолевого иммунитета, составляют основу механизмов злокачественной трансформации клетки и опухолевого роста, клеточной пролиферации, инвазии и метастазирования [13, 98, 106, 121, 206]. При этом,

механизмы, обуславливающие хроническую пролиферацию, создают основу для формирования нестабильности генома способствующей возникновению злокачественных новообразований, в том числе и сарком костей [10,15, 21].

Хирургическое удаление опухоли, по-прежнему, остается важным методом лечения первичных сарком костей, однако у большинства этих пациентов неблагоприятный прогноз связан с невозможностью удаления метастазов в отдаленных органах[77, 130].

К сожалению, у большинства пациентов по-прежнему выполняют калечащие операции - ампутации конечностей, что приводит к инвалидизации молодых пациентов [117]. Однако с развитием неoadьювантной и адьювантной химиотерапии стало возможным проведение у половины пациентов сохраняющих операций (без удаления пораженной саркомой конечности), так называемых хирургических вмешательств с использованием эндопротезирования суставов и конечностей [43].

Более четырех десятилетий назад специализированные режимы химиотерапии превратили ОС, когда-то считавшуюся смертельным заболеванием, в болезнь, при которой выживает большая часть пациентов и пионером в этой области был G. Rosen и et al. (1976). До настоящего времени химиотерапию считают обязательным и наиболее важным компонентом в комплексном и комбинированном лечении сарком костей [61, 197], однако выраженные побочные эффекты и небольшой арсенал эффективных лекарственных противоопухолевых препаратов все-таки ограничивают ее применение [27, 75, 183]. Поэтому разработка альтернативных новых методов лечения сарком костей имеет большое значение. [130, 181, 191].

1.2. Характеристика ключевой контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 при новообразованиях костей.

От иммунного ответа организма позволяет уйти опухоли активация контрольных точек иммунитета и, в частности, сигнального пути PD-1/PD-L1. Некоторые методы терапии опухолей основаны на способности

моноклональных антител к рецептору PD-1 и его лиганду PD-L1 препятствовать их взаимодействию [73].

В настоящее время известно, что контрольные точки иммунитета регулируют противоопухолевый иммунитет при различных онкологических заболеваниях, в том числе и при саркомах костей [12, 6, 83, 170, 173, 206].

Следует отметить, что работ по изучению КТИ PD-1/PD-L1 при опухолях костей представлено в литературе недостаточно [104, 109]. Однако некоторые из них заслуживают особого внимания.

Так, Shen J.K. и соавторы не выявили связи уровней экспрессии PD-L1 в ОС с возрастом и полом пациентов, метастазированием, рецидивом, неoadъювантной химиотерапией, процентом некротизированных и выживших клеток в опухоли. Вместе с тем, средняя продолжительность общей выживаемости для пациентов с низким уровнем PD-L1 (PD-L1-low) была выше и составила 89 месяцев по сравнению с 28 месяцами для пациентов с высоким уровнем PD-L1 (PD-L1-high), демонстрируя пограничную тенденцию, но не достигая статистической значимости ($P=0,054$) [163].

Еще одним важным разделом исследования J.K. Shen et al. (2014) является анализ 30 метастазов (23 легочных и 7 нелегочных - в основном кости таза, плечевая и подвздошная кости, средостение) который показал, что средняя экспрессия PD-L1 в легочных метастазах была статистически значимо выше, чем во внелегочных метастазах. Также отмечено, что происхождение метастазов (легочные или нелегочные) коррелировало с количеством TILs ($P=0,044$). Значение этого открытия остается неясным и, возможно, связано с микросредой легких или предшествующим лечением, однако для убедительного доказательства этого факта потребуются более крупные когорты пациентов.

В настоящее время пристальный интерес исследователей связан с изучением растворимых сывороточных форм системы рецептора и лиганда системы PD-1/PD-L1 (sPD-1, sPD-L1) при злокачественных

новообразованиях костей [83, 91, 107]. При этом, все больше и больше исследований показывают, что иммунотерапия может быть потенциально многообещающим методом лечения различных опухолей, в том числе и злокачественных опухолей костей [46, 60, 93, 125, 128, 186].

1.3.Общая характеристика контрольной точки иммунитета VISTA.

VISTA (V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation) (также известный как *c10orf54*, *Gi24* [158], *VSIR*, *SISP1* [200], *B7-H5*, *PD-1H* [63], *DD1α* [203], *Dies1* [22]) - недавно обнаруженный иммунный контрольный белок (трансмембранный белок I типа), кодируемый геном *C10orf54*, локализованным на хромосоме 10 (10q22.1), который подавляет активацию Т-клеток, имеющий общую гомологию последовательностей как с PD-1, так и с PD-L1 [145, 185] и принадлежащий семейству B7 [83, 90, 185].

Следует отметить, что VISTA может подавлять активацию Т-клеток, когда экспрессируется в виде лиганда на антигенпрезентирующих клетках или когда экспрессируется в виде рецептора на Т-клетках [120, 184, 185]. При этом, J. Liu et al. (2015) сообщили о нерегулярной активирующей Т-клетки роли VISTA, которая отличается от пути PD-1/PD-L1, что послужило обоснованием для комбинированного таргетирования путей VISTA и PD-1/PD-L1 при лечении онкологических пациентов, а на экспериментальных моделях отмечен положительный синергический эффект такой комбинированной терапии КРР. Эти исследования показывают, что VISTA может модулировать новый механизм иммунного уклонения и, таким образом, является потенциальной мишенью для иммунотерапии злокачественных опухолей.

Белок человека VISTA представляет собой белок I типа, имеет длину 279 аминокислот, включая 162-аминокислотный внеклеточный домен, 21-аминокислотный трансмембранный домен и 96-аминокислотный цитоплазматический домен [63]. Цитоплазматический домен лишен каких-либо иммунорецепторных тирозиновых сигнальных мотивов, но содержит несколько остатков фосфорилирования казеинкиназы 2 и фосфокиназы C,

которые могут играть определенную роль в передаче сигнала [131]. Анализ последовательности белков кластеризовал VISTA с группой семейства B7 лигандов (CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, ICOSL, CD276), все они содержат консервативную переменную иммуноглобулиновую (IgV)-подобную складку.

VISTA имеет интересный паттерн экспрессии, при этом наибольшее количество мРНК обнаруживается либо в кроветворных тканях (например, селезенке, лимфатических узлах, периферической крови), либо в тканях со значительной инфильтрацией лейкоцитами [185]. Это указывает на то, что VISTA, вероятно, обладает важными иммунными функциями. В целом, паттерны экспрессии VISTA у мышей и человека хорошо согласованы, однако человеческие моноциты и дендритные клетки миелоидного клона, по-видимому, равномерно экспрессируют VISTA, тогда как у лабораторных животных VISTA, по-видимому, отслеживает зрелость миелоидных клеток, а не является характеристикой миелоидного клона, экспрессируется на кроветворных клетках, с наибольшей плотностью на миелоидных (CD11b+ моноциты, CD11c+ дендритные клетки) и гранулоцитарных клетках, а также в тканях, инфильтрированных лейкоцитами, однако маркер более слабо экспрессирован на кластерах дифференцировки CD4+ и CD8+ Т-клеток [118, 185]. VISTA оказывает иммуносупрессивное действие на покоящиеся и активированные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека *in vitro* и *in vivo*, при этом наряду с ингибированием пролиферации Т-клеток, ингибирует выработку цитокинов [115, 185].

VISTA может выступать в качестве ингибитора активации и пролиферации Т-клеток, что позволяет обеспечивать толерантность и ограничения иммунопатологии [118]. Однако механизм действия этого эффекта до конца неясен, поскольку считают, что VISTA функционирует и как лиганд, и как рецептор [25, 64, 65, 118, 187, 203].

Как лиганд, VISTA экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках и связывает неизвестный рецептор на Т-клетках, чтобы ингибировать

последующую активацию Т-клеток [85, 118]. Как рецептор, VISTA экспрессируется на Т-клетках и трансдуцирует внутриклеточные ингибирующие сигналы после связывания лиганда, чтобы ограничить активность Т-клеток [64]. Предлагаемый лиганд для VISTA недавно был идентифицирован как V-set и Ig-домен, содержащий 3 (VSIG3) [184, 202].

Обнаружено, что контрольные белки чрезмерно экспрессируются опухолевыми клетками, а также окружающими их иммунными клетками и предотвращают противоопухолевую активность, вводит естественные механизмы регуляции, чтобы избежать иммунного клиренса. Так, продукция VISTA повышается на инфильтрирующих опухоль лейкоцитах, включая высокую экспрессию на миелоидных супрессорных клетках (MDSC) [112]. Поэтому можно предположить, что блокада иммунных контрольных точек становится наиболее многообещающей стратегией лечения опухолей. Большие преимущества блокады контрольных точек были продемонстрированы при нескольких видах новообразований, включая меланому, рак легких, мочевого пузыря, почек, головы и шеи и болезнь Ходжкина [162, 177, 190, 201].

Поэтому крайне необходимо дальнейшее изучение дополнительных коингибирующих молекул для иммунотерапии. Были исследованы несколько многообещающих иммунных контрольных точек, включая B7-H3, B7-H4, LAG3, CD244, VTLA, TIM3, TIGIT, VISTA, IDO1 и ADORA2.

Через сигнальную систему VISTA ингибирующие иммунные клетки предотвращают эффективную презентацию антигена и косвенно способствуют росту опухоли. Экспрессия VISTA выявлена в некоторых типах злокачественных новообразований у человека, включая меланому кожи [92, 101], плоскоклеточный рак полости рта [196], рак простаты [68], толстой кишки [198], поджелудочной железы [119], яичников и эндометрия [142], желудка, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) [179], гепатокарциному, трофобластическую болезнь, острый миелолейкоз. Недавние открытия показали, что следующие ткани человека

сверхэкспрессируют VISTA, а именно: мозг, желудок, щитовидная железа и кроветворные ткани, однако сердце, печень, кость и селезенка демонстрируют наименьшую экспрессию [25, 185]. Так же было выявлено, что во время беременности повышенная экспрессия VISTA в плаценте может быть связана с ролью этой контрольной точки иммунитета в толерантности алло-плода [112].

Роль VISTA в регуляции воспаления основана не только на регуляции Т-клеток, поскольку VISTA может вместо этого перепрограммировать биологию макрофагов. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что mAb агонистов VISTA ответственны за снижение индуцированных липополисахаридами IL-12p40, IL-6, CXCL2 и TNF, ключевых провоспалительных медиаторов эндотоксинового шока, подтверждая гипотезу о том, что VISTA является регулятором отрицательной контрольной точки, который вызывает в макрофагах как толерантность, так и противовоспалительные программы [58].

При РМЖ VISTA экспрессировалась на иммунных клетках 29,1% (267/919) образцов и на опухолевых клетках 8,2% (75/919). VISTA чаще экспрессировалась в образцах, которые были отрицательными по РЭ, отрицательными по РП, положительными по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека, слабо дифференцированы, обогащены рецептором 2 эпидермального фактора роста человека и состояли из базальных опухолей. VISTA на иммунных клетках коррелировал с PD-1, PD-L1, стромальным CD8 и экспрессией TILs. Кроме того, VISTA является независимым прогностическим фактором для улучшения безрецидивной и специфической для заболевания выживаемости у пациентов с отрицательными РЭ и РП при базальной инвазивной протоковой карциноме.

Кроме того, обнаружено, что уровни VISTA повышаются после лечения анти-CTLA-4 при раке простаты [209] и после лечения анти-PD-1 при метастатической меланоме [92], выделяя экспрессию VISTA как метод

приобретенной устойчивости к имеющимся в настоящее время ингибиторам контрольных точек иммунитета.

Ингибирование VISTA ослабляет супрессивную функцию Т-клеток, что приводит к снижению роста опухоли [53, 118]. Блокада VISTA продемонстрировала многообещающие результаты на некоторых моделях опухолей у экспериментальных животных. Так, на моделях фибросаркомы у экспериментальных животных показано, что гиперэкспрессия VISTA на клетках опухоли индуцирует иммунную защиту против роста контрольных опухолевых клеток [185]. Кроме того, высказано предположение, что использование анти-VISTA моноклональных антител в экспериментальных моделях рака замедляет рост опухоли; особенно заметные результаты наблюдали при использовании VISTA в комбинации с неоантигенной опухолевой вакциной [149, 185]. Полученные первые результаты указывают на то, что VISTA является перспективной мишенью в терапии злокачественных опухолей [146].

Антитела против VISTA показали противоопухолевую эффективность на множественных экспериментальных сингенных моделях [112, 120, 185]. Терапевтическая разработка продвинулась до клинических испытаний на больных с оценкой низкомолекулярного антагониста, нацеленного на VISTA и PD-L1 (NCT02812875) и недавно завершённое исследование антитела против VISTA у пациентов с прогрессирующим раком (NCT02671955). Предполагаемое антитело против VISTA, использованное в испытании I фазы (называемое VSTB; основано на VSTB112), ингибировало VISTA сигнализацию *in vitro* и показало регрессию опухоли на модели рака мочевого пузыря с использованием мышей с нокаутом VISTA человека [165]. Однако, мало что известно о его механизме ингибирования. Предполагаемые области взаимодействия между VSTB и VISTA были предложены, но специфический связывающий эпитоп не был идентифицирован. Также неизвестно, может ли VSTB блокировать связывающее взаимодействие VISTA-VSIG3.

Успех ИКТ, нацеленных на CTLA4 и PD-1, для управления постоянно растущим списком злокачественных новообразований лежит в основе ключевой значимости иммуносупрессивных путей, которые не позволяют Т-клеткам эффективно распознавать и уничтожать свои неопластические аналоги [153]. Однако, хотя устойчивый ответ на иммунотерапию на основе ИКТ был зарегистрирован у части пациентов с солидными опухолями, большинство пациентов не реагируют на ИКТ при использовании в качестве отдельных агентов. Попытки повысить скорость ответа путем одновременного блокирования двух коингибирующих рецепторов CTLA4 и PD-1 оказались успешными у пациентов с меланомой и раком легкого, но за счет повышенной токсичности [31, 78, 195]. Кроме того, было показано, что повреждающие ДНК агенты с иммуностимулирующим действием, такие как фокальная RT, синергизируют с ИКТ у некоторых групп пациентов [23, 67, 70]. Эти данные демонстрируют, что сочетание нескольких видов иммунотерапии с неперекрывающимися механизмами действия может составлять ценную стратегию для увеличения скорости ответа на иммунотерапию на основе ИКТ [151].

Предыдущие исследования сообщили о VISTA как об отрицательной иммунной контрольной точке, которая потенциально сдерживает пролиферацию и активацию Т-клеток. Однако значение экспрессии VISTA в TME для выживаемости остается спорным. В этом исследовании пациенты TNBC с VISTA-положительными ИЦ, особенно пациенты на стадии T1-2N0 и пациенты базальной подгруппы, имели значительно благоприятный прогноз с точки зрения RFS и OS. Недавние исследования аденокарциномы пищевода [122] и РМЖ [208] также подтвердили, что высокие уровни VISTA в IC связаны с лучшим прогнозом. Исследования НМРЛ [179] показали, что высокая экспрессия VISTA в опухоли связана с длительным выживанием, в то время как в большинстве случаев она экспрессируется только в строме опухоли. Между тем, исследования гепатоцеллюлярной карциномы [205] и серозного рака яичников высокой степени злокачественности [209] показали,

что экспрессия VISTA в иммунных клетках в значительной степени связана с благоприятной выживаемостью. Однако исследования рака желудка [30] и плоскоклеточного рака полости рта [196] не показали взаимосвязи между экспрессией VISTA и выживаемостью. Исследование меланомы кожи [101] выявило корреляцию между экспрессией VISTA в иммунных клетках и прогнозом. Все эти данные показали, что механизм экспрессии VISTA в опухолевых и иммунных клетках проявляют себя по-разному, и его взаимосвязь с прогнозом варьируется для разных видов рака [41].

1.4. Клинические и экспериментальные исследования VISTA при онкологических заболеваниях.

VISTA и рак яичников (РЯ). Известно, что РЯ является наиболее агрессивным типом гинекологических злокачественных опухолей и составляет самый высокий уровень смертности от этого заболевания во всем мире. Так, например, по данным эпидемиологических исследований в 2018 году РЯ впервые был диагностирован у 295 414 пациенток и 184 799 женщин умерли от этого заболевания [35]. Более чем у 75% пациенток заболевание диагностируют в распространенной стадии (III/IV), для которой 5-летняя общая выживаемость составляет менее 30%. Несмотря на то, что хирургическое вмешательство и адъювантная химиотерапия эффективны для большинства больных РЯ, более чем у 70% больных опухоль в конечном итоге рецидивирует и становится резистентной к химиотерапии. Поэтому пристальный интерес к иммунотерапии привлекает внимание многих практических врачей.

В работе Н. Liao et al. (2018) проведен иммуногистохимический (ИГХ) анализ экспрессии VISTA на опухолевых клетках, инфильтрирующих опухоль иммунных клетках и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов у 65 больных РЯ. Результаты показали высокую экспрессию VISTA на опухолевых клетках или ИК, которая была статистически значимо связана с прогрессирующей стадией и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах. Авторы не выявили связи между экспрессией VISTA и 5-летней

общей выживаемостью, и прогрессирующая стадия РЯ была единственным независимым предиктором неблагоприятного прогноза, основанном на многофакторном регрессионном анализе Кокса. В целом, экспрессия VISTA увеличивается с прогрессией заболевания, стадией и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах, что указывает на участие этого маркера в прогрессировании РЯ. Что еще более важно, данные этих авторов подразумевают маркер VISTA как мишень для иммунотерапии РЯ.

В исследовании L. Zong et al. (2020) авторы изучали уровни экспрессии VISTA и PD-L1 в 146 образцах РЯ с помощью ИГХ метода и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания, включая выживаемость. Кроме того, проанализированы ассоциации между VISTA-кодирующим геном *C10orf54*, другими иммунными контрольными точками иммунитета и выживаемостью. Показано, что VISTA выявлена в 51,4% (75 проб) всех образцов и в 46,6% PD-L1-отрицательных образцов. Выявленный авторами факт указывает на то, что этот белок может служить альтернативной иммунной контрольной точкой, подавляющей активацию Т-клеток. Экспрессия VISTA была ассоциирована с экспрессией PD-L1 и соответствовала благоприятному прогнозу у пациентов с низкодифференцированным РЯ. Экспрессия VISTA выявлена в 28,8%, 35,6% и 4,1% опухолевых клеток (ТС), иммунных клеток (ИС) и эндотелиальных клеток соответственно. Показано, что экспрессия VISTA связана с патологическим типом рака яичников и экспрессией PD-L1. Также экспрессия VISTA в ТС, но не в ИС, была связана с длительной безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов с низкодифференцированным серозным РЯ. Экспрессия мРНК *C10orf54* была связана с длительной общей выживаемостью и иммунными генами, модулирующими прогрессирование заболевания. Полученные авторами результаты показали, что экспрессия VISTA в опухолевых клетках РЯ связана с благоприятным прогнозом у пациентов с низкодифференцированным серозным РЯ; однако необходимы

дополнительные исследования, чтобы лучше понять роль экспрессии VISTA при данном заболевании.

К. Mulati et al. (2019) также обнаружили высокую экспрессию VISTA в клетках (52 линии) РЯ и (27 линий) рака эндометрия человека. Однако взаимосвязи между VISTA, PD-L1, клинико-патологическими особенностями и прогнозом у больных РЯ остаются до конца неизвестными.

VISTA и меланома. В исследовании Н. Kakavand et al. (2017) оценивали потенциальные механизмы приобретенной резистентности к анти-PD-1 у пациентов с метастатической меланомой. Тридцать четыре биопсии метастатической меланомы были собраны у 16 пациентов, которые первоначально ответили либо на анти-PD-1 (n=13) самостоятельно, либо на комбинацию анти-PD-1 и анти-CTLA4. Биопсии были взяты до начала лечения (n=12) и после прогрессирования заболевания (n=22). Исследование ИГХ проводили во всех биоптатах для выявления экспрессии маркера. У большинства пациентов наблюдали значимо повышенную плотность VISTA+ лимфоцитов в опухоли от начала терапии до прогрессирования заболевания (12/18) (p=0,009) и повышенную экспрессию опухолевого PD-L1 от начала лечения до прогрессирования болезни (11/18).

VISTA и рак легкого. В исследовании F. Villarroel-Espindola et al. (2018) использовали мультиплексную количественную иммунофлуоресценцию (QIF). Провели локальные измерения белков VISTA, PD-1 и PD-L1 у 758 больных НМРЛ в стадиях I–IV из 3 независимых когорт, представленных в формате тканевого микрочипа. Белок VISTA был обнаружен в 99% образцов НМРЛ с преобладающим мембранным/цитоплазматическим окрашиванием. Экспрессию маркера в опухолевых и стромальных клетках наблюдали в 21% и 98% случаев соответственно [179]. Показано, что уровни VISTA были положительно связаны с PD-L1, PD-1, CD8+ Т-клетками и CD68+ макрофагами. Экспрессия VISTA была выше в Т-лимфоцитах, чем в макрофагах, и в цитотоксических Т-клетках, чем в Т-хелперных клетках. Повышенный уровень VISTA был

связан с отсутствием мутаций EGFR и более низкой мутационной нагрузкой в аденокарциномах легких. Наличие VISTA в компартменте опухоли предсказывало более длительную 5-летнюю выживаемость [179].

VISTA и рак поджелудочной железы. Известно, что больные раком поджелудочной железы (РПЖ) имеют плохой прогноз с ограниченными вариантами лечения, а 5-летняя выживаемость составляет менее 7 [66, 113]. При этом клинические исследования сообщают о минимальной клинической пользе в ответ на ингибиторы контрольных точек иммунитета у больных РПЖ [33, 194]. Вместе с тем, недавно одна группа исследователей сообщила об увеличении РПЖ с высокой цитолитической активностью экспрессии нескольких генов иммунных контрольных точек, таких как CTLA4, TIGIT, TIM3 и VISTA [24]. Полагают, что иммунное микроокружение опухоли при РПЖ может позволить разработать эффективные иммунотерапевтические стратегии. Иммунная инфильтрация тканей РПЖ изучена недостаточно, однако в некоторых исследованиях сообщается, что микроокружение опухоли слабо инфильтрировано эффекторными лимфоцитами, но содержит множество иммуносупрессивных клеток, включая супрессорные клетки миелоидного происхождения и регуляторные Т-клетки [172, 180]. Вместе с тем, в публикациях в основном указывают, что РПЖ имеют минимальную инфильтрацию иммунными клетками [79, 180].

J. Blando et al. (2019) выделяют VISTA+ макрофаги как один из потенциальных ингибирующих типов клеток, который может повлиять на клинические исходы у больных РПЖ. Эти авторы обнаружили значительно большее количество макрофагов CD68+ и клеток VISTA+ в области стромы поджелудочной железы по сравнению с иммуноактивной меланомой [28]. Исследователи идентифицировали VISTA как мощную ингибиторную контрольную точку, которая преимущественно экспрессируется на макрофагах CD68+ при протоковом РПЖ. Эти данные позволяют исследователям предположить, что VISTA может быть подходящей иммунотерапевтической мишенью для эффективного лечения больных РПЖ.

Кроме того, дифференциальная экспрессия PD-L1 и VISTA на разных субпопуляциях CD68⁺ позволяют предположить, что PD-L1 и VISTA представляют собой отдельные ингибирующие пути, способные подавлять противоопухолевую активность Т-клеточного ответа при РПЖ.

Используя метод ИГХ проведено исследование экспрессии VISTA и продемонстрирована связь между уровнем экспрессии VISTA и общей выживаемостью у 223 больных протоковым РПЖ из 2 разных несвязанных ретроспективных когорт [204]. Мультиплексная иммунофлуоресценция помогла осветить взаимосвязи между экспрессией VISTA и инфильтрирующими опухоль подкластерами иммунных клеток протокового РПЖ. Авторы полагают, что VISTA, экспрессированная в опухолевых клетках, связана с благоприятным прогнозом при протоковом РПЖ. Более того, иммунотерапия антителами против VISTA потенциально может быть эффективной стратегией лечения протокового РПЖ [204].

VISTA и рак желудка. В работе R. Wang et al. (2020) установили уникальный мутационный ландшафт, изменение числа копий и профиль экспрессии генов КБ-клеток (карциноматоз брюшины) и определили молекулярные подтипы КБ, которые коррелировали с устойчивостью и ответом на терапию. Авторы идентифицировали новые мишени и белки иммунных контрольных точек, в частности VISTA, которые могут быть использованы в онкологической практике [188].

VISTA и колоректальный рак (КРР). В исследовании J. Deng et al. (2019) обнаружили, что VISTA высоко экспрессируется в микроокружении опухоли в моделях опухолей и первичных злокачественных опухолях человека. Это исследование показало, что активность VISTA и HIF-1 α коррелировала в когорте пациентов с КРР. С неблагоприятными показателями общей выживаемости больных КРР достоверно связана экспрессия VISTA. Исследователи использовали модель рака толстой кишки CT26 для исследования регуляции VISTA посредством гипоксии.

VISTA и рак простаты (РП). Исследователи J. Gao et al., (2017) предположили, что VISTA является еще одним компенсаторным тормозным путем в опухолях простаты после терапии ипилимумабом. Идентификация нескольких иммунных контрольных точек, таких как PD-L1 и VISTA, указывает на важность понимания экспрессии этих молекул в микроокружении опухолей для разработки рациональных стратегий комбинированного лечения. Данные статистически свидетельствуют о том, что терапия анти-CTLA-4 может усиливать инфильтрацию иммунных клеток в опухоли, включая РП. Эти данные показывают важность биопсии во время лечения, возможно, после 2 доз терапии, для выявления иммунологических изменений, происходящих в микроокружении опухоли. Исследователи предполагают, что увеличения инфильтрации иммунных клеток может быть недостаточно для генерации противоопухолевого ответа, а блокада других иммунных контрольных точек, таких как PD1/PD-L1 и VISTA, может быть необходимой для обеспечения значительной клинической пользы у больных РП.

В работе J. Gao et al., (2017) исследователи оценивали экспрессию PD-L1 и VISTA в различных подтипах клеток из опухолей простаты до и после лечения и наблюдали значительное увеличение экспрессии PD-L1 на Т-клетках CD4+, Т-клетках CD8+ и макрофагах CD68+. В среднем отмечено увеличение примерно в 3 раза (с 0,2% до 0,7%) экспрессии PD-L1 на Т-лимфоцитах CD4. Также была обнаружена более высокая частота экспрессии VISTA на Т-клетках и макрофагах CD68+ в РП после лечения по сравнению с аналогичными опухолями до лечения. Однако исследователи обнаружили, что макрофаги CD68+ имели значительно более высокую экспрессию VISTA в РП после лечения, с примерно 5-кратной большей экспрессией VISTA на макрофагах CD68+ в РП на основе анализа процента экспрессии. В отличие от PD-L1, не было корреляции между экспрессией VISTA и генами, чувствительными к IFN- γ .

VISTA и плоскоклеточный рак слизистой полости рта (ПКПР).

Целью исследования L. Wu et al. (2017) было профилирование экспрессии, клинической значимости и корреляции VISTA при ПКПР. С помощью ИГХ исследовали уровни экспрессии VISTA, CD8, цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного антигена 4 (CTLA-4), лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1), PI3K α p110, IL13R α 2, фосфо-STAT3 по тирозину 705 (p-STAT3) и маркеры миелоидных супрессорных клеток (MDSC) (CD11b и CD33). Результаты показали, что уровень белка VISTA был значительно выше в образцах ПКПР человека и что экспрессия VISTA в первичных ПКПР коррелировала со статусом лимфатических узлов. Экспрессия VISTA не служила независимым предиктором плохого прогноза, в то время как подгруппа пациентов с высокой экспрессией VISTA и низкой экспрессией CD8 (22/165) имела значительно более низкую общую выживаемость по сравнению с другими подгруппами на основе многофакторного анализа и анализа рисков Кокса среди первичных пациентов с ПКПР в настоящей когорте. Кроме того, экспрессия VISTA статистически значимо коррелировала с PD-L1, CTLA-4, IL13R α 2, PI3K, p-STAT3, CD11b и CD33. Эти данные показывают, что VISTA может быть потенциальной иммунотерапевтической мишенью при лечении ПКПР.

Y. Kondo et al. (2016) изучали эффекты монотерапии анти-VISTA моАТ и комбинированной терапии с блокаторами CTLA-4 или PD-1 на экспериментальной модели плоскоклеточного рака (SCCVII). При этом, монотерапия VISTA не показала явной регрессии роста опухоли, но эффективно индуцировала активацию CD8⁺ Т-клеток, превращая покоящиеся и истощенные клетки в функциональные эффекторные клетки. Кроме того, монотерапия VISTA не ингибировала рекрутирование регуляторных Т-клеток (Tregs) в микроокружении опухоли (TME). В качестве дополнительного лечения анти-VISTA, блокада CTLA-4, но не блокада PD-1, вызывала дальнейшую регрессию опухоли. Комбинация CTLA4 и VISTA эффективно ингибировала рекрутирование Treg и повышала

соотношение как CD8 T/Treg и CD4 обычный T (Tcon)/Treg в микроокружении опухоли, тогда как комбинация PD-1 и VISTA резко увеличила рекрутирование CD8+ T-клеток, рекрутирующих опухоль, но заметно снизила отношение Tcon/Treg. Полученные авторами результаты демонстрируют тот факт, что блокада VISTA эффективно превращает CD8+ T-клетки в функциональные эффекторные T-клетки, но недостаточна для регрессии опухолевого роста ввиду слабой супрессии Treg в микроокружении опухоли [97]. Эти данные показывают, что комбинированная блокада CTLA-4 и VISTA более эффективна, чем комбинированная блокада PD-1 и VISTA для таких опухолей как плоскоклеточный рак головы и шеи, при которых Treg-опосредованная иммунная регуляция является доминирующей.

VISTA и острый миелолейкоз (ОМЛ). Чтобы определить участие VISTA в патогенезе острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), L. Wang et al. (2018) исследовали мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), собранные у 30 пациентов впервые диагностированным ОМЛ с помощью проточной цитометрии. Исследователи наблюдали высокую экспрессию VISTA на моноцитах (с гейтом на CD45+ CD11b+ CD14 hi / lo) и бластах миелоидного лейкоза (с гейтом на CD45 int, CD45). Несмотря на высокую гетерогенность в когорте, большинство пациентов имели значительный уровень VISTA на своих МКПК (средняя частота 54,26±5,016). Следует отметить что, когда оценка была распространена на T-клетки, ученые обнаружили минимальную экспрессию VISTA на CD8, CD4 или регуляторных T-клетках (Treg) у пациентов с ОМЛ.

Следует отметить, что значительную экспрессию VISTA наблюдали на лейкозных бластах у пациентов с ОМЛ. Во многих моделях солидного рака VISTA был обнаружен только на лейкоцитах в микроокружении опухоли, но не на опухолевых клетках. Однако в недавнем исследовании клинических образцов большой группы больных раком желудка экспрессию VISTA в опухолевых клетках наблюдали у небольшой части (41/464, 8,8%) пациентов.

Экспрессия VISTA была исключительно цитоплазматической в опухолевых клетках. В проведенном нами исследовании обнаружена значительная поверхностная экспрессия VISTA на циркулирующих лейкозных клетках периферической крови пациентов с ОМЛ. Это может быть связано с миелоидным происхождением ОМЛ, поскольку VISTA высоко экспрессируется на миелоидных клетках. Требуются дальнейшие исследования, чтобы определить, влияет ли экспрессия VISTA на лейкозных клетках на другие иммунные компоненты в микроокружении опухоли и способствует ли прогрессию опухоли. В недавнем исследовании с использованием мышиной модели ОМЛ, когда мышиные миелоидные лейкозные клетки, экспрессирующие PD-1H (VISTA), вводили мышам дикого типа по сравнению с мышами с нокаутом PD-1H, рост лейкемии *in vivo* снижался при нокауте PD-1H из лабораторных животных. Рост лейкемии дополнительно замедлялся блокирующими PD-1H антителами.

VISTA и рак молочной железы (РМЖ). Во всем мире РМЖ является одним из наиболее часто диагностируемых видов рака у женщин [49]. Текущие основные методы лечения РМЖ включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, гормонотерапию и таргетную терапию. Эти методы лечения мало эффективны при всех типах РМЖ из-за множества механизмов резистентности и токсичности. С другой стороны, иммунотерапия рефрактерного РМЖ, особенно на поздней стадии и тройного негативного РМЖ (ТНРМЖ), стала многообещающей стратегией [199].

При РМЖ наблюдается значительная неоднородность состава иммунных клеток среди подтипов опухолей и пациентов. Препарат на основе антител против PD-L1 TECENTRIQ (атезолизумаб) был недавно одобрен FDA в комбинации с химиотерапевтическим препаратом Абрахане для лечения местнораспространенного или метастатического тройного негативного РМЖ. Это первый иммунотерапевтический препарат, одобренный для лечения РМЖ [161].

В исследовании X. Xie et al. (2020) использовали анализ РНК-seq (scRNA-seq) единичных клеток для изучения экспрессии иммунных контрольных точек VISTA, PD-1, PD-L1, TIGIT, TIM3, LAG3 в подмножествах иммунных клеток в РМЖ человека. Исследователи обнаружили повышенную экспрессию VISTA в клетках РМЖ, чем в нормальной ткани.

VISTA и глиома. Исследования иммунной контрольной точки в глиомах немногочисленны. Доклинические исследования на лабораторных животных показало, что VISTA-дефицитные лабораторные животные обладают высокой устойчивостью к индукции опухоли на модели глиомы головного мозга мышей, а истощение CD4⁺ Т-клеток, но не CD8⁺ Т-клеток, способствовало образованию опухоли [64]. Используя полученные данные можно предположить, что VISTA может иметь потенциальную иммуномодулирующую роль также в ЦНС [166].

VISTA и почечно-клеточный рак (ПКР). Несмотря на ограниченное количество исследований VISTA при ПКР, имеющиеся данные подтверждают ингибирующую роль VISTA в его иммунной среде. Клинические и патологические характеристики пациентов с ПКР, включенные в различные исследования, показали, что VISTA преимущественно экспрессируется в клетках CD45⁺ в параопухолевых и опухолевых тканях. VISTA экспрессируется в кроветворных тканях и высоко экспрессируется в миелоидном компартменте [81, 118]. Обнаружили, что Т-клетки, поступающие от пациентов с ПКР, активируются после связывания слитого белка VISTA-Fc с поверхностными рецепторами Fc [144]. В другом исследовании. Обнаружили высокую распространенность экспрессии VISTA в светлоклеточном ПКР как на уровне мРНК, так и на уровне белка [81]. Авторы также обнаружили, что макрофаги CD14⁺ HLA-DR⁺ в опухолях экспрессируют более высокие уровни VISTA. Взаимосвязь между экспрессией VISTA и CD8⁺ Т-клеточными ответами, выявленная в

исследовании, подчеркнула, что VISTA может подавлять опухолевый иммунитет [166]

1.5. Растворимая форма VISTA (sVISTA)

В последнее время, большое внимание исследователей привлекают растворимые формы белков контрольных точек иммунитета.

Исследование экспрессии маркеров растворимых форм ключевой точки иммунитета PD-1/PD-L1 у больных опухолями костей только начинается и представлено единичными публикациями. А. Costantini et al. (2018) в своей работе показали, что высокий уровень sPD-L1 через два месяца после лечения ниволумабом, ассоциирован с плохим ответом на проводимое лечение [51]. Кроме того, авторы не выявили ассоциации между уровнями sPD-L1 в сыворотке крови с уровнем экспрессии PD-L1 в опухоли.

Показано, что помимо экспрессии КТИ непосредственно в опухоли, можно исследовать растворимые формы 31 контрольной точки иммунитета, в том числе и VISTA, в сыворотке крови, что проведено у 123 больных метастатическим немелкоклеточным раком легкого [134]. Для немелкоклеточного рака легкого высокое содержание sVISTA в сыворотке крови ассоциировано с благоприятным прогнозом заболевания. Исследований, посвященных растворимой форме VISTA при других солидных опухолях на данный момент не опубликовано.

1.6. Основные направления исследований иммунотерапии опухолей в клинике.

Первое поколение ингибиторов ИКТ (анти-CTLA-4 и анти-PD-1/PD-L1) было нацелено на пути естественного иммунного гомеостаза для управления противоопухолевым иммунным ответом [39]. Эти лекарственные препараты привели к беспрецедентным результатам у пациентов с ранее неизлечимым метастатическим заболеванием, некоторые из них стали терапией первой линии при запущенных формах рака. Однако эти препараты эффективны только у небольшого числа пациентов. Становятся доступными новые стратегии, нацеленные на дополнительные иммуномодулирующие

механизмы для активации собственных противоопухолевых иммунных реакций пациентов. В последние годы появились новые мишени иммунотерапии с заявленной доклинической эффективностью, некоторые из них перешли к активным исследованиям в клинической практике. Эти новые мишени включают коингибирующие и костимулирующие маркеры врожденной и адаптивной иммунной системы:

1) маркеры Т-лимфоцитов: ген 3 активации лимфоцитов [LAG-3], молекула 3, содержащая Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен [TIM-3], содержащий V-домен Ig-супрессор Т активация клеток [VISTA], Т-клеточный иммуноглобулин и домен ITIM [TIGIT], B7-H3, индуцибельный костимулятор Т-клеток [ICOS/ICOS-L], CD27/CD70 и глюкокортикоид-индуцируемый рецептор TNF [GITR];

2) маркеры макрофагов: CD47/Signal-Regulatory Protein alpha [SIRP α] и индоламин-2,3-диоксигеназа [IDO];

3) маркеры естественных клеток-киллеров: CD94/NKG2A и семейство киллерных иммуноглобулиноподобных рецепторов [KIR].

Также разрабатывают комбинированные стратегии из выше указанных мишеней и потенциальные биомаркеры ответа и устойчивости к этим иммунотерапевтическим лекарственным препаратам в лечении онкологических заболеваний [39].

Представим некоторые исследования контрольных точек иммунитет в терапии опухолей костей. Так, в работе С.Т. Chang et al. (2022) исследовали охарактеризовали 45 клинических образцов хордомы основания черепа с помощью иммуногистохимии для экспрессии шести CAR-мишеней (PD-L1, B7-H3, B7-H4, VISTA, HER2, HER3). При этом авторы создали CAR-T-клетки, нацеленные на B7-H3, и оценили их противоопухолевую активность *in vitro*. В результате авторы обнаружили, что B7-H3 был положительно окрашен в 7 из 45 (16%) хордом и установили иерархию экспрессии для этих антигенов (B7-H3 > HER3 > PDL1 > HER2 = VISTA = B7-H4), после чего создали вектор CAR, нацеленный на B7-H3, и продемонстрировали, что B7-

НЗ-CAR-T-клетки распознают антиген-положительные клетки и проявляют значительные противоопухолевые эффекты, включая подавление образования опухолевых сфероидов, CAR-T-клеток активации и секреции цитокинов. Полученные результаты подтверждают, что B7-НЗ может служить многообещающей мишенью для CAR-T-клеток в терапии хордом.

Следует отметить, что в настоящее время в литературе представлены единичные исследования, в которых использовали геномные данные пациентов для прогнозирования анти-VISTA терапии. Так, было проведено несколько исследований, в которых изучали экспрессию генов на небольших когортах пациентов до лечения с целью идентификации геномных особенностей связанных с реакцией на анти-CTLA-4 и анти-PD-1 терапию. В исследовании ответа на блокаду CTLA-4, секвенирование всего экзона было выполнено на 110 до лечения биопсиях меланом и соответствующих им образцах ткани зародышевой линии. В добавок к этому, данные RNAseq были получены из 40 таких биопсий, что позволило получить всесторонние геномные данные для небольшой группы пациентов. Это исследование показало, что использование нескольких методов, позволяет выявить мутации и количество неоантигенов, с пользой для лечения пациентов ипилимумабом. Кроме того, с помощью анализа экспрессии генов авторы обнаружили, что экспрессия цитолитических генов, указывающих на цитотоксическую клеточную инфильтрацию, также была связана с улучшенным ответом на ипилимумаб у этих пациентов [176].

Аналогичные исследования были проведены для изучения геномных корреляций с ответом на анти-PD-1 терапию. В одном анализе изучали взаимосвязь между наличием мутаций и ответом на пембролизумаб при НМРЛ. Исследователи обнаружили, что более высокая мутационная нагрузка была связана с лучшей выживаемостью пациентов с НМРЛ без прогрессирования и чувствительностью к терапии [154]. В более позднем исследовании, посвященном меланоме, секвенирование всего экзона было выполнено на коллекции из 38 опухолей до лечения или в начале терапии, и

из них у 27 была собрана информация о секвенировании РНК. Однако это исследование не нашло взаимосвязи между мутационной нагрузкой и улучшенным ответом анти-PD-1. Вместе с тем, клинический эффект был связан с мутациями в гене репарации ДНК *BRCА2*. Кроме того, было показано, что гены, участвующие в эпителиально-мезенхимальном переходе, ангиогенезе и Т-клеточной супрессии, были более выражены в неответной группе по сравнению с группой отреагировавшей на лечение [85].

В дополнение к этим исследованиям проведено последующее исследование для изучения влияния внутриопухолевой гетерогенности неоантигена на иммунный ответ опухоли, в котором обнаружили, используя упомянутые выше наборы данных анти-PD-1 как при НМРЛ и анти-CTLA-4 при меланоме, что клональная неоантигенная нагрузка связана с общей выживаемостью и реакцией на блокаду CTLA-4 и PD-1 при меланоме и НМРЛ соответственно [129]. Этот анализ демонстрирует сложный иммунный ответ опухоли и его роль в чувствительности к иммунотерапии. Однако геномные данные, полученные от небольших когорт пациентов, включенных в исследование, привело к важным выводам, которые нельзя было получить другими методами.

Вместе эти анализы показывают потенциал использования геномных данных пациентов для идентификации биомаркеров ответа на иммунотерапию. Интересно, что было большое количество расхождений между каждым из исследований, демонстрирующее необходимость дополнительного набора данных по иммунотерапии, охватывающих большее количество пациентов. Различия между геномными коррелятами, связанные с блокадой анти-PD-1 и анти-CTLA4 предполагает, что ответ на каждый тип иммунотерапии может зависеть от уникальных молекулярных механизмов. В будущем аналогичные исследования анти-VISTA могут дать больше информации о молекулярных механизмах, участвующих в анти-VISTA ответе, а также прогностических биомаркеров, которые можно будет

использовать для выявления пациентов с наибольшей вероятностью реагирования на лекарственный препарат.

Таким образом, благодаря изучению регуляторов негативных контрольных точек CTLA-4, PD-1 и PD-L1 при лечении злокачественных опухолей, внимание исследователей было обращено на все это семейство молекул. VISTA имеет несколько уникальных особенностей, которые предполагают, что он работает без резервирования по отношению к PD-1. Как следствие, терапевтическое лечение антителами, нацеленными на VISTA, может быть полезным не только при монотерапии, но и в сочетании с другими методами лечения. Также необходимы дальнейшие исследования, чтобы помочь идентифицировать генетические сигнатуры, которые смогут обеспечить понимание механизма действия терапии и выявление пациентов, которые с наибольшей вероятностью ответят на лечение.

1.7. Система RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей.

Интерес к системе RANK/RANKL/OPG связан с ее участием в регуляции дифференцировки остеокластов и остеоллизе [56]. Система представляет собой рецептор-активатор ядерного транскрипционного фактора NF-κB (receptor activator of NF-κB – RANK), и C-концевой участок – одного из крупнейших цитоплазматических доменов TNFRSF (суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей).

Лиганд Рецептор RANK принадлежит к семейству TNF и представляет собой трансмембранный белок II типа.

Доказано, что RANK кодируется геном *TNFRSF11A*, мутации которого поражают сигнальный пептидный участок RANK, что приводит к усилению сигнальной функции рецептора. Обнаружено, что эта активирующая мутация проявляется при следующих патологических состояниях: 1) ранняя костная болезнь Педжета (PDB2), которая характеризуется поражением скелета [193]; 2) экспансивная (расширяющаяся) скелетная гиперфосфатемия, характеризующаяся ранними

дефектами развития зубов; 3) семейный экспансивный остеолит – проявляющийся с раннего детства с нарушениями слуха.

По данным D. Santini et al. (2010), H.K. Choi et al. (2013) обнаружено большое количество сигналов, способствующих остеокластогенезу и нарушающих баланс системы RANK/RANKL.

Выявлено, что усиление продукции RANKL остеобластами могут вызывать ряд цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, а также TNF α и простагландин E [88, 108].

Повышенная экспрессия и/или сигнальная активность RANKL была выявлена при РМЖ, раке простаты [71], почки [137], множественной миеломе [192], немелкоклеточном раке легкого [213] и некоторых других солидных опухолях [88, 159]

J.M. Brown et al. (2004) показали активацию остеокластогенеза в ответ на экспрессию RANKL в клетках опухоли. Представление о том, что система RANK/RANKL играет существенную роль в формировании костных метастазов опухолей, основано на данных об активации MMP-1, MMP-9, ICAM-1, IL-6, IL-8, VEGF под влиянием RANKL у больных РМЖ [100, 157]. Об участии данной системы в формировании первичных опухолей костей известно крайне мало.

Система RANK/RANKL/OPG в первичных опухолях костей (экспериментальные исследования).

В модельных опытах на модели линии U-2 клеток саркомы не было выявлено экспрессии RANK, в то время как она была обнаружена в линиях человеческой остеосаркомы MNNG/HOS, Saos-2 и MG-63 [139]. Влияние RANKL на экспрессию более, чем 60 генов, ответственных за обмен костной ткани было показано на линии Saos-2 [139].

В работе J.A. Lee et al. (2011) показано, что высокие уровни экспрессии RANKL в опухоли связаны с низкой чувствительностью остеосарком к химиотерапии и низкими показателями 5-летней выживаемости [114].

В экспериментальных моделях показано, что остеопротегерин снижал рост клеток остеосаркомы, причем эти клетки экспрессировали RANKL [140], а ингибиторы RANKL - малые интерферирующие РНК (Rkl-siRNA) также влияли на эту систему [156].

C.J. Hsu et al. (2010) выявили повышение экспрессия RANKL и RANK в хондросаркомах больных, по сравнению с нормальной тканью. Кроме того, эксперименты обнаружили увеличение экспрессии интегрин- β 1 на клетках JJ012 хондросаркомы человека и их активную миграцию под воздействием RANKL [82]. Взаимосвязь активации RANK/RANKL и ERK/MEK сигнальных путей продемонстрирована также на культуре клеток хондросаркомы SW1353, стимулированной IL-1 β [189].

R. Taylor et al. (2011) выявили способность клеток саркомы Юинга экспрессировать основные остеокластогенные факторы RANKL и M-CSF.

D.W. Pelle et al. (2014) обнаружили повышенную экспрессию RANKL, остеопротегерина и RANK также в доброкачественных новообразованиях кости.

Сложную задачу представляет собой лечение пациентов с пограничной гигантоклеточной опухолью в связи с ее выраженными остеокластогенными свойствами. Клетки этой опухоли, фактически реактивные макрофаги, под влиянием стромальных клеток экспрессируют RANK, активируемый RANKL, в связи с чем перспективным становится подход к лечению данной категории больных антагонистами RANKL [123, 126, 164, 174].

Компоненты системы RANK/RANKL в периферической крови больных новообразованиями костей. Следует отметить, что уровни компонентов системы RANK/RANKL не всегда отражают уровни экспрессии этих белков в опухоли. Еще меньше известно о роли циркулирующих в периферической крови растворимых форм sRANK и sRANKL. Эти исследования имеют ряд методологических особенностей [62, 74], при этом пол, возраст, репродуктивный статус женщин влияют на сывороточные уровни RANKL [132].

Таким образом, сывороточные уровни компонентов системы RANK/RANKL не всегда полностью обусловлены поступлением соответствующего белка из опухолевых клеток [62, 182].

Система RANK/RANKL как мишень противоопухолевой терапии

В течение многих лет при различных патологиях предпринимаются попытки лечения ингибиторами системы RANK/RANKL для подавления остеокластогенеза и остеолиза. J.J. Body et al. (2003) были одними из первых, кто применил с эффектом антагонист RANKL (рекомбинантный остеопротегерин - Fc-OPG, Amgen) у пациентов с миеломой и РМЖ [29]. Несколько позже и более эффективным оказался денозумаб (гуманизированное моноклональное антитело к RANKL), связывающий лиганд с высоким сродством и специфичностью [38]. В последующем с высоким эффектом (более 90% снижается количество гигантских клеток) денозумабом стали лечить больных гигантоклеточной опухолью кости [34]. Относительно недавно начали использовать ингибиторы системы RANK/RANKL в лечении хордом [110], а также ряда доброкачественных поражений костей [148]. В литературе представлены результаты успешного лечения нерезектабельной остеобласто-подобной остеосаркомы денозумабом в сочетании с сорафенибом [44].

Таким образом, представленные в обзоре данные отечественной и зарубежной литературы свидетельствуют о том, контрольную точку иммунитета VISTA следует считать важной мишенью для изучения при различных опухолях человека. Исследования растворимой формы sVISTA в крови только в настоящее время начинают активно исследовать при различных онкологических заболеваниях. Вместе с тем авторами получены первые данные об участии маркера в механизмах опухолей трансформации, ее роли в прогрессии и оценке прогноза заболевания. Проводятся попытки разработки ингибиторов VISTA при онкологических заболеваниях, однако до конца не изучен механизм действия этого белка на рост, пролиферацию, апоптоз, инвазивную способность, а также микробиоту опухолей. До конца

не исследована роль этого маркера в оценке прогноза различных злокачественных солидных новообразований. Все это открывает перед онкологами новые направления исследований для успешной своевременной диагностики опухолей, выбора более эффективных лекарственных методов терапии и оценки прогноза заболеваний.

ГЛАВА II.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общие данные о группах больных и контроля.

В исследование включено 112 больных злокачественными новообразованиями (саркомами) костей в возрасте от 6 до 73 лет, 13 больных пограничными новообразованиями костей (гигантоклеточная опухоль) в возрасте от 24 до 43 лет.

Группу контроля составили 42 практически здоровых донора в возрасте от 6 по 76 лет (рисунок 1). Все доноры проходили обследование, а пациенты лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с сентября 2017 г. по ноябрь 2021 г.

Диагноз новообразования кости у всех больным подтвержден данными гистологического исследования опухоли, согласно Международной гистологической классификации опухолей костей (ВОЗ, 2014).



Рисунок 1. Распределение обследованных здоровых доноров и больных опухолями костей по основным группам.

2.2. Общая характеристика обследованных больных новообразованиями костей и здоровых доноров.

В таблице 1 представлено распределение обследованных здоровых доноров и больных новообразованиями костей.

Таблица 1.

Распределение здоровых доноров и больных новообразованиями костей с учетом пола и возраста

Группы	N	Пол		Возраст, лет M±m	Частота выявления ≤ 18 лет
		Муж.	Жен.		
Контроль	42	19 (45,2%)	23 (54,8%)	30,0±1,52	13 (30,9%)
Больные пограничными опухолями кости	13	7 (53,9%)	6 (46,1%)	32,0±1,8	-
Больные злокачественными новообразованиями костей	112	63 (56,2%)	49 (43,8%)	32,9±1,7	28 (25,0%)
P		>0,05		>0,05	-

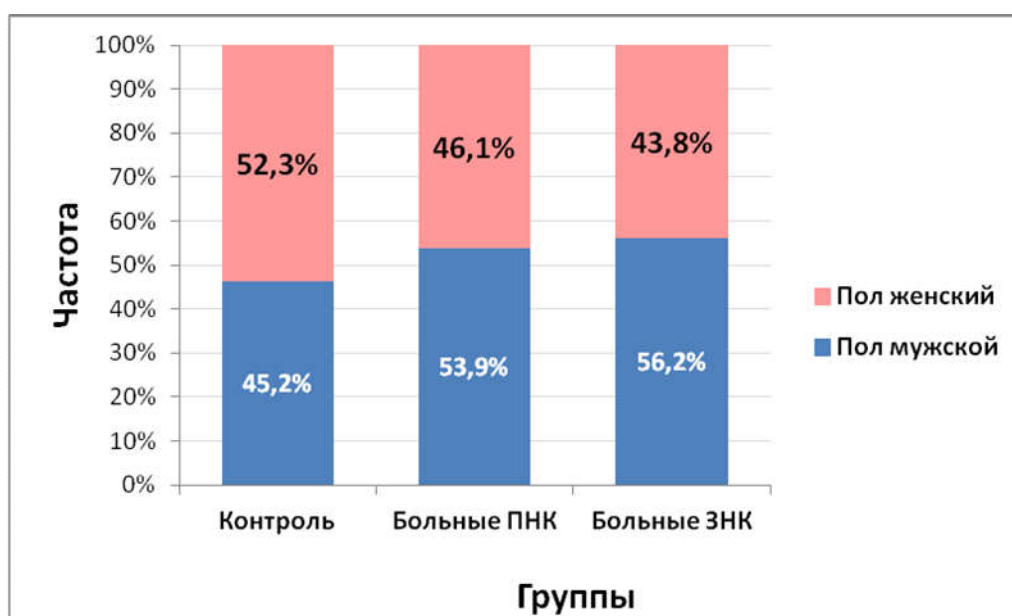


Рисунок 2. Распределение обследованных доноров, больных пограничными и злокачественными новообразованиями костей с учетом пола.

Как следует из данных таблицы 1 и рисунка 2. группы обследованных больных новообразованиями костей и доноров не различались по полу и возрасту ($p>0,05$).

В таблице 2 представлены данные распределения больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли, пола и возраста.

Таблица 2.

Распределение больных новообразованиями костей по полу и возрасту

Группы	N	Пол		Возраст, лет M±m	Частота ≤18 лет
		Муж.	Жен.		
Гигантоклеточная опухоль кости	13 (10,4%)	7 (53,9%)	6 (46,1%)	32,0±1,8	-
Хордома	14 (11,2%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)	53,9±4,1	-
Типичная ХС	30 (24,0%)	14 (46,7%)	16 (53,3%)	42,6±2,2	-
Типичная ОС	51 (40,8%)	29 (56,9%)	22 (43,1%)	26,5±2,0	17 (33,3%)
Саркома Юинга	15 (12,0%)	11 (73,3%)	4 (26,7%)	14,7±1,5	11 (73,3%)
Атипичная ХС	1 (0,8%)	1	-	23,0*	-
Атипичная ОС	1 (0,8%)	-	1	62,0*	-
P		>0,05		<0,0001	-

Примечание: *абсолютное значение.

На рисунке 3 более наглядно представлено распределение больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли.

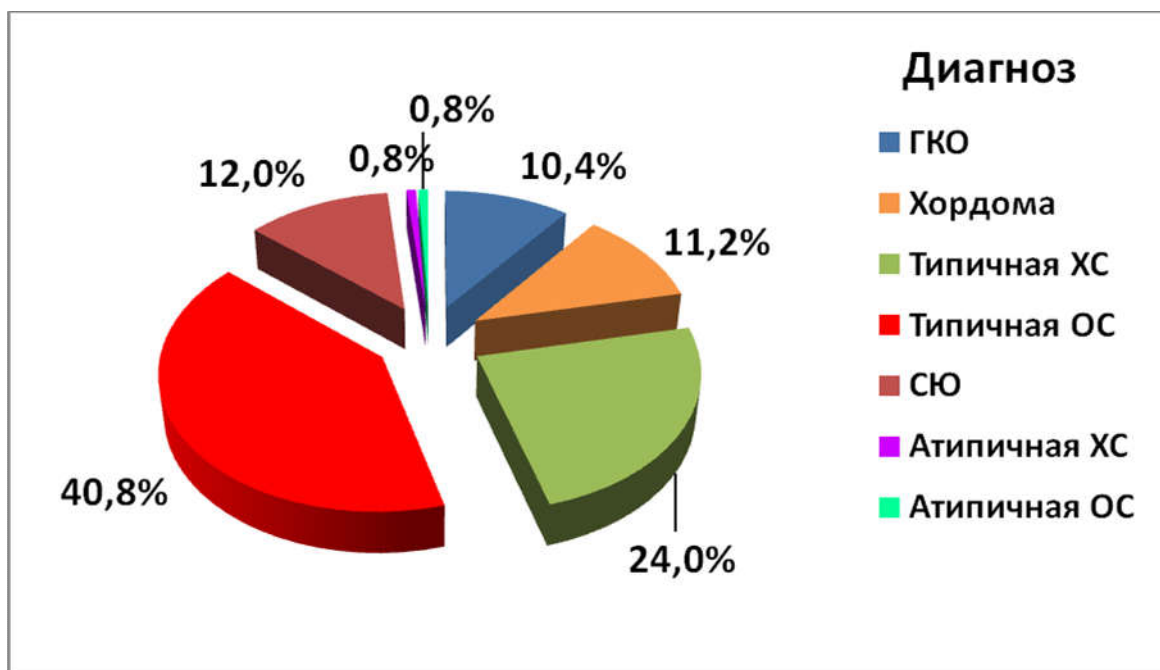


Рисунок 3. Распределение больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли.

В большинстве групп с различным гистологическим вариантом строения новообразования костей соотношение пациентов мужского и женского полов было сопоставимо, исключение - группа больных саркомой Юинга, которая почти в 3 раза чаще представлена пациентами мужского пола (73,3%) против 26,7% - женского пола (рисунок 4).

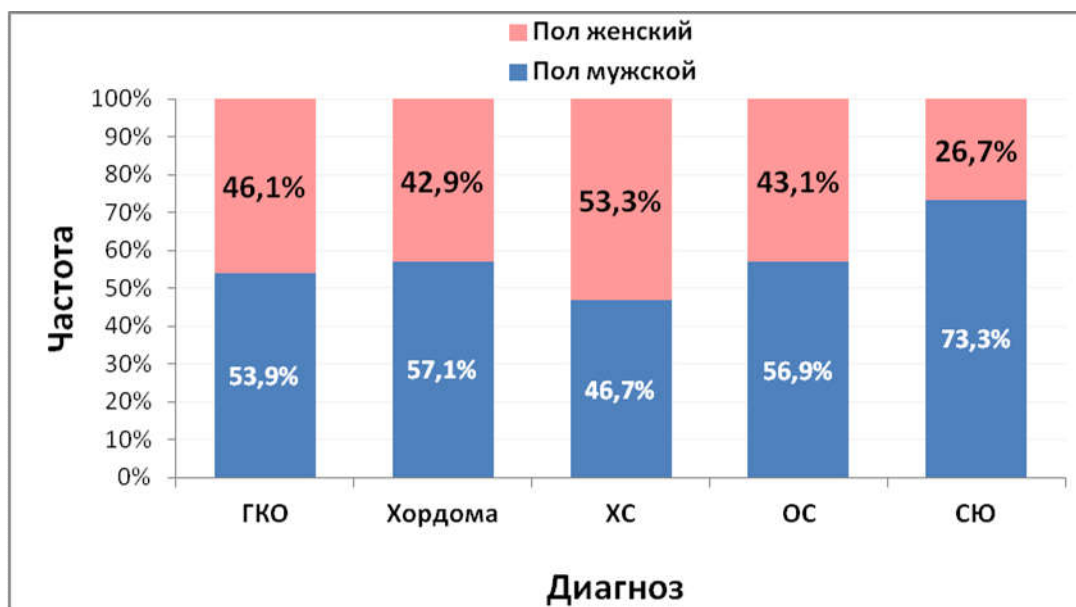


Рисунок 4. Распределение больных новообразованиями костей с учетом пола пациентов и гистологического строения опухоли.

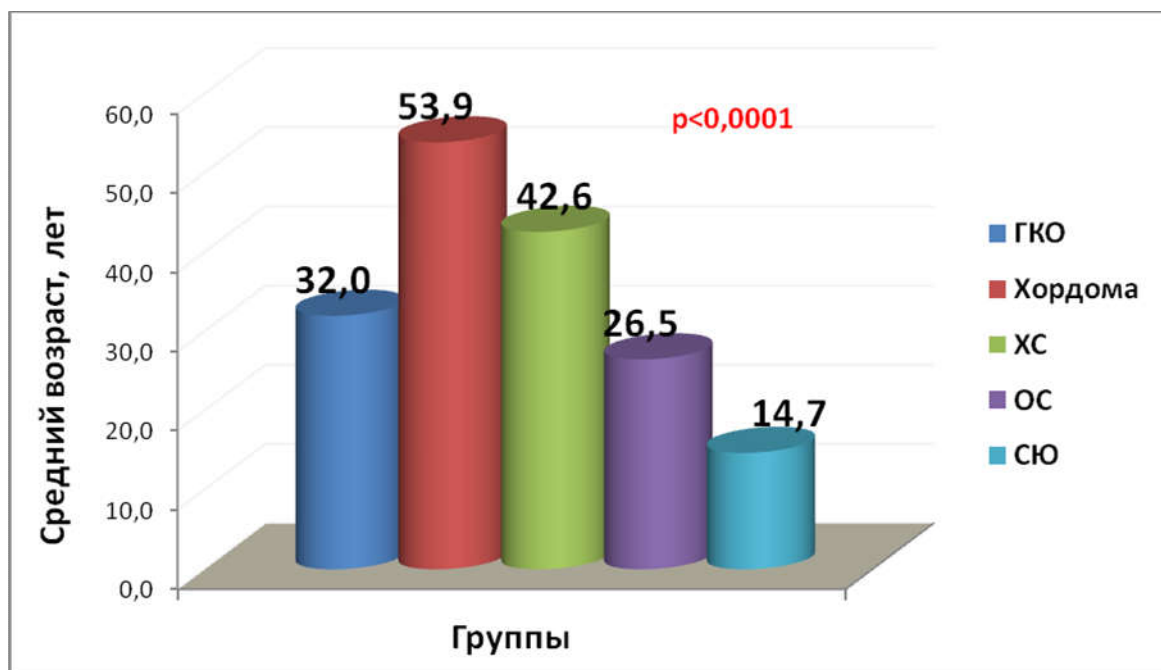


Рисунок 5. Средний возраст больных новообразованиями костей в зависимости от гистологического строения опухоли.

На рисунке 5 представлены показатели среднего возраста больных различными гистологическими вариантами опухолей костей. Следует отметить, различие среднего возраста между группами больных новообразованиями костей ($p < 0,0001$). Так, средний возраст больных саркомой Юинга равнялся $14,7 \pm 1,5$ лет, а частота пациентов, не достигших взрослого возраста составила 73,3%. В группе больных типичной остеосаркомой также средний возраст был ниже, чем в других группах ($26,5 \pm 2,0$ лет), а частота пациентов, не достигших взрослого возраста составила 33,3%. Заметно старше были пациенты с хордомой ($53,9 \pm 4,1$ лет) и типичной хондросаркомой ($42,6 \pm 2,2$ лет) кости. Средний возраст больных пограничной гигантоклеточной опухолью кости составил $32,0 \pm 1,8$ лет (рисунок 5).

В таблице 3 представлены данные распределения больных новообразованиями костей с учетом их гистологического строения и локализации в костях скелета.

Таблица 3.

Распределение больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения и локализации опухоли в костях скелета

Группы	N	Локализация опухоли Частота абс., (отн.)				
		Кости таза	Нижняя конечность	Грудная клетка	Верхняя конечность	Голова
Гигантоклеточная опухоль кости	13	-	11 (84,6%)	-	2 (15,4%)	-
Хордома	14	14 (100%)	-	-	-	-
Типичная ХС	30	12 (40,0%)	7 (23,3%)	4 (13,3%)	7 (23,3%)	-
Типичная ОС	51	9 (17,7%)	34 (66,7%)	3 (5,9%)	4 (7,8%)	1 (2,0%)
Саркома Юинга	15	3 (20,0%)	8 (53,3%)	1 (6,7%)	3 (20,0%)	-
Атипичная ХС	1	-	-	-	1	-
Атипичная ОС	1	-	1	-	-	-
Всего	125	38 (30,4%)	61 (48,8%)	8 (6,4%)	17 (13,6%)	1 (0,8%)
P		<0,0001				

Преобладали больные с локализацией опухоли в костях нижних конечностей (48,8%) и таза (30,4%) (рисунок 6).

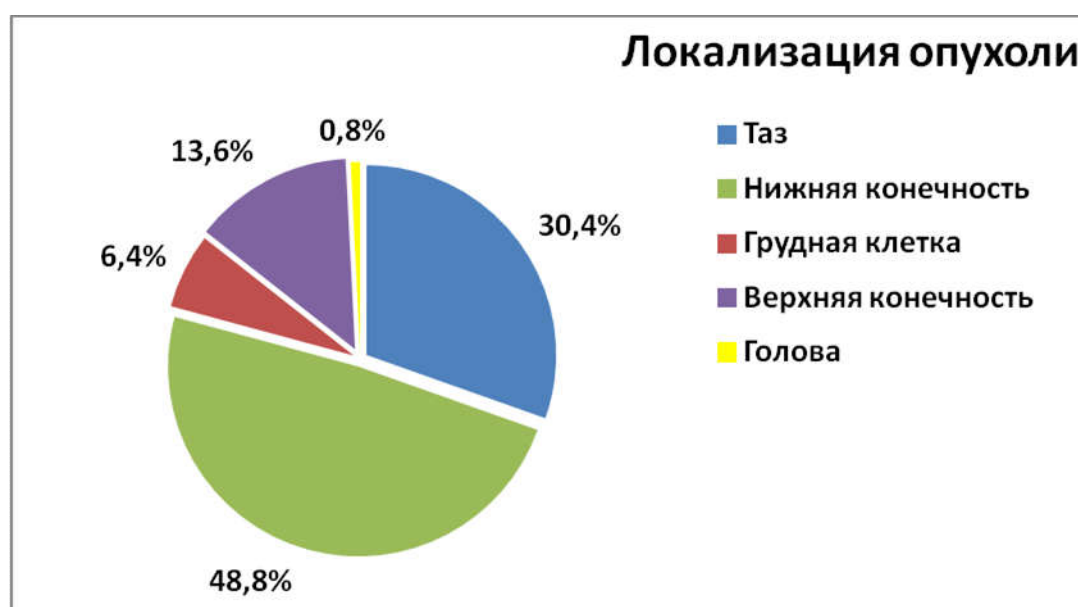


Рисунок 6. Частота выявления злокачественных опухолей в костях скелета.

В группе больных пограничной гигантоклеточной опухолью кости преобладали пациенты с локализацией опухоли в нижних конечностях (84,6%). У всех больных хордомой опухоль локализовалась в костях таза (100%). В группе больных типичной хондросаркомой кости несколько чаще опухоль локализовалась в костях таза (40%). Типичная остеосаркома заметно чаще локализовалась в костях нижних конечностей (66,7%), как и в группе больных саркомой Юинга (53,3%) (рисунок 7).

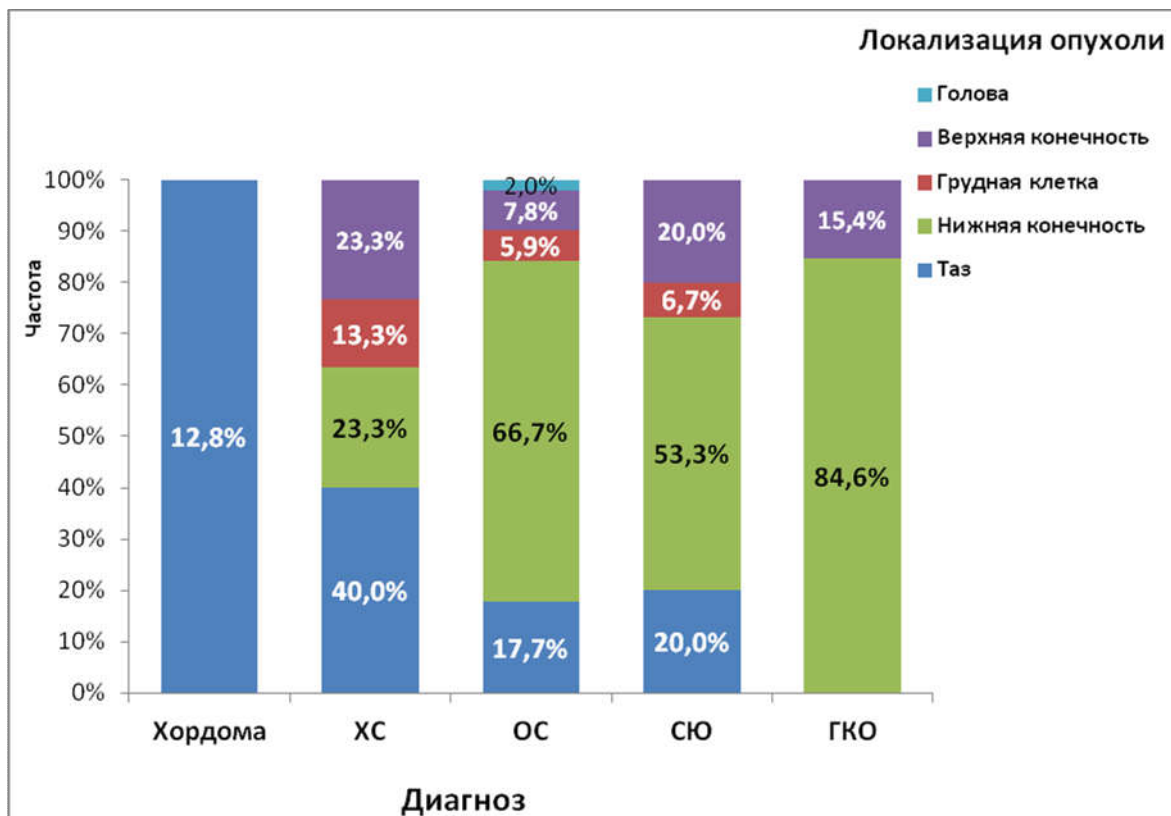


Рисунок 7. Частота выявления различных гистологических вариантов опухолей в различных отделах костей скелета.

В таблице 4 представлены данные распределения больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения и вида пораженной опухолью кости.

Таблица 4.

Распределение больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли и вида пораженной кости

Пораженные опухолью кости	N	Гистологические варианты опухолей костей				
		Частота абс., (отн.)				
		ГКО n=13	Хордома n=14	Типичная ХС n=30	Типичная ОС n=51	СЮ n=15
Крестец	16	-	14 (100%)	1 (3,3%)	1 (2,0%)	-
Большеберцовая	16	3 (23,1%)	-	2 (6,7%)	7 (13,7%)	3 (20,0%)
Бедренная	42	8 (61,5%)	-	5 (16,7%)	25 (49,0%)	4 (26,7%)
Подвздошная	17	-	-	8 (26,6%)	8 (15,7%)	1 (6,7%)
Ребро	7	-	-	3 (10,0%)	3 (5,9%)	1 (6,7%)
Плечевая кость	14	1 (7,7%)	-	5 (16,7%)	4 (7,8%)	3 (20,0%)
Лучевая кость	2	1 (7,7%)	-	1 (3,3%)	-	-
Позвонок	1	-	-	1 (3,3%)	-	-
Лонная кость	3	-	-	3 (10,0%)	-	-
Лопатка	1	-	-	1 (3,3%)	-	-
Крестцово-подвздошное сочленение	1	-	-	1 (3,3%)	-	-
Малоберцовая кость	4	-	-	-	2 (3,9%)	2 (13,4%)
Лобковая кость	1	-	-	-	-	1 (6,7%)
Челюстная кость	1	-	-	-	1 (2,0%)	-
P		<0,0001				

Примечание: 1 наблюдение атипичной ХС с поражением плечевой кости, 1 наблюдение атипичной ОС с поражением большеберцовой кости.

Таким образом, исходя из данных рисунка 8. преобладали пациенты с поражением бедренной кости (42/33,6%).

В группе больных гигантоклеточной опухолью кости преобладали пациенты с опухолевым поражением бедренной кости (61,5%). В группе больных хордомой все 14 пациентов были с опухолевым поражением крестца. В группе больных типичной хондросаркомой наиболее часто выявлено поражение подвздошной кости (26,6%), а также бедренной и плечевой костей (по 16,7%). В группе больных типичной остеосаркомой около половины (49%) пациентов были с поражением бедренной кости. В группе больных саркомой Юинга наиболее часто выявляли поражение бедренной (26,7%), а также плечевой и большеберцовой костей (по 20%) (рисунок 9). Частота поражения злокачественными и пограничными опухолями костей скелета высокозначимо различалась.

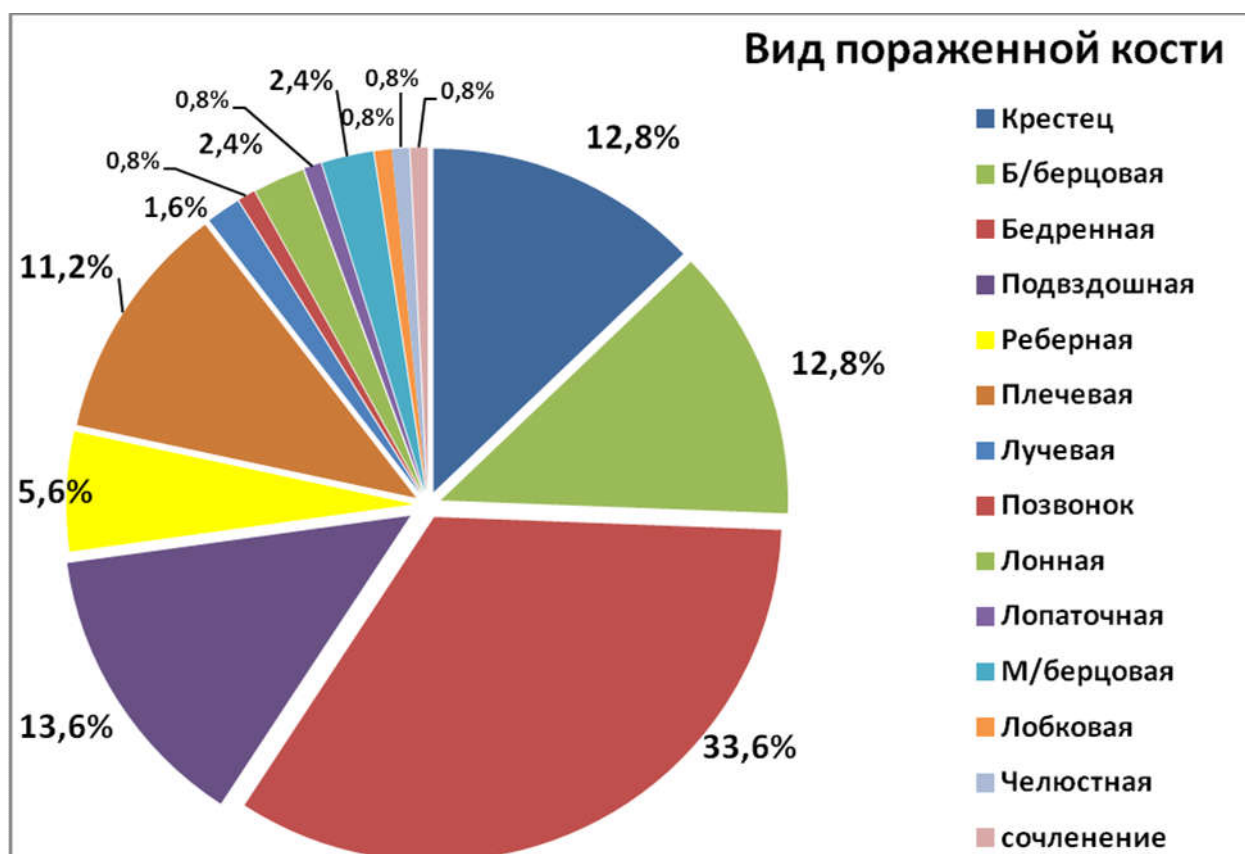


Рисунок 8. Распределение больных новообразованиями костей по виду пораженной кости.

В группе больных гигантоклеточной опухолью кости преобладали пациенты с опухолевым поражением бедренной кости (61,5%). В группе больных хордомой все 14 пациентов были с опухолевым поражением крестца. В группе больных типичной хондросаркомой наиболее часто выявлено поражение подвздошной кости (26,6%), а также бедренной и плечевой костей (по 16,7%). В группе больных типичной остеосаркомой около половины (49%) пациентов были с поражением бедренной кости. В группе больных саркомой Юинга наиболее часто выявляли поражение бедренной (26,7%), а также плечевой и большеберцовой костей (по 20%) (рисунок 9). Частота поражения злокачественными и пограничными опухолями костей скелета высокозначимо различалась.

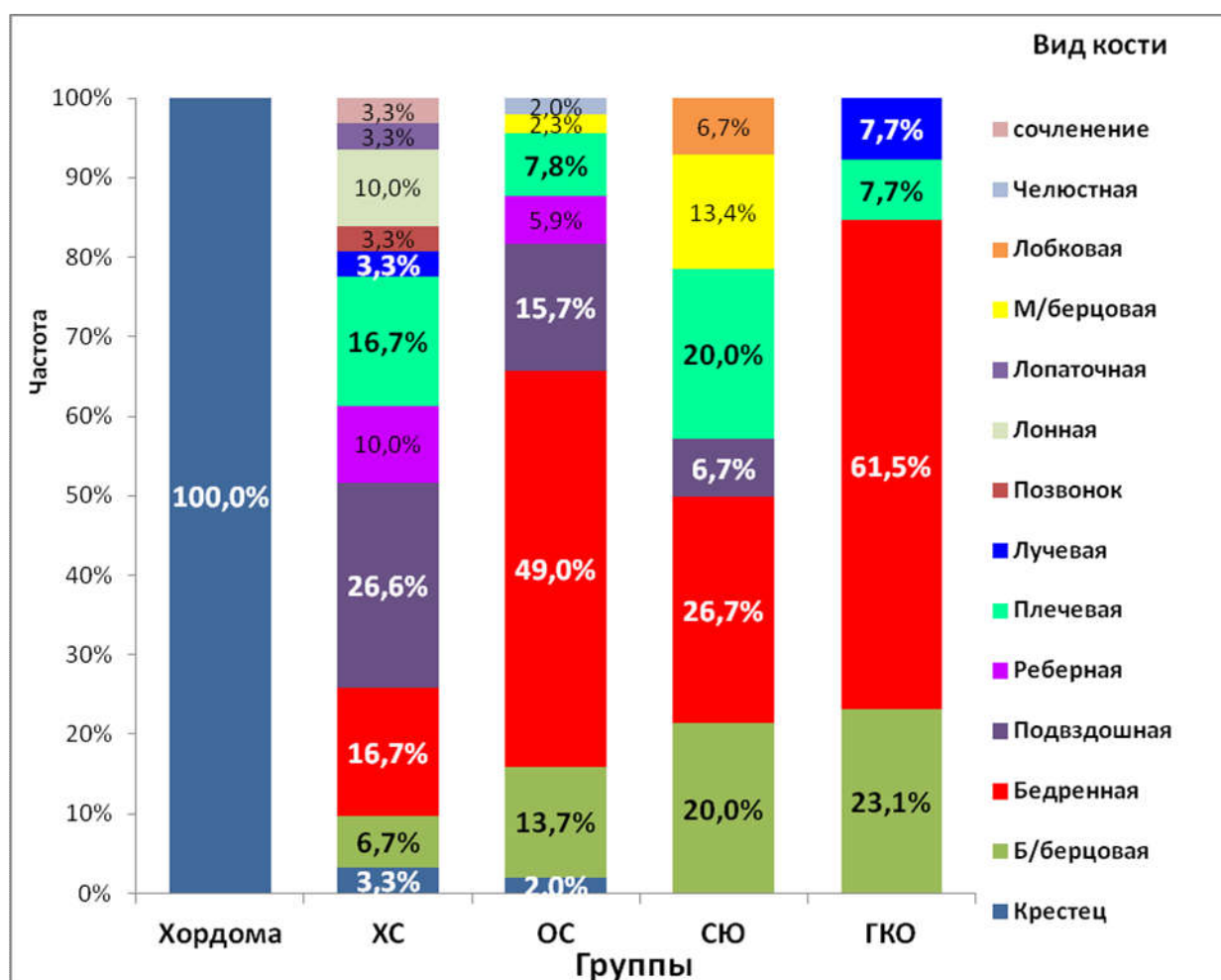


Рисунок 9. Распределение больных новообразованиями костей с учетом их гистологического строения и вида пораженной кости.

В таблице 5 представлены данные распределения больных новообразованиями костей с учетом их гистологического строения и типа пораженной опухолью кости.

Таблица 5.

Распределение больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли и типа пораженной кости

Гистологическое строение опухоли	N	Тип пораженной опухолью кости Частота абс., (отн.)		
		Губчатая	Трубчатая	Плоская
Гигантоклеточная опухоль кости	13	-	13 (100%)	-
Хордома	14	14 (100%)	-	-
Типичная хондросаркома	30	5 (16,7%)	13 (43,3%)	12 (40,0%)
Типичная остеосаркома	51	2 (3,9%)	38 (74,5%)	11 (21,6%)
Саркома Юинга	15	-	12 (80,0%)	3 (20,0%)
Атипичная хондросаркома	1	-	1	-
Атипичная остеосаркома	1	-	1	-
Всего	125	21 (16,8%)	78 (62,4%)	26 (20,8%)
P		<0,0001		

Следует отметить, что в настоящем исследовании преобладали пациенты с опухолевым поражением трубчатых костей (62,4%; рисунок 10). Наиболее часто поражение опухолью трубчатых костей выявлено в группе с диагнозом пограничная гигантоклеточная опухоль кости (100%), а также с диагнозом саркома Юинга (80%) и типичная остеосаркома (74,5%). В группе больных типичной хондросаркомой частота поражения трубчатых костей составила 43,3%. У всех пациентов с хордомой выявлено поражение губчатой кости – крестца (100%) (рисунок 11).

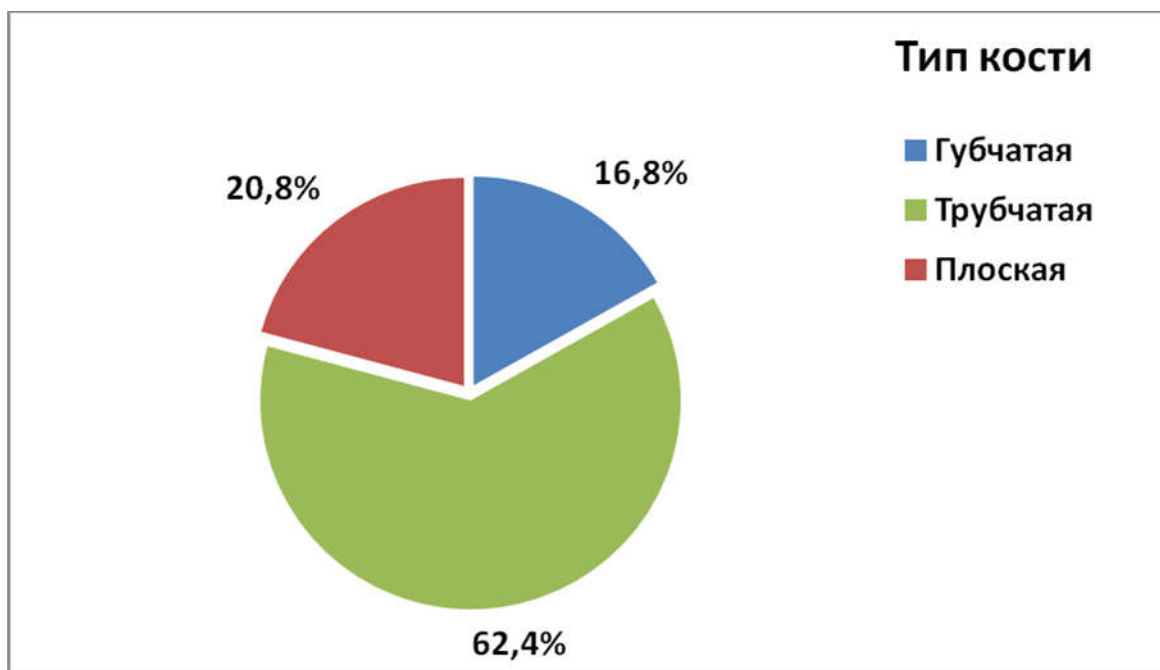


Рисунок 10. Распределение больных новообразованиями костей с учетом типа пораженной опухолью кости.

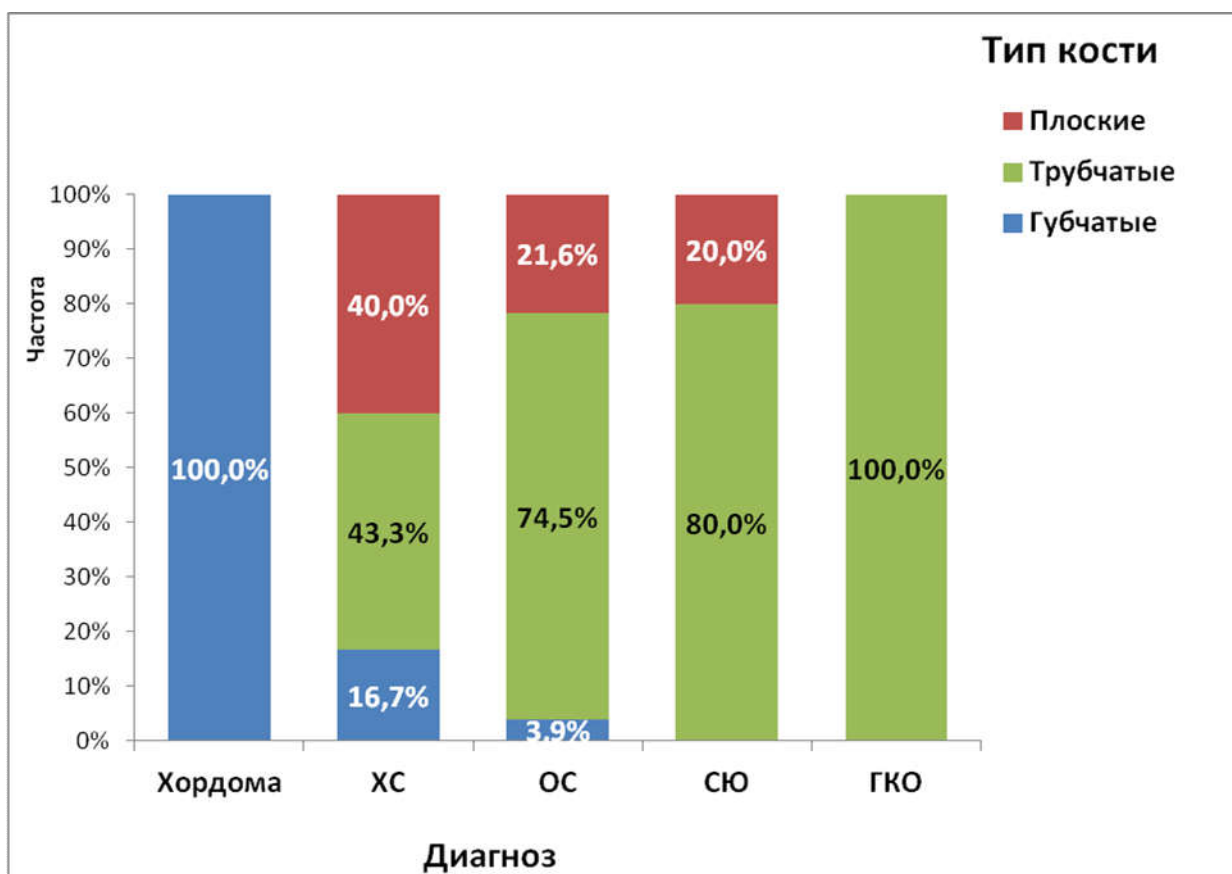


Рисунок 11. Распределение больных с учетом гистологического строения опухоли и типа пораженной опухолью кости.

В таблице 6 и на рисунке 12 представлены данные о 112 больных злокачественными новообразованиями костей с учетом их гистологического строения и степени дифференцировки - критерий G.

Таблица 6.

Распределение больных саркомами костей с учетом их гистологического строения и степени дифференцировки опухоли

Группы	N	Степень дифференцировки опухоли Частота абс., (отн.)		
		G1	G2	G3
Хордома	14	-	1 (7,7%)	13 (92,8%)
Типичная ХС	30	7 (23,3%)	16 (53,4%)	7 (23,3%)
Типичная ОС	51	1 (4,0%)	2 (4,0%)	48 (94,2%)
Саркома Юинга	15	-	1 (6,7%)	14 (93,3%)
Атипичная ХС	1	-	1	-
Атипичная ОС	1	-	-	1
Всего	112	8 (7,2%)	21 (18,8%)	83 (74,0%)
P		<0,0001		

Во всех группах преобладали опухоли с неблагоприятной степенью дифференцировки G3 (рисунок 12).

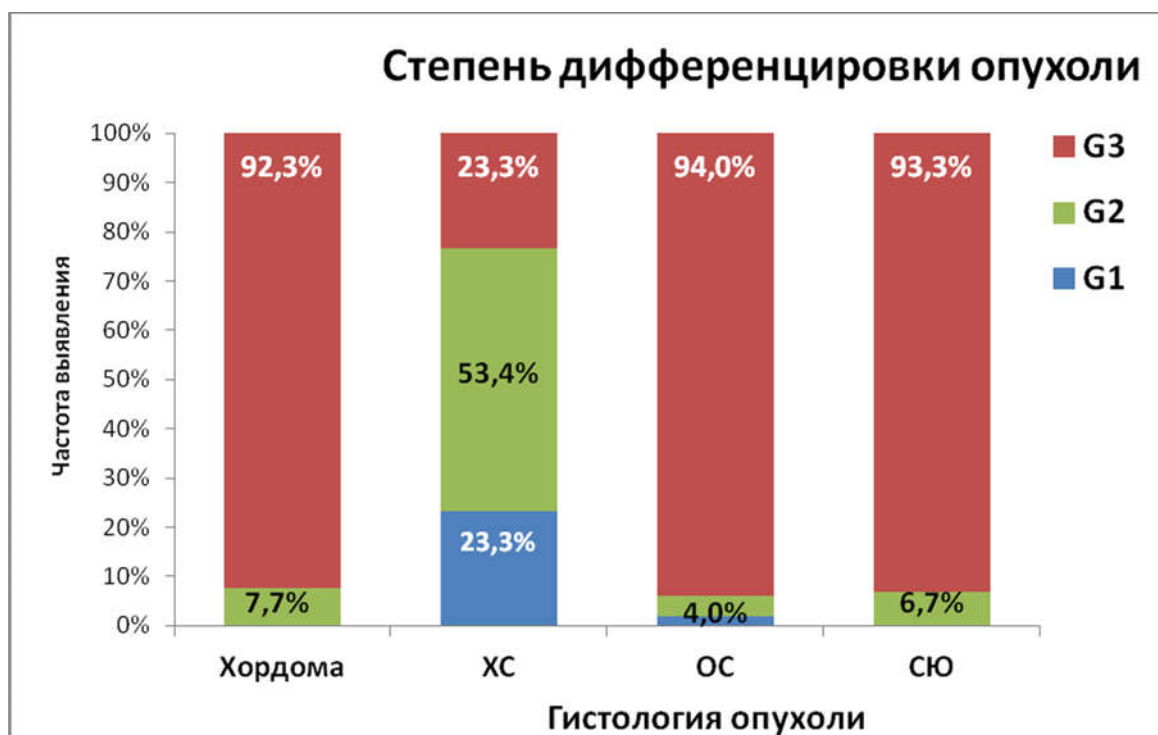


Рисунок 12. Распределение больных саркомами костей с учетом их гистологического строения и степени дифференцировки.

В таблице 7 представлены данные распределения больных злокачественными новообразованиями костей с учетом их гистологического строения и критерия Т.

Таблица 7.

Распределение больных злокачественными новообразованиями костей с учетом их гистологического строения и критерия Т

Группы	N	Критерий распространенности Т		
		Частота абс., (отн.)		
		T1	T2	T3
Хордома	14	-	14 (100%)	-
Типичная ХС	30	8 (26,7%)	16 (53,4%)	6 (19,9%)
Типичная ОС	51	4 (7,9%)	40 (78,5%)	7 (13,6%)
Саркома Юинга	15	2 (13,4%)	10 (66,7%)	3 (19,9%)
Атипичная ХС	1	1	-	-
Атипичная ОС	1	1	-	-
Всего	112	16 (14,3%)	80 (71,5%)	16 (14,2%)
P		0,0067		

Следует отметить, что в настоящем исследовании преобладали пациенты с распространенностью Т2 (71,4%) (рисунок 13). Выявленная нами особенность была характерна для всех гистологических вариантов опухолей костей (рисунок 14). Различия статистически значимы ($p=0,0067$).

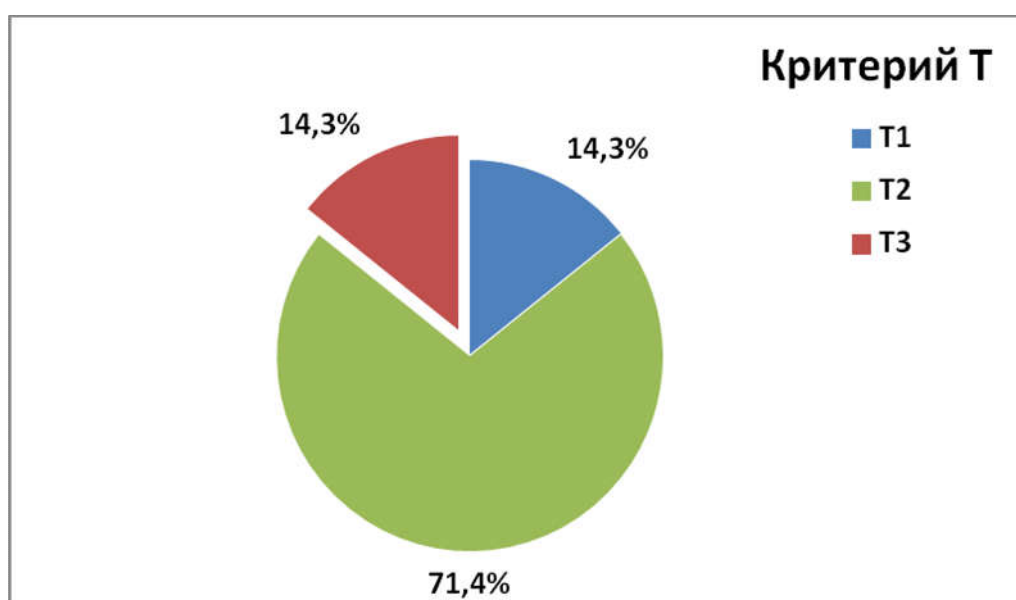


Рисунок 13. Распределение больных злокачественными опухолями костей по критерию распространенности Т.

Метастазы в регионарных лимфоузлах (критерий N1) выявлены только в 3-х наблюдениях (2,7%): у 2-х больных типичной остеосаркомой и у 1 больного саркомой Юинга.

Отдаленные метастазы (критерий M1) выявлены у 11 больных злокачественными новообразованиями костей: у 1 больного хордомой, у 7 больных типичной остеосаркомой, у 3 больных саркомой Юинга.

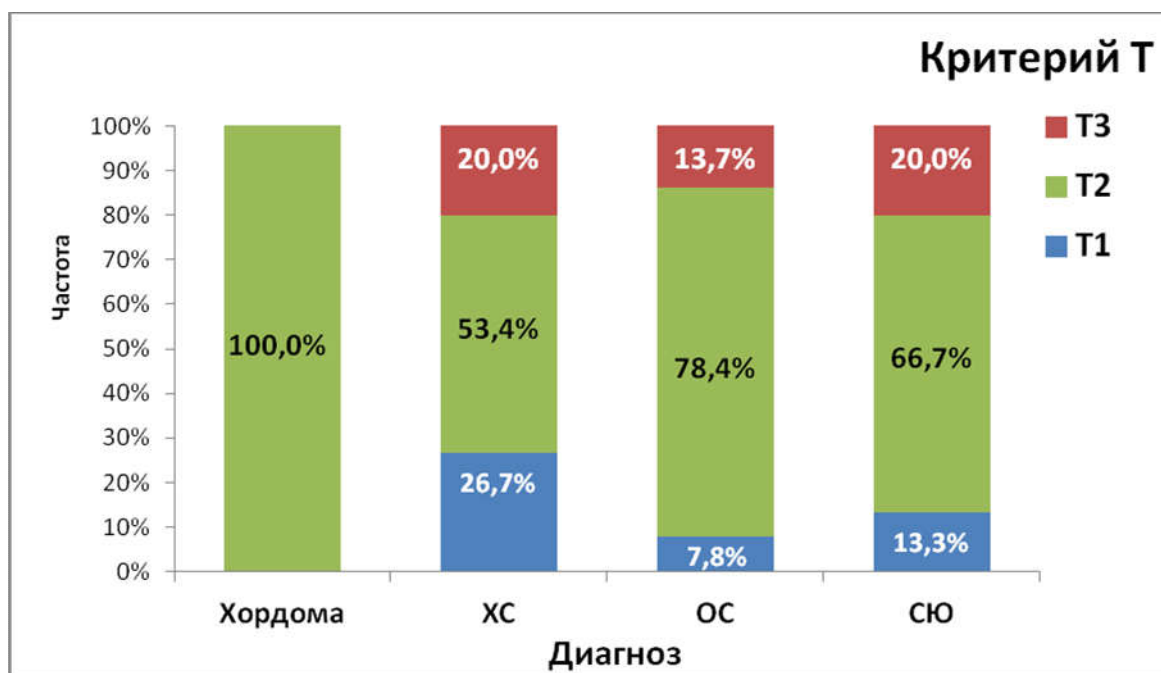


Рисунок 14. Распределение больных различными гистологическими вариантами злокачественных опухолей костей с учетом критерия Т.

В таблице 8 представлены данные распределения больных злокачественными новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли и клинко-рентгенологической стадии заболевания.

Таблица 8.

Распределение больных злокачественными опухолями костей с учетом их гистологического строения и стадии заболевания

Группы	N	Стадия заболевания. Частота выявления абс., (отн.)					
		Ia	Ib	IIa	IIb	III	IV
Хордома	14	-	-	1 (7,1%)	12 (85,7%)	-	1 (7,1%)
Типичная ХС	30	4 (13,4%)	2 (6,7%)	5 (16,7%)	13 (43,2%)	6 (20,0%)	-

Продолжение табл.8

Типичная ОС	51	-	2 (3,9%)	4 (7,8%)	32 (62,7%)	5 (10,0%)	8 (15,7%)
Саркома Юинга	15	-	-	1 (6,7%)	10 (66,6%)	1 (6,7%)	3 (20,0%)
Атипичная ХС	1	1	-	-	-	-	-
Атипичная ОС	1	-	-	1	-	-	-
Всего	112	5 (4,5%)	4 (3,5%)	12 (10,7%)	67 (59,9%)	12 (10,7%)	12 (10,7%)
P		0,0003					

Преобладали больные злокачественными новообразованиями костей с IIb стадией (59,8%) (рисунок 15), при этом во всех группах преобладала IIa стадия.

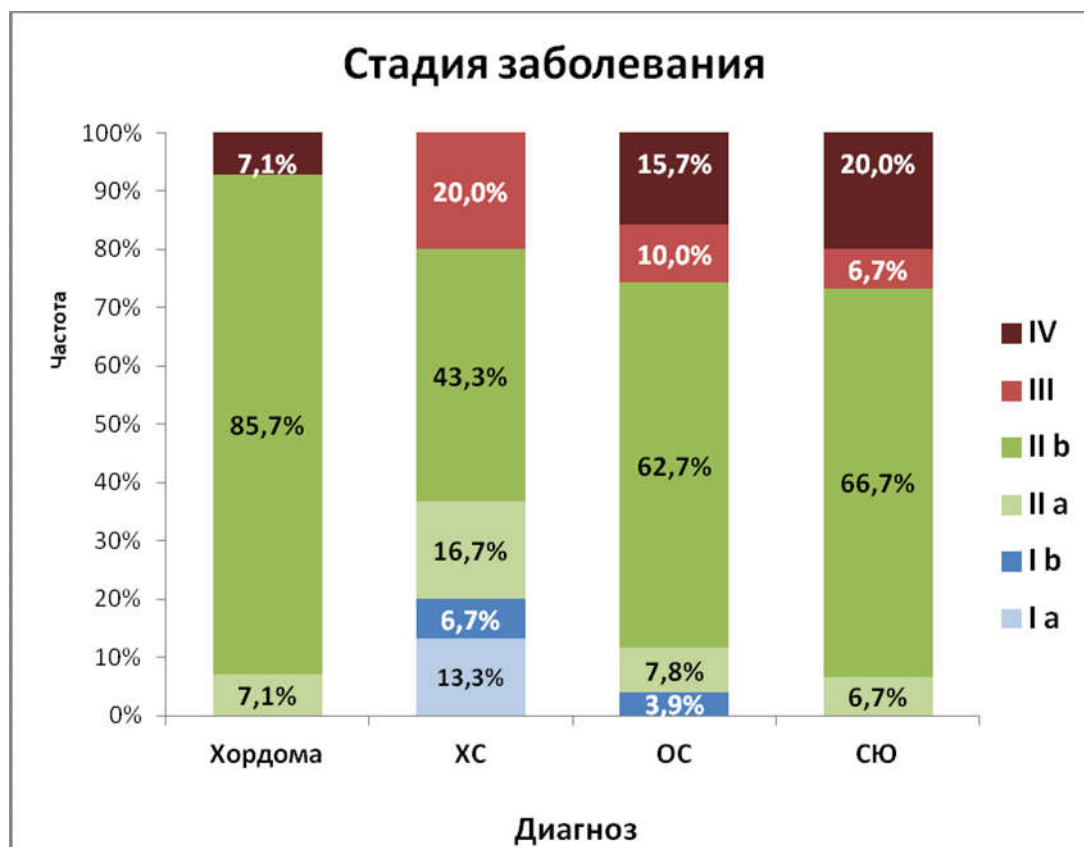


Рисунок 15. Распределение больных злокачественными опухолями костей с учетом их гистологического строения и стадии заболевания.

У 7 (6,3%) больных выявлен патологический перелом, из них у 6 пациентов с типичной остеосаркомой и у 1 больного с саркомой Юинга.

Отдаленные результаты лечения больных злокачественными новообразованиями костей удалось проследить у 81 пациента, 15 больных злокачественными новообразованиями костей умерли к моменту завершения исследования. Отдаленные результаты лечения больных злокачественными новообразованиями костей представлены в главе IV.

2.3. Специальные биохимические методы исследования.

В сыворотке крови всех обследованных пациентов и лиц контрольной группы определяли содержание sVISTA sPD-L1 и sPD-1 и sRANKL. Для определения исследуемых маркеров использовали наборы реактивов для иммуноферментного анализа: Human VISTA/B7-H5/PD-1H (RayBiotech, США), Human sPD-L1 Platinum и Human sPD-1 (Affimetrix, eBioscience, США) и sRANKL (Biomedica Medizinprodukte, Австрия). Процедуру определения проводили по стандартному протоколу в соответствии с рекомендациями производителя.

Измерения оптической плотности проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия) и рассчитывали содержание маркеров с использованием калибровочной кривой. Концентрацию выражали в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

2.4. Статистический анализ результатов исследования.

Для параметров с распределением, отличающимся от нормального, рассчитывали медиану и квартили, а также применяли методы непараметрической статистики (Kruskal-Wallis Anova & Median test при сравнении более 2-х групп и Mann-Whitney - при сравнении 2-х групп).

Строили таблицы сопряженности признаков при сравнении частот. Для расчета p использовали точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Проводили корреляционный анализ рангов Спирмена с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости. Также использовали регрессионную многофакторную модель Кокса.

Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS в отделе информационных технологий ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ГЛАВА III
СОДЕРЖАНИЕ sVISTA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ КОСТЕЙ
(собственные исследования)

3.1. Содержание sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных новообразованиями костей.

Исследовали концентрацию sVISTA в сыворотке крови 42 здоровых доноров (группа контроля), 13 больных пограничными (гигантоклеточная опухоль кости) и 112 больных злокачественными (саркомами) новообразованиями костей. Распределение уровней маркера значительно отличалось от распределения Гаусса, поэтому в качестве центральной меры применяли медиану, в качестве меры разброса значений – квартили; сравнения выполняли непараметрическими критериями. Результаты представлены в таблице 9 и на рисунке 16.

Таблица 9.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями
 костей и здоровых доноров группы контроля

Группа	N	Концентрация sVISTA, нг/мл			P
		Пределы колебания	Медиана; квартили	95% ДИ	
⁰ Контроль	42	0-99,7	4,7; 1,25-4,75	5,21-16,43	0vs1=0,01; 0vs2=0,02; 0vs3=0,03; 2vs3=0,30
¹ Больные новообразованиями костей (общая группа)	125	0-120	1,4; 0,4-7,0	0,1-64,8	
² Пограничные новообразования костей	13	0-11,8	0,8; 0,3-2,5	0-11,8	
³ Злокачественные новообразования костей	112	0-120	1,4; 0,5-8,0	0,1-81,3	

Как следует из данных таблицы 9, выявлено статистически значимое увеличение медианы концентрации sVISTA в сыворотке здоровых доноров группы контроля (4,7 нг/мл) по сравнению с больных пограничными (0,7 нг/мл), а также злокачественными (1,4 нг/мл) новообразованиями костей, у последних медианы маркера были ниже в 6,3 и в 3,3 раза соответственно. Следует отметить, что размах колебаний концентрации маркера sVISTA был наибольшим в группе больных злокачественными новообразованиями костей. Медианы концентрации sVISTA не различались между группами больных злокачественными и пограничными опухолями костей (таблица 9).

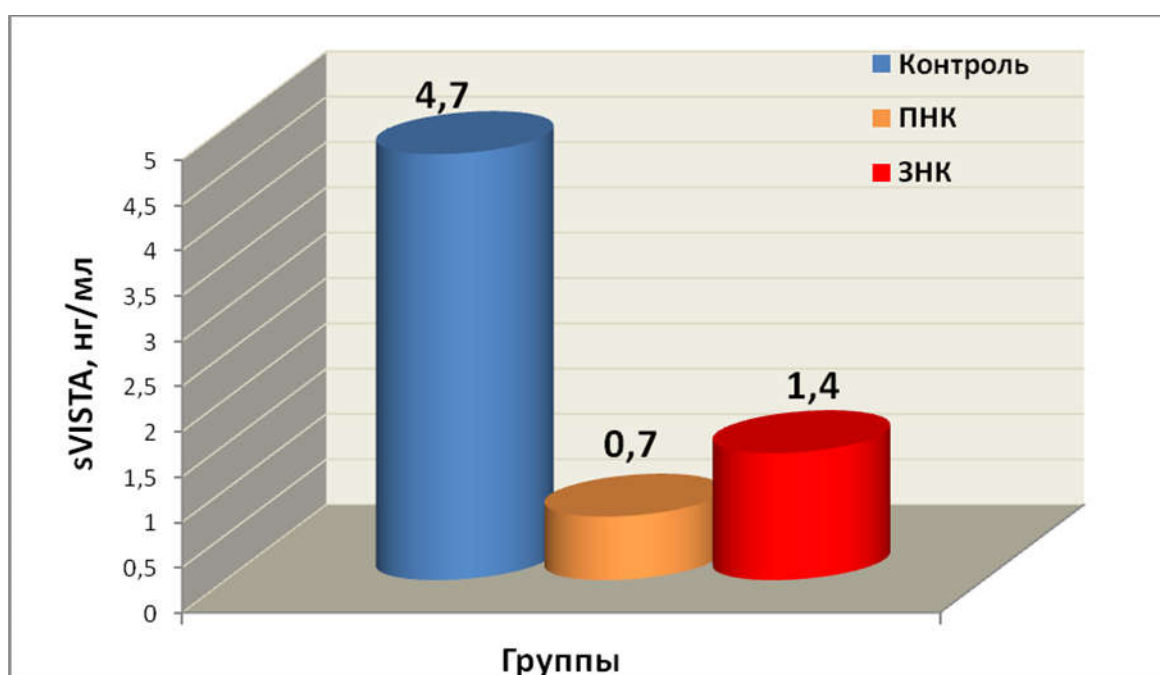


Рисунок 16. Медианы концентраций sVISTA в контроле и в группах больных пограничными и злокачественными новообразованиями костей.

У 66 из 112 (58,9%) больных злокачественными новообразованиями костей уровни sVISTA не превышали 2,0 нг/мл, еще у 21 (18,8%) пациента концентрации показателя были в диапазоне от 2,1 до 10,0 нг/мл и у 25 (22,3%) больных находились в достаточно широком диапазоне колебаний от 10,1 до 120 нг/мл.

В группе больных пограничными новообразованиями костей частота обнаружения концентраций sVISTA не превышающих 2,0 нг/мл отмечена у 8

больных (61,5%), в диапазоне от 2,1 до 10,0 нг/мл обнаружена у 4 пациентов (30,8%) и у 1 больного этой группы значение маркера было выше 10,0 нг/мл.

В группе контроля частота выявления уровней sVISTA не превышающих 2,0 нг/мл обнаружена у 13 (30,9%); в диапазоне от 2,1 до 10,0 нг/мл выявлена у 15 (35,71%); у 14 (33,3%) обследованных здоровых доноров значение маркера было выше 10,0 нг/мл (рисунок 17; p=0,1).

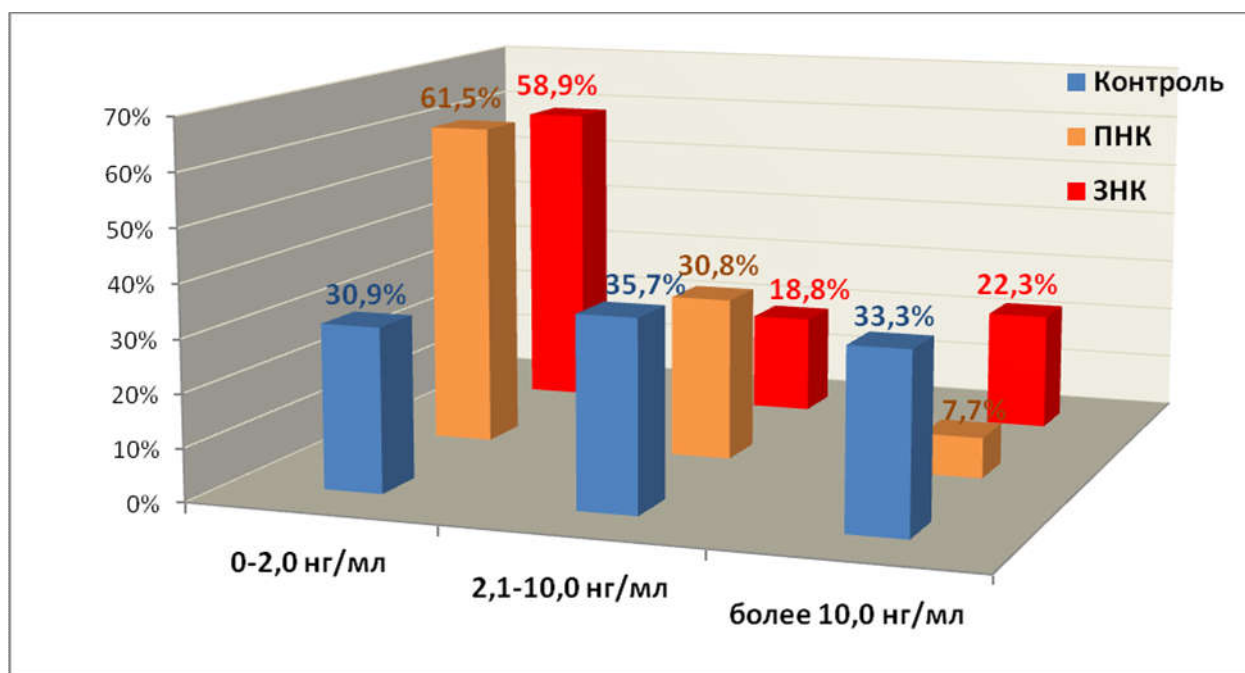


Рисунок 17. Распределение концентраций sVISTA в контроле и в группах больных пограничными и злокачественными новообразованиями костей.

Следует отметить, что частота выявления значений sVISTA по порогу $\leq 2,0$ нг/мл в группе контроля и у больных новообразованиями костей статистически значимо различалась и составили 30,9% в группе контроля и 59,2% в общей группе больных новообразованиями костей (p=0,016) (таблица 10; рисунок 18). При этом частота значений sVISTA ≤ 2 нг/мл в группах больных пограничными и злокачественными новообразованиями костей была сопоставимой и составила 53,8% и 58,9% соответственно.

Таблица 10.

Частота выявления значений sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и больных новообразованиями костей

Группы	Частота, абс., (отн.)			P
	sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл	sVISTA $> 2,0$ нг/мл	Всего обследовали	
Контроль	13 (30,9%)	29 (69,1%)	42 (100%)	0,016
Общая группа больных новообразованиями костей	74 (59,2%)	51 (40,8%)	125 (100%)	
Пограничные новообразования костей	7 (61,5%)	4 (38,5%)	14 (100%)	
Злокачественные новообразования костей	65 (58,9%)	21 (41,1%)	112 (100%)	

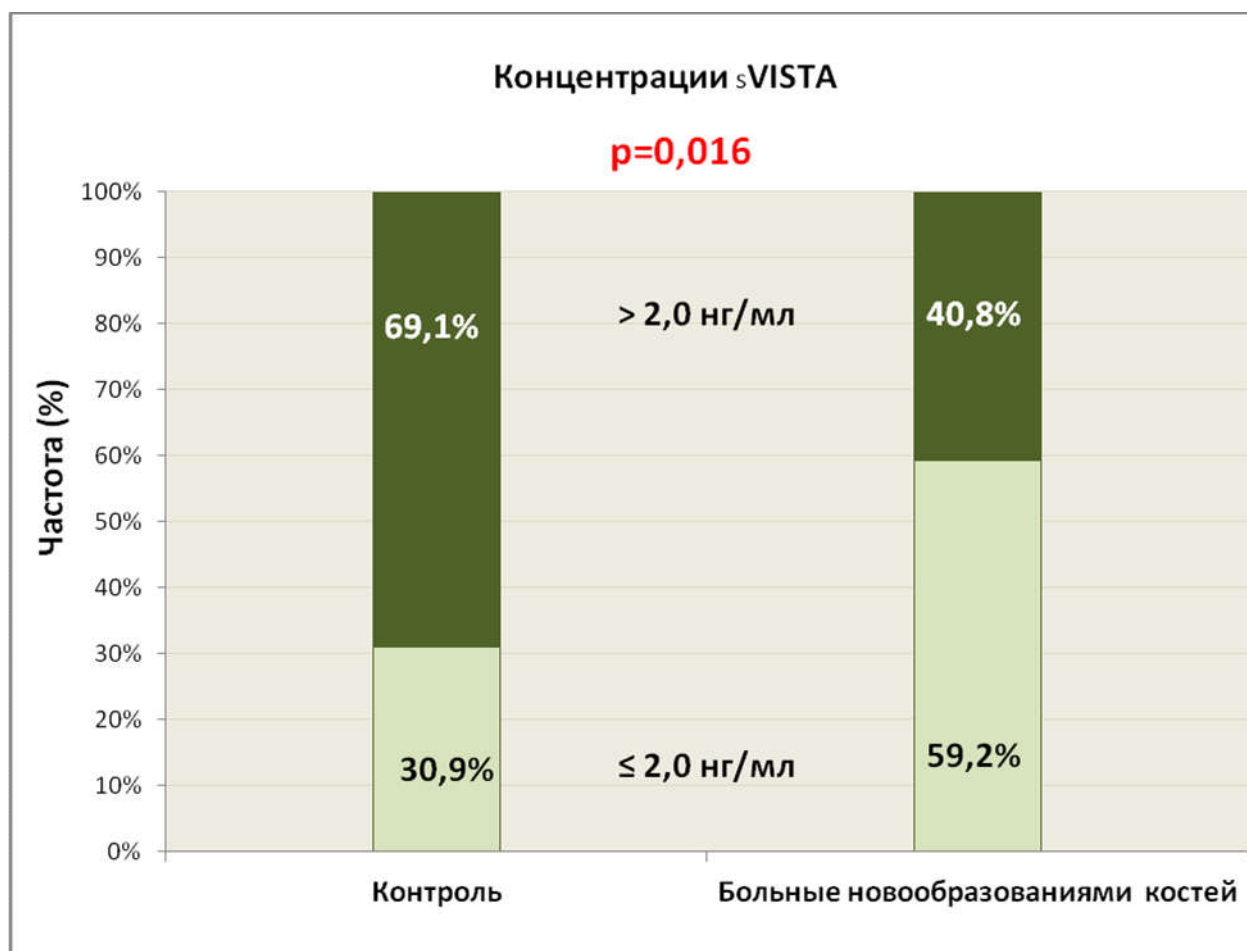


Рисунок 18. Распределение концентраций sVISTA по порогу 2,0 нг/мл в контроле и в общей группе больных новообразованиями костей.

Таким образом, нами установлена статистически значимо бóльшая частота выявления низких ($\leq 2,0$ нг/мл) концентраций sVISTA в группе больных новообразованиями костей по сравнению с группой контроля (здоровых доноров).

Однако ROC-анализ не выявил порогового значения маркера sVISTA при разделении здоровых доноров группы контроля от больных новообразованиями костей (рисунок 19).

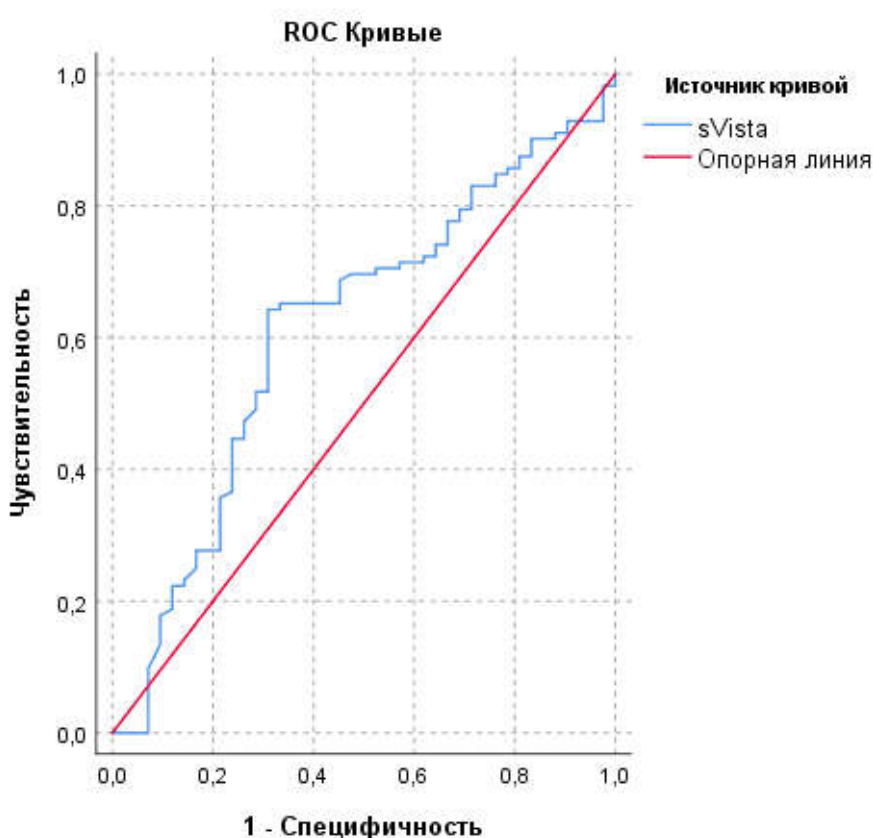


Рисунок 19. Пороговый уровень маркера sVISTA равнялся 2,83, индекс Юдена – 0,333, чувствительность теста 65,6%, специфичность относительно контроля – 69%.

В таблице 11 представлены данные ROC-анализа уровней sVISTA для каждой из обследованных групп больных с соответствующими коэффициентами чувствительности и специфичности теста.

Таблица 11.

Данные ROC-анализа во всех группах больных новообразования костей

Обследованные группы	Порог sVISTA, нг/мл	Чувствительность	Специфичность	Индекс Юдена
Новообразования костей (общая группа)	2,83	65,6%	69,0%	0,346
Злокачественные новообразования костей	2,83	65,6%	69,0%	0,333
Пограничные новообразования костей	2,69	76,9%	69,0%	0,460
Типичная остеосаркома	2,53	61,5%	69,0%	0,306
Типичная хондросаркома	2,83	64,5%	69,0%	0,336
Саркома Юинга	2,74	53,3%	69,0%	0,224
Хордома	2,31	85,7%	69,0%	0,548

3.2. Концентрации sVISTA в сыворотке крови группы контроля и у больных новообразованиями костей в зависимости от пола и возраста.

В таблице 12 и на рисунке 20 представлены данные концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и больных новообразованиями костей с учетом их пола.

Таблица 12.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови группы контроля и больных новообразованиями костей с учетом их пола

Группа	Пол	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
Контроль	Муж.	19	3,0; 1,2-17,4	0,9	7 (36,8%)	0,36
	Жен.	23	4,9; 0,7-11,9		6 (26,1%)	
Общая группа	Муж.	70	1,5; 0,7-7,4	0,17	40 (57,1%)	0,6

больных новообразованиями костей	Жен.	55	1,0; 0,3-7,0		34 (61,8%)	
----------------------------------	------	----	--------------	--	------------	--

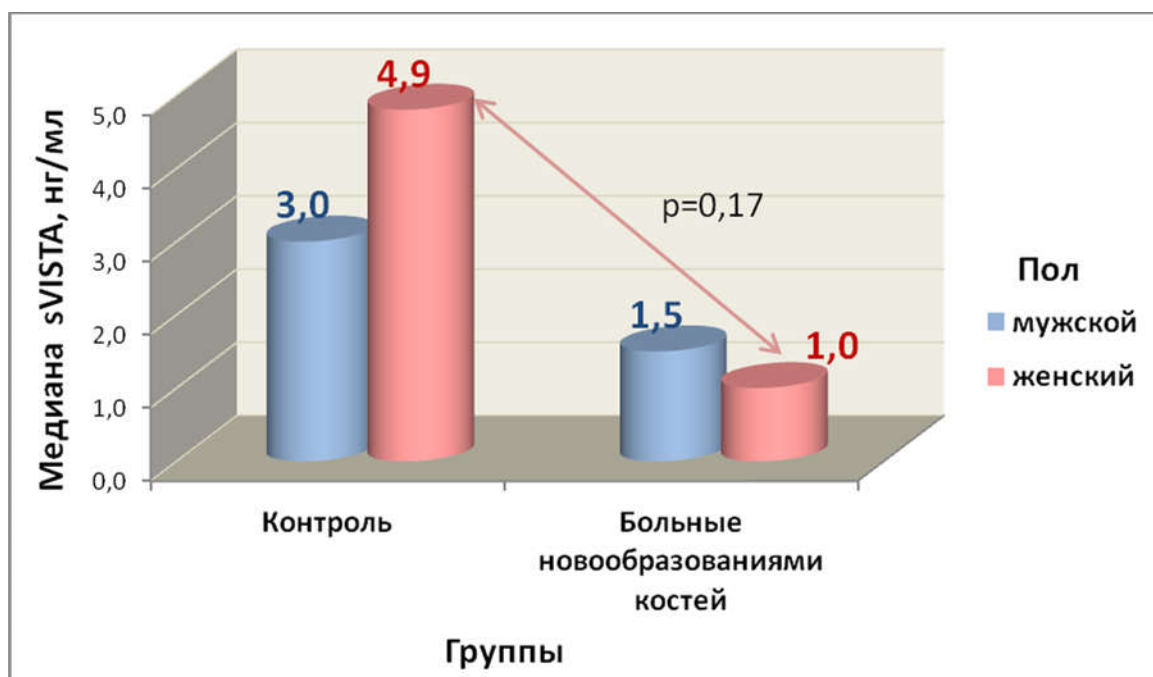


Рисунок 20. Медианы концентраций sVISTA в группе контроля и больных новообразованиями костей с учетом пола обследованных.

Как следует из данных таблицы 12, в группе контроля, как и в общей группе больных новообразованиями костей не отмечено значимых различий в концентрациях медиан sVISTA в сыворотке крови в зависимости от пола обследованных.

Так, медианы концентраций sVISTA в группе контроля у мужчин и женщин не различались и составили соответственно 3,0 и 4,9 нг/мл ($p=0,9$).

В общей группе больных новообразованиями костей медианы уровней sVISTA также не различались между мужчинами и женщинами и равнялись 1,5 и 1,0 нг/мл соответственно (таблица 12 и рисунок 20).

Однако, следует отметить, что при сравнении концентраций sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей женщин получено недостоверное снижение медианы маркера (1,0 нг/мл) по сравнению с контролем (4,9 нг/мл; $p=0,17$; рисунок 20).

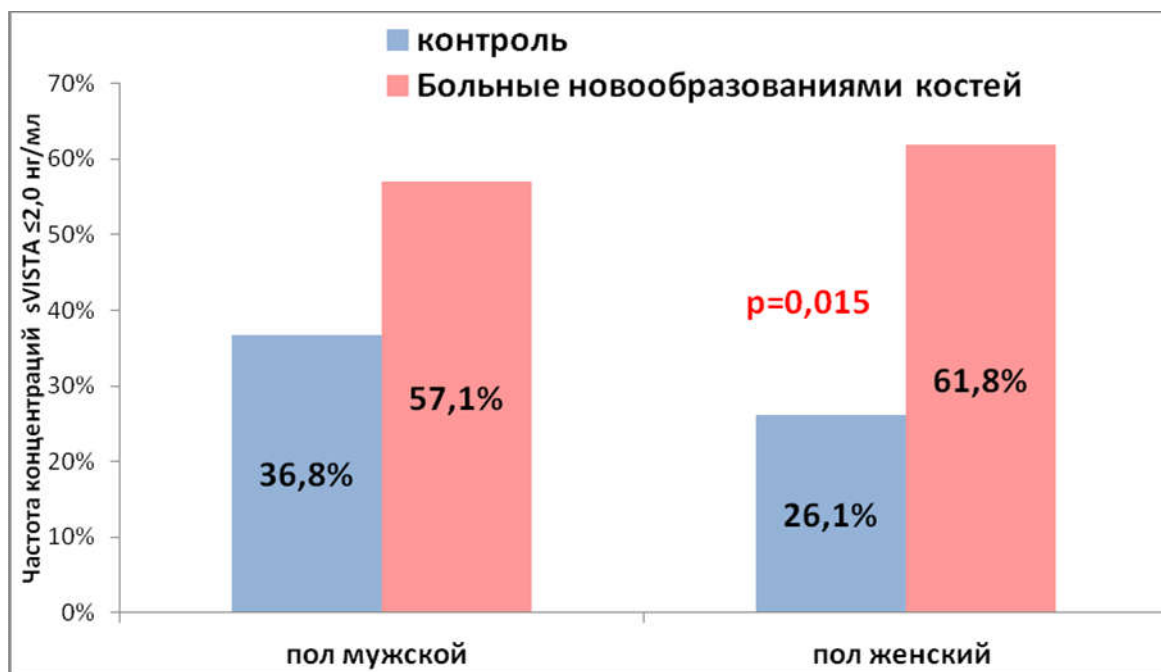


Рисунок 21. Частота выявления концентраций sVISTA, не превышающих 2,0 нг/мл в группах контроля и больных новообразованиями костей с учетом пола обследованных.

При этом, частота обнаружения низких концентраций маркера (≤ 2 нг/мл) у больных и здоровых женщин статистически значимо различалась и составила: 61,8% - в группе больных новообразованиями костей и 26,7% - в контроле ($p=0,015$) (рисунок 21). В то же время, при сравнении групп больных и здоровых мужчин различия в частоте выявления низких уровней VISTA в сыворотке крови (≤ 2 нг/мл) были незначимы и составили соответственно 57,1% против 36,8% ($p=0,33$).

В таблице 13 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови обследованных здоровых доноров и больных пограничными и злокачественными новообразованиями костей в зависимости от их пола.

Таблица 13.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови группы контроля и больных новообразованиями костей в зависимости от их пола

Группы	Пол	N	sVISTA, нг/мл медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл	P
Контроль	Муж.	19	3,0; 1,2-17,4	0,9	7 (36,8%)	0,36
	Жен.	23	4,9; 0,7-11,9		6 (26,1%)	
ПНК	Муж.	7	0,7; 0,1-4,9	0,9	5 (71,4%)	0,4
	Жен.	6	1,3; 0,3-2,5		3 (50,0%)	
ЗНК	Муж.	63	1,8; 0,8-9,1	0,12	35 (55,6%)	0,4
	Жен.	49	1,0; 0,3-7,0		31 (63,3%)	

Выявлены незначимо низкие концентрации sVISTA в группе женщин, больных злокачественными новообразованиями костей (медиана 1,0 нг/мл) по сравнению с таковыми в группе пациентов мужского пола (медиана 1,8 нг/мл; $p=0,12$). Также не установлено значимой связи между частотой выявления низких (≤ 2 нг/мл) концентраций sVISTA и полом больных злокачественными новообразованиями костей ($p=0,4$).

Не установлено корреляционной зависимости между возрастом здоровых доноров и уровнями sVISTA в сыворотке крови ($r_s=0,1$; $p>0,05$).

В то же время в группе больных злокачественными новообразованиями костей эта зависимость была отрицательной, слабой, но статистически значимой ($r_s= -0,21$; $p<0,05$). Стало быть, низкие уровни sVISTA чаще выявляли в сыворотке крови больных более старшего возраста.

В таблице 14 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от возраста (до и старше 18 лет).

Таблица 14.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных новообразованиями костей в зависимости от возраста (моложе и старше 18 лет)

Группа	Возраст, лет	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл	P
Контроль (К)	<18	13	5,3; 1,0-11,3	-	3 (23,0%)	-
Контроль (К)	≥ 18	29	4,4; 1,0-12,3	-	10 (34,5%)	-
Пограничные новообразования костей (ПНК)	≥ 18	13	0,7; 0,3-2,5	-	8 (61,5%)	-
Злокачественные новообразования костей (ЗНК)	<18	28	2,2; 0,9-12,0	0,03	14 (50,0%)	0,26
	≥ 18	84	1,3; 0,4-6,8	0,15	52 (61,9%)	

Примечание. К vs ЗНК в возрасте <18 лет $p=0,03$; К vs ЗНК в возрасте ≥ 18 лет $p=0,15$.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных злокачественными новообразованиями костей в возрасте ≥ 18 лет показали незначимое различие медиан концентрации маркера в группе контроля и у больных ЗНК 4,4 и 1,3 нг/мл соответственно ($p=0,15$; таблица 14). У больных саркомами костей в возрасте <18 лет выявили статистически значимо низкие концентрации sVISTA по сравнению с соответствующей группой здоровых доноров (соответственно 2,2 и 5,3 нг/мл) ($p=0,03$) (таблица 14).

В таблице 15 представлены данные уровней sVISTA в сыворотке крови группы контроля и больных новообразованиями костей по возрастным декадам жизни.

Таблица 15.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных
новообразованиями костей по возрастным декадам жизни

Группа	Возраст, лет	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл	P
Контроль	<18	13	5,2; 2,86-11,9	0,7	3 (23,0%)	0,4
	19-29	7	3,2; 0,43-17,4		2(28,5%)	
	30-39	13	5,9; 1,5-12,3		4 (30,8%)	
	≥ 40	9	3,0; 1,0-4,8		4 (44,4%)	
Пограничные новообразования костей	<30	5	0,4; 0,3-2,2	0,8	3 (60,0%)	0,5
	≥ 30	8	0,8; 0,4-3,7		5 (62,5%)	
Злокачественные новообразования костей	<18	28	2,2; 0,9-12,0	0,17	14 (50,0%)	0,25
	19-29	30	1,6; 0,8-10,5		15 (50,0%)	
	30-39	14	1,3; 0,6-2,0		10 (71,4%)	
	40-49	15	2,0; 0,7-10,2		8 (53,3%)	
	50-59	13	0,8; 0,3-2,8		9 (69,2%)	
	≥ 60	12	0,4; 0,2-1,3		10 (83,3%)	

Из данных таблицы 15 следует, что все различия были статистически незначимы, однако в группе контроля в возрасте < 18 лет наиболее часто выявляли значения sVISTA ≤ 2 нг/мл (23,0%), в группе от 19 до 29 лет (28,5%), в группе старше 40 лет (44,4%). Так, например, в группе больных злокачественными новообразованиями костей наибольшая медиана маркера обнаружена в возрасте до 19 лет (2,2 нг/мл), а наименьшая – в возрасте старше 60 лет (0,4 нг/мл), что подтверждается увеличением частоты выявления значений sVISTA в сыворотке крови ≤ 2 нг/мл с 50,0% до 83,3% соответственно (таблица 15).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что с увеличением возраста в группе здоровых доноров и больных

новообразованиями костей концентрации sVISTA в сыворотке крови снижаются незначимо.

3.3. Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей в зависимости от клинических и морфологических характеристик заболевания.

Рассчитали концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей в зависимости от гистологического строения опухоли (таблица 16; рисунок 22).

Таблица 16.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли

Группа	Гистология опухоли	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3		13 (30,9%)	-
Больные новообразова- ниями костей	¹ ГКО	13	0,7; 0,3-2,5	*0,069; 1 _{vs5} =0,033; 2 _{vs5} =0,0068; 0 _{vs2} =0,018; 0 _{vs3} =0,14; 0 _{vs4} =0,15; 0 _{vs5} =0,9	8 (61,5%)	0,04
	² Хордома	14	0,5; 0,3-1,2		12 (85,7%)	
	³ ХС типичная	30	1,3; 0,7-4,9		19 (63,3%)	
	⁴ ОС типичная	51	1,8; 0,5-9,1		28 (54,9%)	
	⁵ СЮ	15	2,6; 1,4-11,3		6 (40,0%)	
	ОС нетипичная	1	1,4*		0	
	ХС нетипичная	1	23,3*		1	

Примечание: *Контроль_{vs}Больные p=0,069.

Выявлена незначимую связь концентраций sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с гистологическим строением опухоли (p=0,069 Kruskal-Wallis Test). Наименьшие медианы концентрации маркера обнаружены при хордоме кости (0,5 нг/мл), а наибольшие - при саркоме

Юинга (2,6 нг/мл). При этом различия уровней sVISTA в сыворотке крови между больными хордовой и саркома Юинга были статистически значимы, в том числе и при учете поправки Бонферрони на количества сравниваемых групп ($p=0,034$). Частота выявления значений sVISTA ≤ 2 нг/мл так же статистически значимо зависела от гистологического строения опухоли ($p=0,04$), а между группами пациентов с хордовой кости и саркомой Юинга этот показатель различался более, чем в 2 раза (85,7% и 40,0% соответственно).

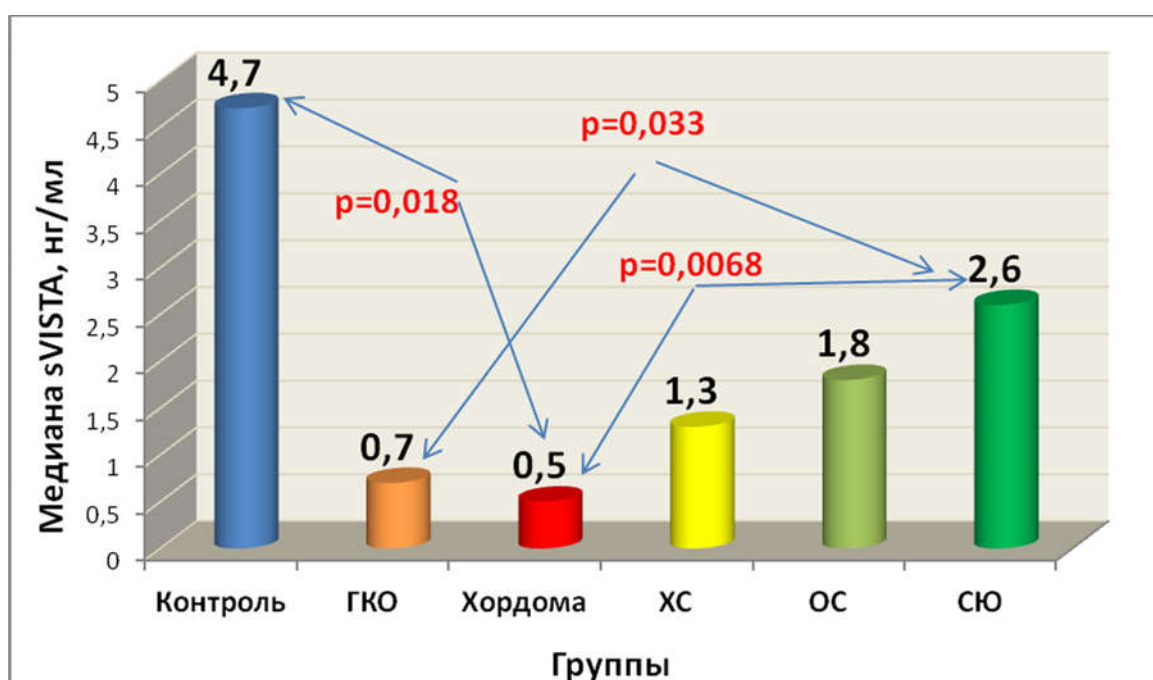


Рисунок 22. Медианы концентрации sVISTA в группах больных новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли.

В таблице 17 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и больных новообразованиями костей в зависимости от локализации опухоли в костях скелета.

Таблица 17.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных
новообразованиями костей в зависимости от локализации опухоли
в костях скелета

Группа	Локализация опухоли	N	sVISTA, нг/мл медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3		13 (30,9%)	-
Больные новообразова- ниями костей	¹ Кости таза	38	1,18; 0,52-7,4	*0,02; 1vs4=0,01; 2vs4=0,01; 3vs4=0,29; 0vs1=0,15; 0vs2=0,04; 0vs3=0,21; 0vs4=0,34	26 (68,4%)	0,0012
	² Нижняя конечность	61	1,1; 0,4-3,5		39 (63,9%)	
	³ Кости грудной клетки	8	1,3; 0,3-4,5		5 (62,5%)	
	⁴ Верхняя конечность	17	9,1; 2,4-12,8		3 (17,7%)	
	Кости головы	1	0,18		1	

Примечание: *КонтрольvsБольные p=0,02.

Как следует из данных, приведенных в таблице 17, уровни sVISTA в сыворотке крови больных при некоторых новообразованиях были статистически значимо связаны с локализацией опухоли в костях скелета (p=0,018 Kruskal-Wallis Test).

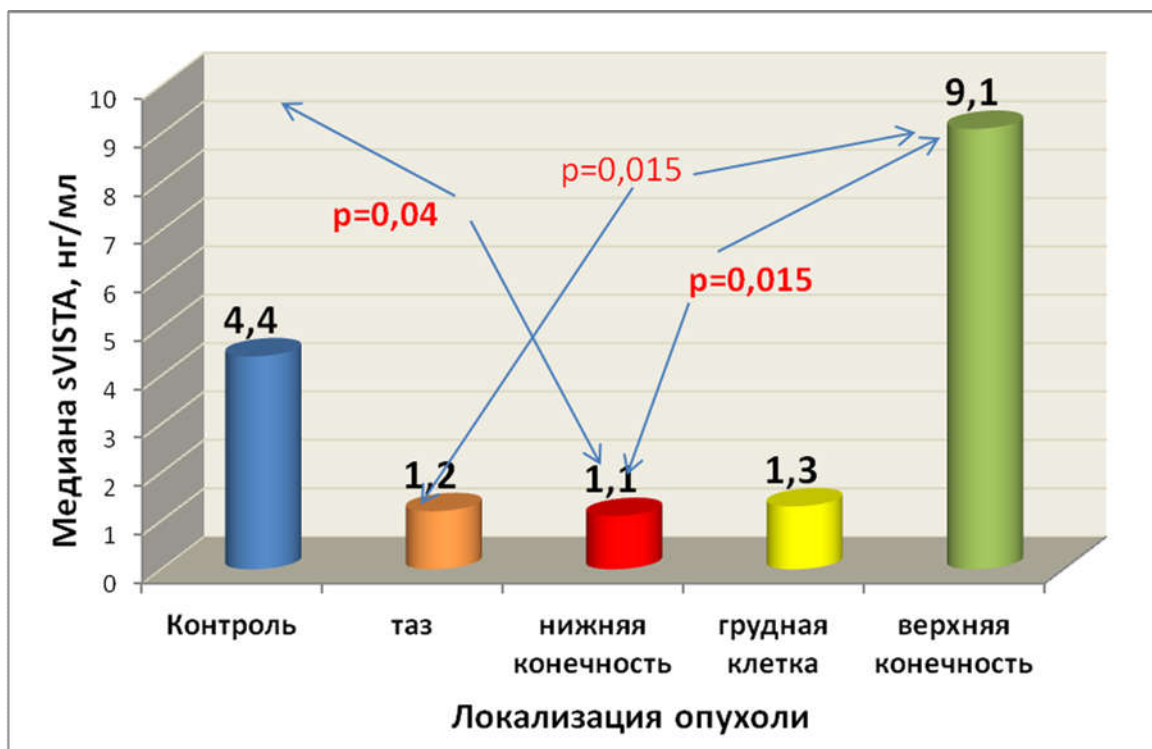


Рисунок 23. Медианы концентраций sVISTA в группах больных с учетом локализации опухоли в костях скелета.

Так, выявили статистически значимое различие медиан концентрации маркера у пациентов с локализацией опухоли в костях таза и верхних конечностей (соответственно 1,2 и 9,1 нг/мл; $p=0,015$), с локализацией опухоли в нижних и верхних конечностях (соответственно 1,1 и 9,1 нг/мл; $p=0,015$). Также выявлены статистически значимые различия между медианами концентраций sVISTA в контроле (4,4 нг/мл) и у больных с локализацией опухоли в нижних конечностях (1,1 нг/мл; $p=0,015$) (рисунок 23).

Эти данные подтверждаются анализом частоты выявления концентраций sVISTA ≤ 2 нг/мл в группах с различной локализацией опухоли в костях скелета ($p=0,0012$). Так, при локализации опухоли в костях верхних конечностей частота низких значений маркера составила 17,7%, тогда как при других локализациях низкий уровень sVISTA колебался от 62,5% до 68,4%.

В таблице 19 представлены сравнительные данные уровней sVISTA в контроле и больных в зависимости от вида пораженной опухолью кости (малочисленные группы больных от 3-х и менее наблюдений не приводим).

Таблица 19.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных новообразованиями костей в зависимости от вида пораженной кости

Группа	Кость	N	sVISTA нг/мл, медиана ; квартил и	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3	-	13 (30,9%)	-
Больные новообра- зованиями костей	¹ Крестец	16	0,54; 0,3-1,5	*0,013; 1vs6=0,02; 2vs6=0,01; 3vs6=0,01; 4vs6=0,05; 5vs6=0,12; 0vs1=0,01; 0vs2=0,06; 0vs3=0,01; 0vs4,5=0,28; 0vs6=0,6	13 (81,3%)	0,01
	² Большеберцовая	16	0,9; 0,2-2,3		13 (81,3%)	
	³ Бедренная	42	1,1; 0,6-3,7		25 (61,9%)	
	⁴ Подвздошная	16	1,4; 0,7-5,6		10 (62,0%)	
	⁵ Ребро	7	1,4; 0,1-6,2		4 (57,1%)	
	⁶ Плечевая	14	9,7; 2,0-12,7		3 (21,4%)	

Примечание: *Контроль vs Больные p=0,013.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей были статистически значимо связаны с видом кости, пораженной опухолью (p=0,013). Так, медиана маркера была наименьшей при поражении опухолью большеберцовой кости (0,9 нг/мл) и крестца (0,54 нг/мл) и наибольшей при поражении плечевой кости (9,7 нг/мл; рисунок 24).

крови обнаружена у больных с поражением большеберцовой кости и крестца (по 81,3%) и наименьшая – в группе с поражением опухолью плечевой кости (21,4%).

Таблица 20.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови в группе контроля и больных новообразованиями костей с учетом типа пораженной опухолью кости

Группа	Тип кости	N	sVISTA, нг/мл медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3	-	13 (30,9%)	-
Пограничные новообразования костей	¹ трубчатая	13	0,7; 0,3-2,5	-	8 (61,5%)	-
Злокачественные новообразования костей	² губчатая	21	0,7; 0,3-1,8	0,25; 2vs3=0,46;	16 (76,2%)	0,2
	³ трубчатая	65	1,8; 0,6-8,6	2vs4=0,35; 3vs4=0,8;	43 (55,1%)	
	⁴ плоская	26	1,4; 0,8-9,1	1vs3=0,15; 0vs2=0,015 0vs1=0,027	15 (57,7%)	

В таблице 20 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови группы контроля и больных новообразованиями костей в зависимости от типа пораженной опухолью кости. Установлено, что медианы sVISTA достоверно различались между уровнями маркера в контроле и у больных с поражением саркомой губчатой кости ($p=0,015$), а также в контроле и у пациентов с поражением гигантоклеточной опухолью трубчатой кости ($p>0,027$) (рисунок 25).

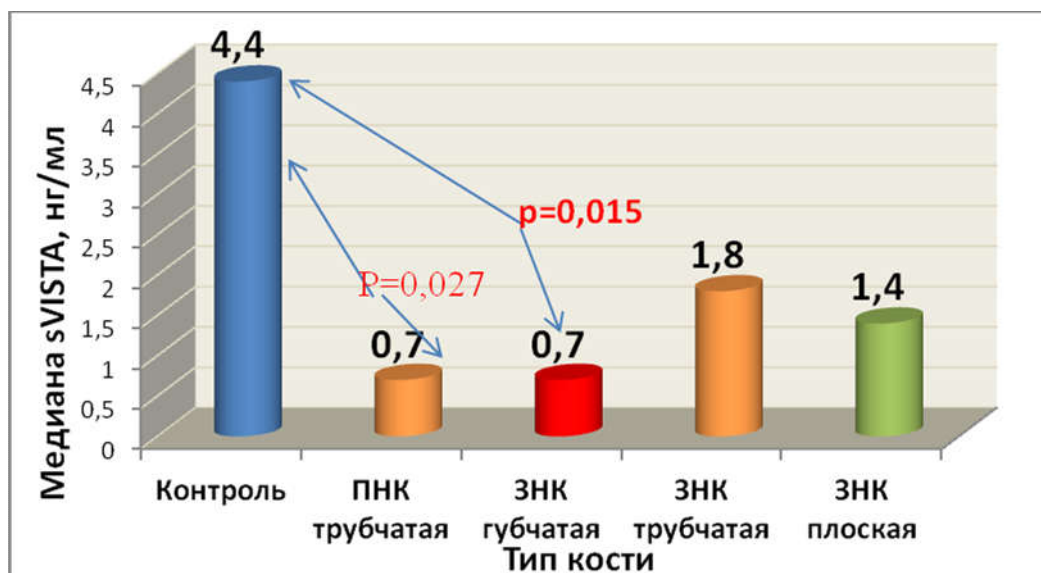


Рисунок 25. Медианы концентрации sVISTA в группах больных новообразованиями костей в зависимости от типа пораженной кости.

Однако наименьшая медиана маркера выявлена в группе больных злокачественными новообразованиями губчатых костей (0,7 нг/мл), частота выявления значений sVISTA ≤ 2 нг/мл в этой группе была наибольшей и составила 76,2%.

3.4. Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от основных критериев системы TNM.

В таблице 21 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от критерия T системы TNM.

Таблица 21.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных злокачественными новообразованиями костей с учетом критерия T

Группа	Критерий T	N	sVISTA нг/мл, медиана; квантили	P	Частота выявления sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3	-	13 (30,9%)	-
Злокачественные новообразования костей	¹ T1	16	1,9; 0,8-7,1	${}_{0vs1,3} > 0,05;$ ${}_{0vs2} = 0,041$	10 (62,5%)	0,9
	² T2	80	1,2; 0,4-10,2		46 (57,5%)	
	³ T3	16	1,8; 1,0-5,4		9 (56,3%)	

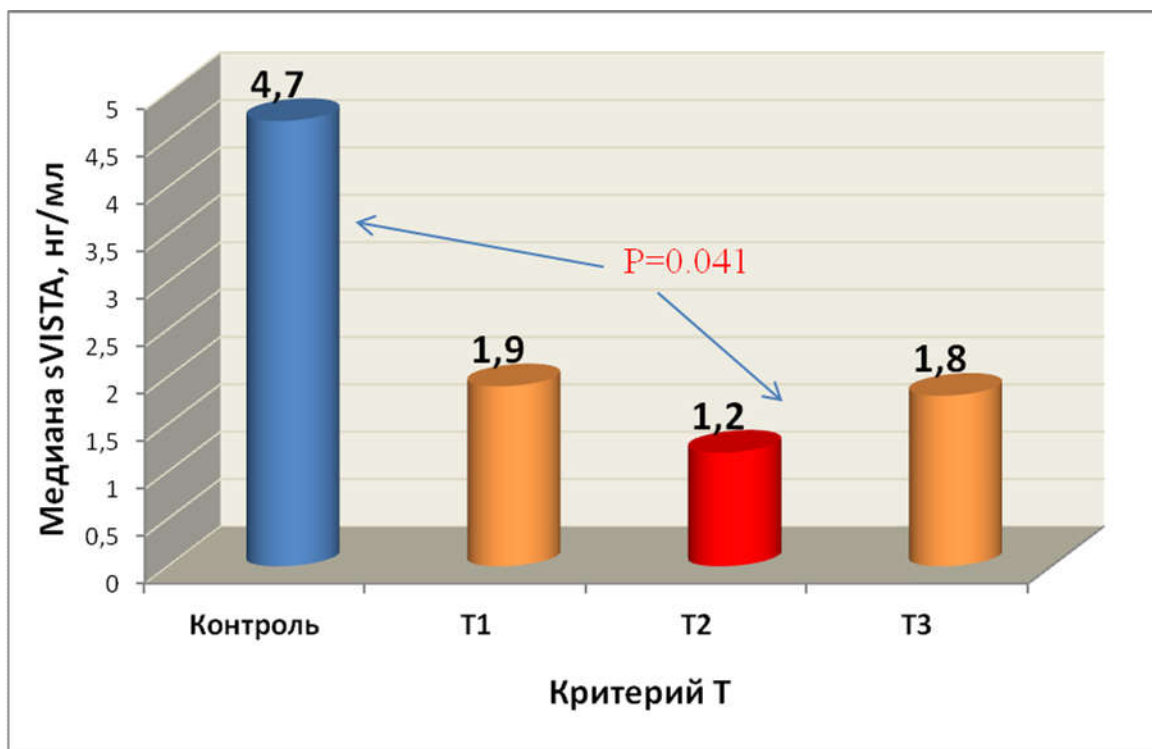


Рисунок 26. Медианы концентрации sVISTA в группах больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от критерия T.

Установлено значимая связь концентраций исследованного маркера с критерием T. Так, медиана концентрации sVISTA была достоверно ниже в группе больных саркомами костей с критерием T2 по сравнению с таковой в группе контроля ($p=0,041$) что показано более наглядно на рисунке 26.

Не проводили сравнения концентраций sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей с учетом критерия N из-за малого количества наблюдений с N1 ($n=3$).

В таблице 22 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от критерия M системы TNM. Не установлено значимой связи концентраций маркера с критерием M (рисунок 27).

Таблица 22.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных
злокачественными новообразованиями костей в зависимости
от критерия М

Группа	Критерий М	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3	-	13 (30,9%)	-
Злокачественные новообразования костей	¹ М0	101	1,3; 0,5-9,2	0,7; _{0vs1,2} >0,05	60 (59,4%)	0,4
	² М1	11	2,2; 0,7-4,4		5 (45,5%)	

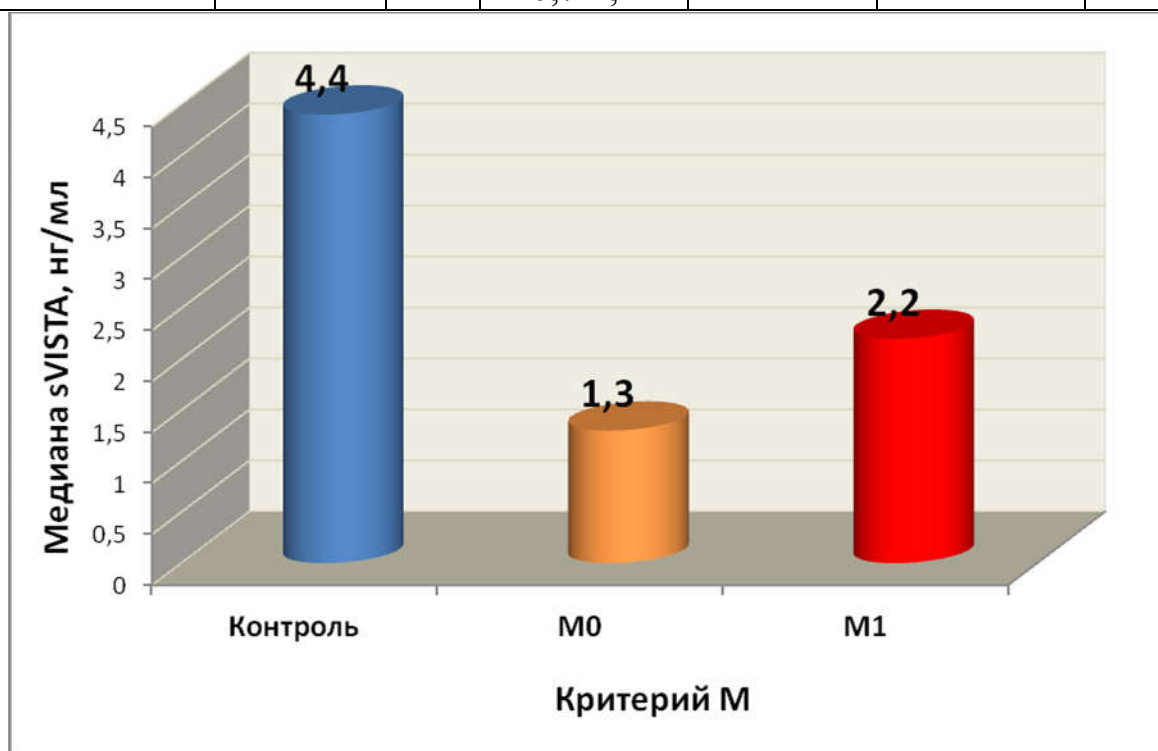


Рисунок 27. Медианы концентраций sVISTA в группах больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от критерия М.

Таблица 23.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров и больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от клиничко-рентгенологической стадии опухолевого процесса

Группа	Стадия	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA ≤2,0 нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3	-	13 (30,9%)	-
Злокачественные новообразования костей	¹ Ia	5	0,8; 0,3-18,0	0,75; ⁰ vs ^{1,2,3,5,6,7} >0,05 ¹ vs ⁴ =0,04	4 (80,0%)	0,3
	² Ib	4	9,1; 0,2-51,2		2 (50,0%)	
	³ IIa	12	2,0; 1,3-7,1		5 (45,5%)	
	⁴ IIb	67	1,1; 0,4-10,2		40 (59,7%)	
	⁵ III	12	1,5; 1,0-5,3		8 (66,7%)	
	⁶ IVa	6	3,4; 1,4-7,4		2 (33,3%)	
	⁷ IVb	6	2,0; 1,4-9,3		3 (50,0%)	

В таблице 23 и на рисунке 28 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от клиничко-рентгенологической стадии опухолевого процесса. Не установлено статистически значимой связи концентраций исследованного маркера со стадией заболевания ($p=0,75$).



Рисунок 28. Медианы концентрации sVISTA в группах больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от стадии заболевания.

Однако, выявлены достоверно низкие концентрации sVISTA в сыворотке крови пациентов с IIb стадией опухолевого процесса по сравнению с контролем ($p=0,049$) (рисунок 28).

В таблице 24 представлены данные концентраций sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Не установлено значимой связи концентраций маркера со степенью дифференцировки сарком ($p=0,57$; таблица 24). Однако медиана концентрации sVISTA была статистически значимо ниже в группе больных злокачественными новообразованиями со степенью дифференцировки опухоли G2 по сравнению с таковой в контроле ($p=0,049$).

Таблица 24.

Концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей с учетом степени дифференцировки опухоли

Группа	Степень дифференцировки опухоли	N	sVISTA нг/мл, медиана; квартили	P	Частота выявления sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл	P
⁰ Контроль	-	42	4,7; 1,2-12,3	-	13 (30,9%)	-
Злокачественные новообразования костей	¹ G1	8	1,5; 0,8-5,7	$0,57$; $0_{vs1,3} > 0,05$; $0_{vs2} = 0,049$	5 (62,5%)	0,7
	² G2	21	1,1; 0,7-3,8		14 (66,7%)	
	³ G3	83	1,6; 0,5-10,2		46 (56,8%)	

Таким образом, полученные нами данные о концентрации sVISTA в сыворотке крови больных саркомами костей не отражали основные характеристики заболевания – стадию, критерии системы TNM и степень дифференцировки опухоли. Однако, отмечена статистически значимое различие уровней маркера в между группой контроля и больными саркомой кости IIb стадии, при критерии T2 системы TNM и степенью дифференцировки опухоли G2.

3.5. Связь концентрации sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с показателями sPD-1, sPD-L1, sRANKL.

Исследовали концентрации sPD-1, sPD-L1, sRANKL в сыворотке крови больных новообразованиями костей и в контроле. Провели сравнительный анализ концентраций маркеров в крови больных и здоровых доноров, данные представлены в таблице 25.

Таблица 25.

Концентрации sPD-1, sPD-L1, sRANKL в сыворотке крови больных новообразованиями костей и в контроле

Группа	N	sPD-1 пг/мл	sPD-L1 пг/мл	N	sRANKL пмоль/л
		Пределы колебания; медиана; квартили			Пределы колебания; медиана; квартили
⁰ Контроль	29	22,4-124,9 48,7; 36,8-52,9	0,0-56,5; 7,61; 6,1-15,5	29	0,0-0,18 0,18; 0,08-0,21
¹ Новообразования костей (общая группа)	92	10,9-110; 50,1; 28,6-68,6	4,9-1151; 21,9; 15,7-28,8	35	0,2-2,3; 0,4; 0,3-0,7
¹¹ Пограничные новообразования костей	10	52,0-86,0; 67,8; 55,8-72,3	4,9-53,3; 23,0; 11,9-27,9	10	0,2-1,7; 0,7; 0,3-1,3
¹² Злокачественные новообразования костей	82	10,9-110; 47,5; 26,3-67,0	6,1-1151; 21,9; 16,1-21,9	25	0,2-2,3; 0,3; 0,2-0,5
P		$_{0vs1}=0,51$; $_{11vs12}=0,013$; $_{0vs11}=0,0006$; $_{0vs12}=0,9$	$_{0vs1}<0,0001$; $_{11vs12}=0,58$; $_{0vs11}=0,022$; $_{0vs12}<0,0001$		$_{0vs1}=0,0001$; $_{11vs12}=0,017$; $_{0vs11}=0,0001$; $_{0vs12}=0,0002$

Как следует из данных, представленных в таблице 25, медианы концентраций sPD-1 в сыворотке крови здоровых доноров и в общей группе больных новообразованиями костей не различались ($p=0,51$) и составили 48,7 и 50,1 пг/мл соответственно. В то же время, в группе больных пограничными новообразованиями костей концентрации sPD-1 в сыворотке крови были

статистически значимо выше как по сравнению с контролем ($p=0,0006$), так и с больными злокачественными опухолями костей ($p=0,013$), а медианы этого рецептора в указанных группах составили соответственно: пограничные опухоли - 67,8 пг/мл, контроль - 48,7 пг/мл, злокачественные опухоли - 47,5 пг/мл (рисунок 29).

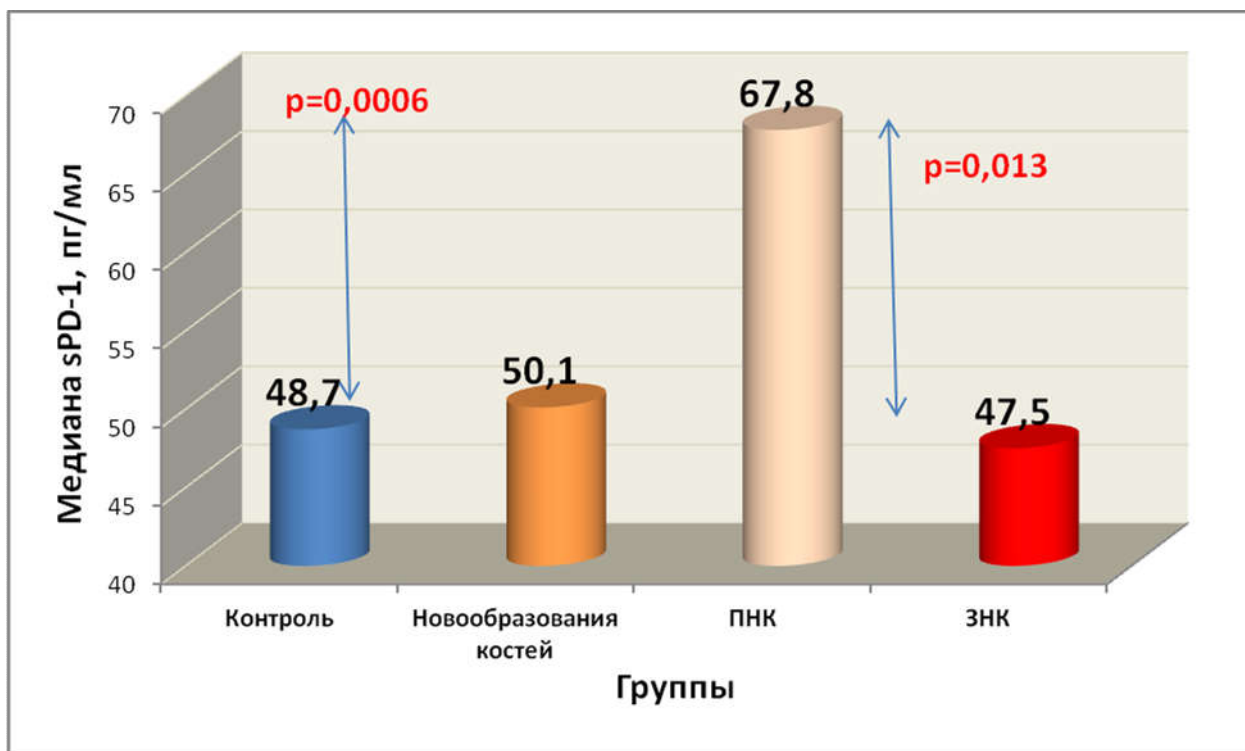


Рисунок 29. Медианы концентрации sPD-1 в группах больных новообразованиями костей и в контроле.

В то же время концентрации sPD-L1 были значимо ниже в контроле по сравнению с больными новообразованиями костей всех групп, при этом в группе больных саркомами костей различия были высокосignificantными ($p<0,0001$). Медианы маркера составили 7,61 пг/мл - в контроле, 21,9 пг/мл - в группе больных злокачественными опухолями ($p=0,022$) и 23,0 пг/мл - в группе больных пограничными опухолями ($p=0,0001$), данные представлены на рисунке 30.

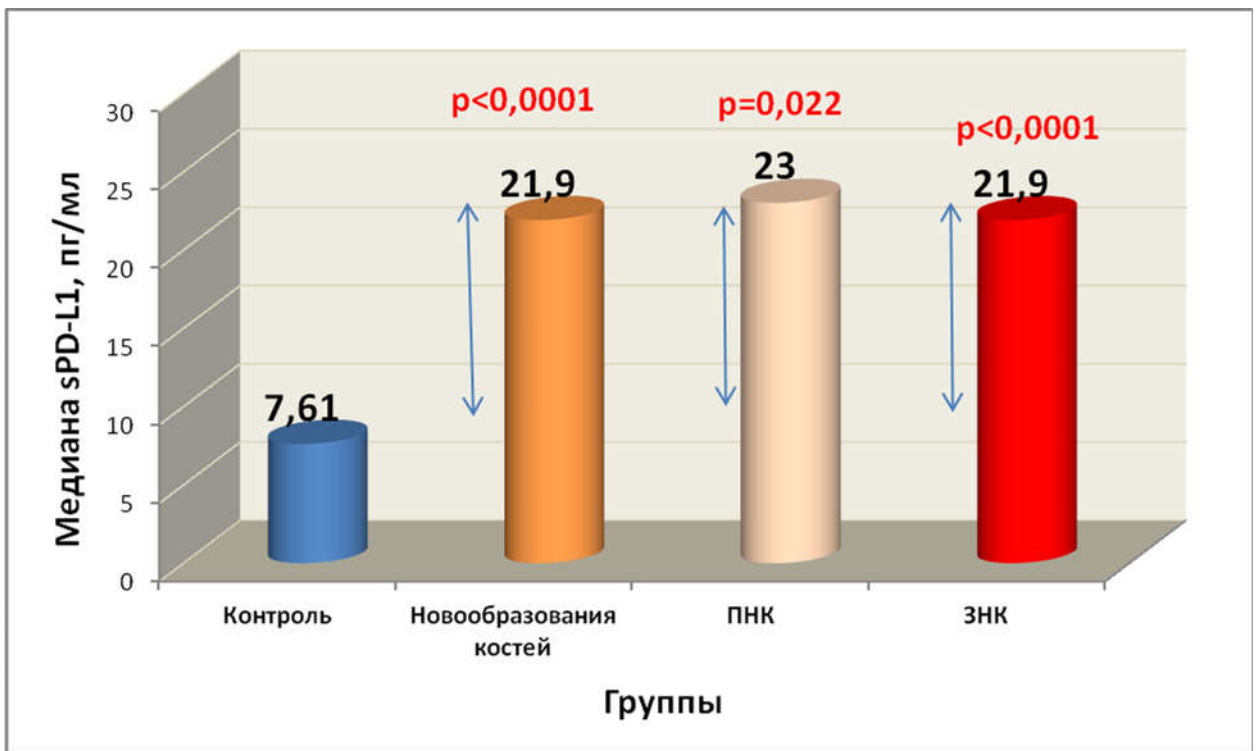


Рисунок 30. Медианы концентрации sPD-L1 в группах больных новообразованиями костей и в контроле.

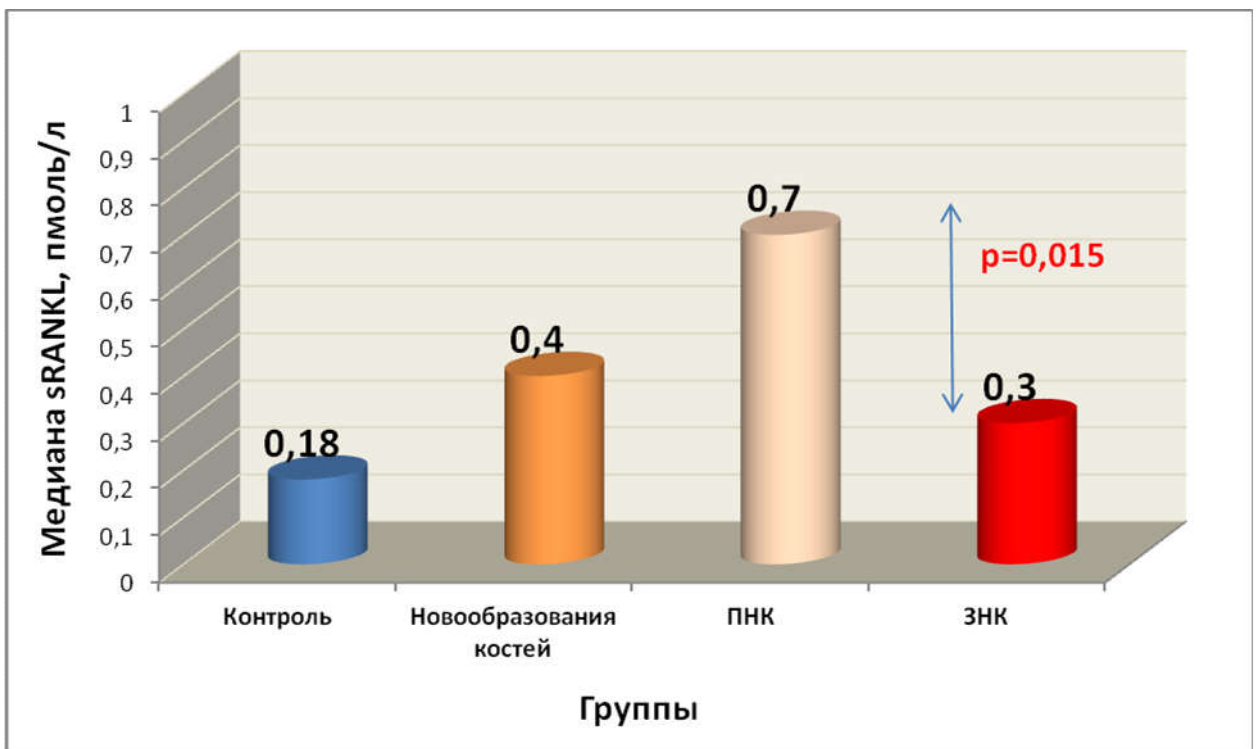


Рисунок 31. Медианы концентрации sRANKL в группах больных новообразованиями костей и в контроле.

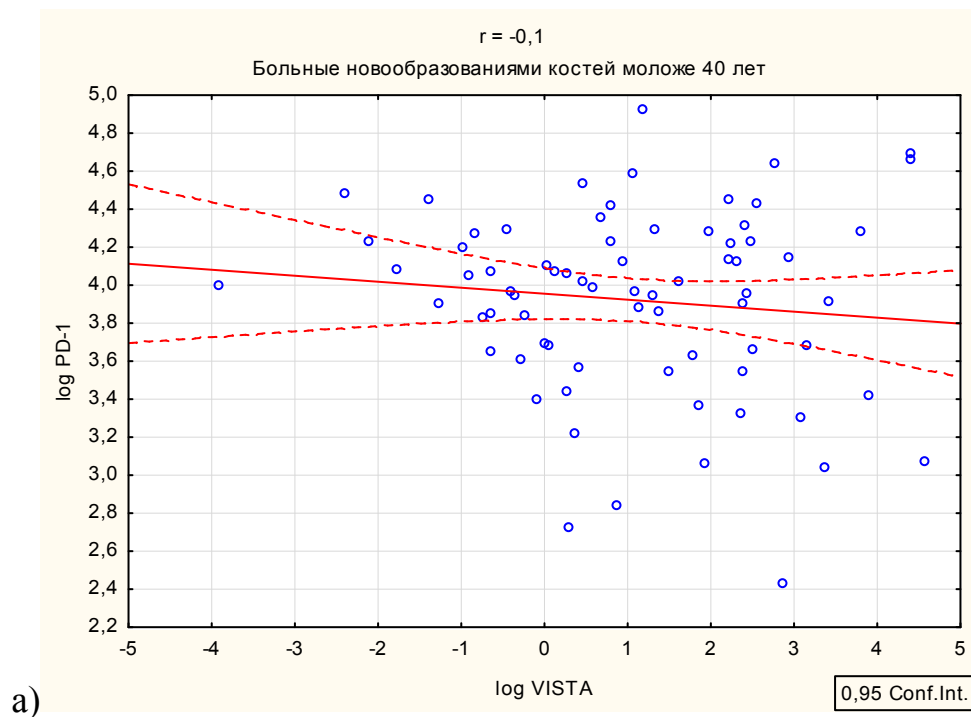
Медиана концентрации sRANKL была статистически значимо ниже в сыворотке крови больных саркомами костей (0,3 пмоль/л) по сравнению с группой пограничных опухолей (0,7 пмоль/л; $p=0,015$) (рисунок 31).

В группе больных новообразованиями костей установлена слабая прямая корреляционная зависимость между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови ($r_s=0,22$; $p<0,05$). В группе больных злокачественными опухолями костей указанная зависимость равнялась ($r_s=0,24$; $p<0,05$). При этом концентрации sVISTA не были связаны с уровнями sPD-L1, sRANKL определенными в сыворотке крови больных саркомами костей. В группе больных злокачественными новообразованиями костей концентрации sPD-1 были связаны с уровнями sRANKL прямой корреляционной зависимостью ($r_s=0,48$; $p<0,05$).

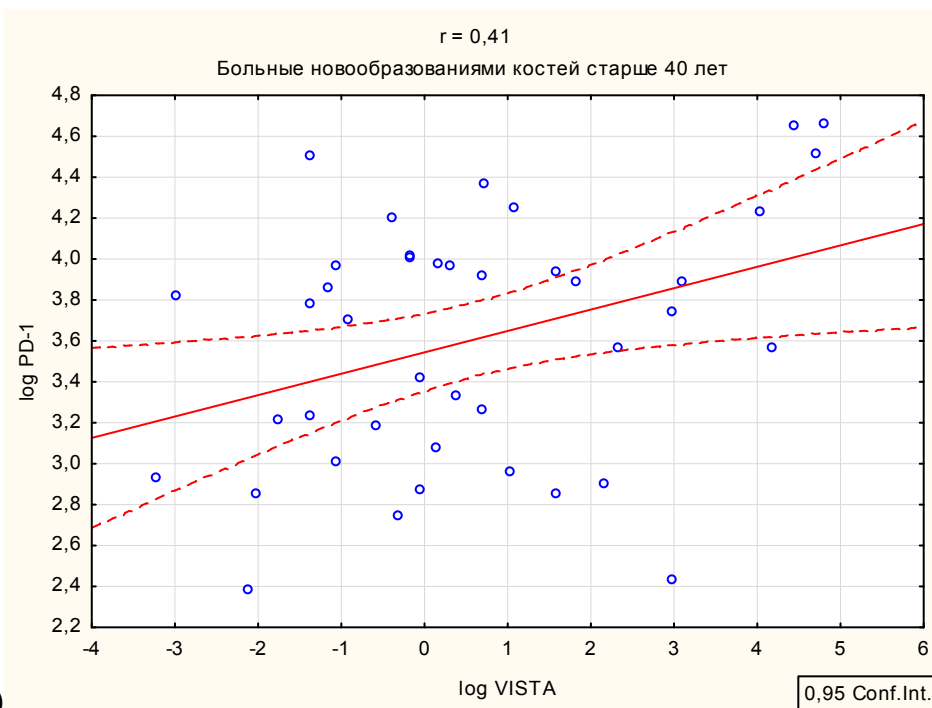
Корреляционная зависимость между sPD-1 и sRANKL была обратной и незначимой в группе пациентов с пограничными опухолями костей ($r_s= -0,6$; $p>0,05$).

Зависимость между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей не отражала основные клинические характеристики заболевания – стадию, критерии TNM, степень дифференцировки опухоли.

Нами выявлено, что корреляционная связь между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей отсутствовала в группе пациентов в возрасте до 40 лет, но усиливалась до статистически значимого уровня ($r_s=0,41$; $p<0,05$) у пациентов старше 40 лет (рисунок 32).



а)



б)

Рисунок 32. Корреляционная зависимость между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови больных новообразованиями костей: а) до 40 лет, б) старше 40 лет.

При этом, корреляционная зависимость между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови была наиболее выражена в общей группе больных саркомой Юинга и хордовой кости ($r_s=0,63$; $p<0,05$) и была слабой или отсутствовала при других гистологических вариантах опухолей.

Зависимость между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей усиливалась при поражении губчатых костей до значения ($r_s=0,59$; $p<0,05$), снижалась до незначимого уровня при поражении плоских костей ($r_s=0,39$; $p<0,05$) и отсутствовала при поражении трубчатых костей ($r=0$).

Зависимость между концентрациями sVISTA и sPD-1 в сыворотке крови больных саркомами костей усиливалась при поражении костей крестца и ребер до значения ($r_s=0,65$; $p<0,05$).

Таким образом, при некоторых клинико-морфологических факторах концентрации sVISTA были прямо пропорционально ассоциированы с концентрациям sPD-1 в сыворотке крови.

Рассчитали коэффициенты соотношения sPD-1/sVISTA, sPD L1/sVISTA, sRANKL/sVISTA в обследованных группах больных. Результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26.

Показатели коэффициентов соотношений sPD-1/sVISTA, sPD L1/sVISTA, sRANKL/sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей

Группа	N	sPD-1/ sVISTA	sPD-L1/ sVISTA	N	sRANKL/ sVISTA
		Пределы колебаний; медиана; квартили			Пределы колебаний; медиана;
¹ Новообразования костей (общая группа)	92	0,22-982,8; 24,3 5,2-70,7	0,05-287,8 11,4; 2,9-30,1	35	0,01-10,8; 0,3; 0,06-1,2
¹¹ Пограничные опухоли костей	10	0,44-571,5 52,2; 9,4-156,5	0,17-232,0; 19,1; 2,1-23,9	10	0,1-10,8; 0,3; 0,6-2.45
¹² Злокачественные опухоли костей	82	0,22-982,8; 22,8; 4,5-59,6	0,05-287,8; 11,2 2,14-23,9	25	0,02-3,65; 0,3; 0,1-1,1
P		$_{11vs12}=0,2$	$_{11vs12}=0,8$		$_{11vs12}=0,6$

Наибольшие медианы коэффициентов соотношения sPD-1/sVISTA (56,2) и sPD-L1/sVISTA (11,4) обнаружены у больных пограничными

новообразованиями костей (таблица 26). Однако, не выявлено статистически значимых различий между показателями коэффициентов соотношений sPD-1/sVISTA, sPD-L1/sVISTA, sRANKL/sVISTA в группах больных пограничными и злокачественными новообразованиями костей.

Рассчитали концентрации sPD-1, sPD-L1 и sRANKL в основных группах с уровнями sVISTA менее и более 2,0 нг/мл (таблица 27).

Таблица 27.

Концентрации sPD-1, sPD-L1, sRANKL при уровнях sVISTA в сыворотке крови менее и более 2,0 нг/мл в сыворотке крови больных опухолями костей

Группы	sVISTA	sPD-1	sPD-L1	sRANKL
		пг/мл	пг/мл	пмоль/л
Медиана; квантили				
¹ Новообразования костей (общая группа)	<2 нг/мл	46,4; 26,3-58,1	19,6; 15,4-26,2	0,47; 0,2-0,7
	≥2 нг/мл	57,1; 34,7-81,0	25,8; 18,5-34,2	0,4; 0,3-0,6
	P	0,051	0,046	0,9
¹¹ Пограничные опухоли костей	<2 нг/мл	55,8; 53,2-67,0	18,1; 11,9-20,9	0,8; 0,7-1,3
	≥2 нг/мл	76,1; 65,6-84,6	25,2; 15,0-39,3	0,7; 0,5-1,0
	P	0,063	0,5	0,6
¹² Злокачественные опухоли костей	<2 нг/мл	43,8; 25,5-57,4	19,8; 16,1-26,2	0,4; 0,2-0,5
	≥2 нг/мл	50,8; 31,2-76,8	26,2; 18,5-34,2	0,3; 0,3-0,4
	P	0,1	0,08	0,9

Как следует из данных таблицы 27, в общей группе больных злокачественными новообразованиями костей выявлена тенденция к различию медиан концентрации sPD-1 у пациентов с уровнями sVISTA в сыворотке крови < и ≥ 2,0 нг/мл (соответственно 46,4 и 57,1 пг/мл; p=0,05) (рисунок 33). Эта закономерность была характерна как для пограничных, так и для злокачественных опухолей костей.

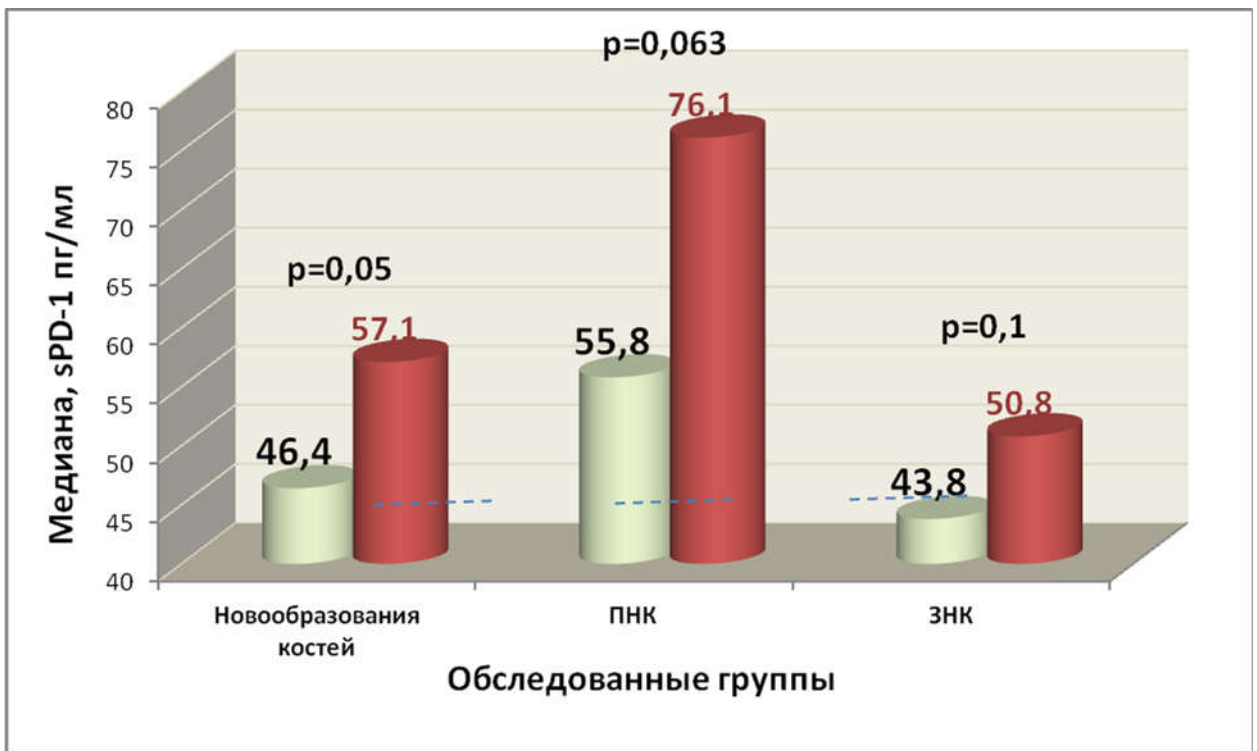


Рисунок 33. Медианы концентраций sPD-1 в группах больных новообразованиями костей, разделенных по порогу sVISTA в сыворотке крови менее и более 2,0 нг/мл.

В общей группе больных злокачественными опухолями костей выявлено статистически значимое различие медиан концентраций sPD-L1 у пациентов с уровнями sVISTA < и ≥ 2,0 нг/мл (соответственно 19,6 и 25,8 пг/мл; $p=0,046$), данные представлены на рисунке 34.

Эта закономерность была характерна как для пограничных, так и для злокачественных новообразований костей.

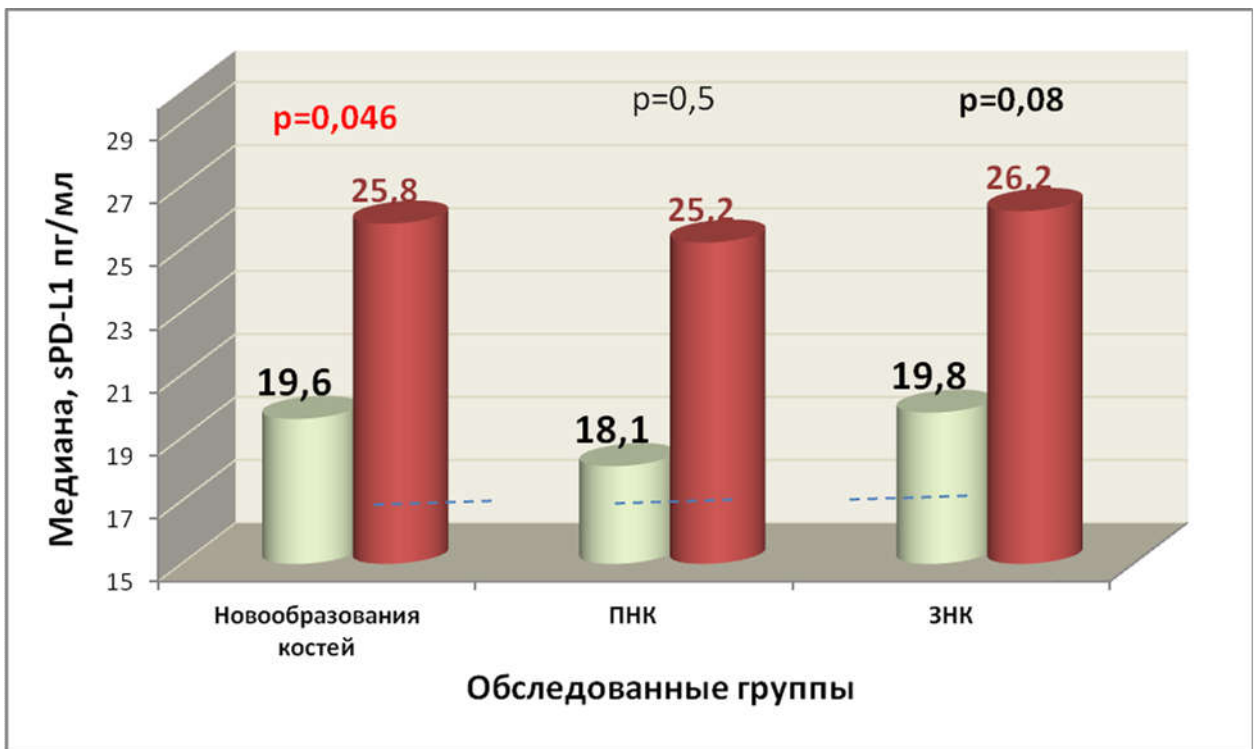


Рисунок 34. Медианы sPD-L1 в группах больных новообразованиями костей, разделенных по порогу sVISTA менее и более 2 нг/мл.

Концентрации sRANKL не зависели от уровней sVISTA менее и более 2,0 нг/мл, исследованных в сыворотке крови больных новообразованиями костей.

Не изучали различия концентраций sPD-1, sPD-L1 и sRANKL при уровнях sVISTA менее и более 2,0 нг/мл в зависимости от клинических факторов в связи с малочисленностью групп.

Подводя итоги сравнительного анализа содержания растворимой формы контрольной точки иммунитета VISTA в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля и больных первичными пограничными и злокачественными новообразованиями костей различного гистологического строения выявили следующие особенности. Прежде всего нами обнаружено статистически значимое увеличение медианы концентрации sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля по сравнению с таковой в общей группе больных новообразованиями костей (соответственно 4,7 и 1,4 нг/мл; $p=0,01$). При этом, наименьшая медиана концентрации sVISTA обнаружена в группе пациентов с пограничными (гигантоклеточными)

опухолями костей (0,8 нг/мл), однако статистические различия с таковой концентрацией маркера в группе больных злокачественными новообразованиями костей не значимы (1,4 нг/мл) ($p=0,3$).

При этом, показано, что частота выявления уровней sVISTA по порогу 2,0 нг/мл в контроле и у больных новообразованиями костей статистически значимо различалась ($p=0,016$). Так, условно низкие концентрации sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл обнаружены у 30,9% обследованных в группе контроля и у 59,2% больных новообразованиями костей. Однако частота значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл в группе больных пограничными опухолями 61,5% и была сопоставима с таковой в группе больных злокачественными новообразованиями костей (58,9%).

Кроме того, заметно низкие концентрации маркера обнаружены в общей группе женщин, больных новообразованиями костей (1,0 нг/мл) по сравнению с пациентами мужского пола (1,5 нг/мл; $p=0,17$). Выявлена незначимо меньшая медиана концентрации sVISTA в группе больных злокачественными опухолями костей женщин (1,0 нг/мл) по сравнению с таковыми в группе больных мужчин (1,8 нг/мл; $p=0,12$). При этом частота выявления значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл составила в сыворотке крови женщин группы контроля 26,1%, а в группе больных злокачественными опухолями костей женщин была в 2,3 раза статистически значимо выше (61,8%) ($p=0,015$).

На наш взгляд, интересные данные выявлены нами в уровне маркера с учетом возраста больных опухолями костей. Так, в группе больных саркомами костей обнаружена обратная корреляционная статистически значимая зависимость между возрастом и концентрацией sVISTA в сыворотке крови ($r_s = -0,21$; $p < 0,05$), стало быть, меньшие концентрации sVISTA чаще выявляли у больных более старшего возраста. Обнаружена тенденция к меньшим концентрациям маркера в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в возрасте старше 18 лет по сравнению с таковыми у здоровых доноров старше 18 лет (1,3 нг/мл и 4,4

нг/мл соответственно; $p=0,05$) и злокачественными новообразованиями костей в возрасте младше 18 лет по сравнению с таковыми у здоровых доноров младше 18 лет (соответственно 2,2 и 5,32 нг/мл; $p=0,032$). При этом наибольшая медиана концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей выявлена у пациентов в возрасте моложе 18 лет (2,2 нг/мл), а наименьшие – у пациентов старше 60 лет (0,4 нг/мл; $p=0,17$). Частота значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл была наименьшей у пациентов в возрасте до 30 лет (50%) и наибольшей у пациентов старше 60 лет (83,3%).

Нами выявлена связь концентраций sVISTA в сыворотке крови с гистологическим вариантом строения новообразования кости. Так, наименьшая медиана уровня маркера обнаружена в группе больных хордовой кости (0,5 нг/мл), наибольшая – у больных саркомой Юинга (2,6 нг/мл; $p=0,0068$). Также медиана уровня sVISTA у пациентом гигантоклеточной опухолью была достоверно ниже, чем у больных саркомой Юинга (соответственно 0,7 и 2,6 нг/мл) ($p=0,033$). Различия медиан маркера в контроле и у больных хордовой были статистически значимы ($p=0,018$). Частота значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл была наименьшей у пациентов с саркомой Юинга (40%) и наибольшей у больных хордовой кости (85,7%).

Нами отмечена связь концентраций sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с локализацией опухоли в костях скелета ($p=0,018$). Так, статистически значимо бóльшая медиана маркера выявлена при опухолевом поражении костей верхних конечностей (9,1 нг/мл; $p=0,018$). Концентрации sVISTA в группе пациентов с поражением костей нижних конечностей были статистически значимо ниже, чем в контроле (1,1 и 4,4 нг/мл соответственно, $p=0,015$) и значимо ниже, чем у пациентов с поражением костей верхних конечностей ($p=0,01$). Так же выявлено достоверное различие уровней маркера между группой контроля и больными новообразованиями костей нижних конечностей (4,7 и 1,1 нг/мл; $p=0,04$). При этом, частота значений sVISTA ≤ 2 нг/мл была наименьшей у пациентов

с поражением костей верхних конечностей (17,7%) и колебалась в широком диапазоне (62,5-68,4%) у больных с другой локализацией опухоли в костях скелета ($p=0,0012$).

Отмечена значимая связь уровней sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с видом пораженной опухолью кости. Так, статистически значимо меньшая медиана маркера обнаружена при опухолевом поражении большеберцовой кости (0,4 нг/мл), крестца (0,54 нг/мл) и бедренной кости (1,1 нг/мл), а наибольшая – при поражении опухолью плечевой кости (9,7 нг/мл; $p=0,01$). Концентрации показателя маркера у больных с поражением опухолью крестца, большеберцовой и бедренной костей были значимо ниже, чем в контроле ($p<0,05$). При этом, частота значений sVISTA ≤ 2 нг/мл была наименьшей у пациентов с поражением плечевой кости (21,4%) и была наибольшей у больных с поражением крестца (81,3%) и большеберцовой кости (81,3%; $p=0,001$).

Не установлено значимой связи концентраций sVISTA в сыворотке крови с типом пораженной опухолью кости ($p>0,05$). Наименьшая медиана маркера выявлена в группе больных злокачественными опухольями губчатых костей (0,7 нг/мл), частота выявления значений sVISTA ≤ 2 нг/мл в этой группе была наибольшей и составила 76,2%. Медиана концентрации sVISTA была статистически значимо ниже в группе больных злокачественными новообразованиями губчатых костей по сравнению с таковой в контроле ($p<0,05$).

К сожалению, нами не установлено значимой связи концентраций sVISTA в сыворотке крови больных саркомами костей с критериями системы TNM, стадией заболевания и степенью дифференцировки опухоли, за исключением некоторых критериев. При этом, следует указать о сильной тенденции к различию при сравнении уровней маркера в сыворотке крови больных с группой контроля по следующим критериям: стадия IIb, критерий системы T2 и степень дифференцировки опухоли G2.

Большой интерес для нас представлял анализ связи уровней sVISTA с основными компонентами контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1, а именно, растворимыми формами рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1. Провели анализ связи показателей sVISTA с RANKL - ключевым компонентом системы RANK/RANKL/OPG, участвующим в формировании костных метастазов разных опухолей, который представляет собой лиганд рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF- κ B. В группе больных злокачественными новообразованиями костей указанная зависимость составила ($r_s=0,24$; $p<0,05$). Концентрации sVISTA не были связаны с уровнями sPD-L1 и sRANKL, определенными в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей. Однако указанная зависимость усиливалась в группе пациентов в возрасте старше 40 лет до значения ($r_s=0,41$; $p<0,05$), в группе больных саркомой Юинга и хордовой кости ($r_s=0,63$; $p<0,05$), при поражении губчатых костей до значения ($r_s=0,59$; $p<0,05$), при поражении крестца и ребер до значения ($r_s=0,65$; $p<0,05$). Кроме того, нами обнаружена в 2 раза бóльшая медиана коэффициента соотношения sPD-1/sVISTA в группе больных новообразованиями костей (25,1) по сравнению с контролем (12,5; $p=0,19$). Соотношение медиан sPD-L1/sVISTA было статистически значимо выше в группе больных новообразованиями костей по сравнению с контролем (соотношения различались в 4,6 раза и составили соответственно 11,9 и 2,5; $p=0,008$). Не обнаружено различий в коэффициентах соотношений маркеров sPD-1/sVISTA, sPD-L1/sVISTA и sRANKL/sVISTA в группах пациентов с пограничными и злокачественными новообразованиями костей. Вместе с тем, выявлена сильная тенденция к различию концентраций sPD-1 в подгруппах больных новообразованиями костей с уровнями sVISTA менее и более 2,0 нг/мл (медианы составили 46,4 и 57,1 пг/мл; $p=0,05$). Обнаружено статистически значимое различие медиан концентраций sPD-L1 в подгруппах больных новообразованиями костей с уровнями sVISTA менее и более 2,0 нг/мл (соответственно 19,6 и 25,8 пг/мл; $p=0,046$). Концентрация sRANKL не различались в группах больных

новообразованиями костей с уровнями sVISTA менее и более 2,0 нг/мл, исследованных в сыворотке крови.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об определенных связях выше исследованных маркеров sVISTA сыворотки крови с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразований костей, а также с sPD-1, sPD-L1 и sRANKL.

ГЛАВА IV.

ОБЩАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

4.1. Выживаемость больных злокачественными опухолями костей в зависимости от клинико-морфологических факторов.

Отдаленные результаты лечения больных злокачественными новообразованиями костей оценены у 81 пациента (прослеженность 72,4%). Наибольший срок наблюдения равнялся 55,2 месяцам, при этом 16 больных умерли в сроки от 3 до 32,1 месяцев после начала лечения. У 21 больного саркомой кости выявлено прогрессирование заболевания.

Показатель 1-летней общей выживаемости пациентов в общей группе составил $89,7 \pm 4,0\%$, 2-летней – $81,3 \pm 5,4\%$, 3-летней – $63,5 \pm 7,9\%$. Медиана срока жизни не была достигнута на 3-летнем сроке наблюдения.

Проанализировали общую выживаемость в группах больных злокачественными новообразованиями костей с учетом гистологического строения опухоли. Результаты представлены в таблице 28.

Таблица 28.

Общая выживаемость больных злокачественными новообразованиями костей
в зависимости от гистологического строения опухоли

Группы	N	Умерло	Прогрес- сирование	Общая выживаемость (%)		
				1-летняя	2-летняя	3-летняя
Хордома	11	-	3 (27,3%)	100	100	100
ХС	30	3 (10,0%)	5 (16,7%)	100	87,2±8,6	76,3±12,7
ОС	30	12 (40,0%)	12 (40,0%)	72,1±9,7	55,2±11,4	34,5±11,8
СЮ	8	1 (12,5%)	2 (25,0%)	100	100	50,0±35,3
ХС нетип.	1	-	-	Жив на сроке 12,2 мес.		
ОС нетип.	1	-	-	Жив на сроке 30,7 мес.		
P	0,00097					

Как следует из данных таблицы 28, общая выживаемость больных злокачественными новообразованиями костей значимо зависела от гистологического строения опухоли ($p=0,00097$). Наилучший показатель 3-летней общей выживаемости выявлен в группе больных хордомой (100%), а наихудшая – в группе больных типичной остеосаркомой (34,5±11,8%) кости, медиана срока жизни составила всего 25,3 месяца после начала лечения.

Показатель 3-летней общей выживаемости больных саркомой Юинга также был низким и составил 50,0±35,3%, однако следует отметить, что группа была малочисленна, а срок прослеженности в этой группе также был наименьшим.

Показатель 3-летней общей выживаемости больных типичной хондросаркомой составил 76,3±12,7% (рисунок 35).

Таким образом, морфологический вариант опухоли кости является определяющим фактором в прогнозе длительности жизни больных злокачественными опухолями костей.

Частота прогрессирования опухолевого процесса при указанном сроке наблюдения была наибольшей в группе пациентов с типичной остеосаркомой (40,0%) и наименьшей в группе больных типичной хондросаркомой (16,7%). В группе больных хордомой кости частота прогрессирования составила 27,3%, в группе больных саркомой Юинга – 25,0%.

Другие клинические факторы не определяли значимо отдаленные результаты лечения больных злокачественными новообразованиями костей.

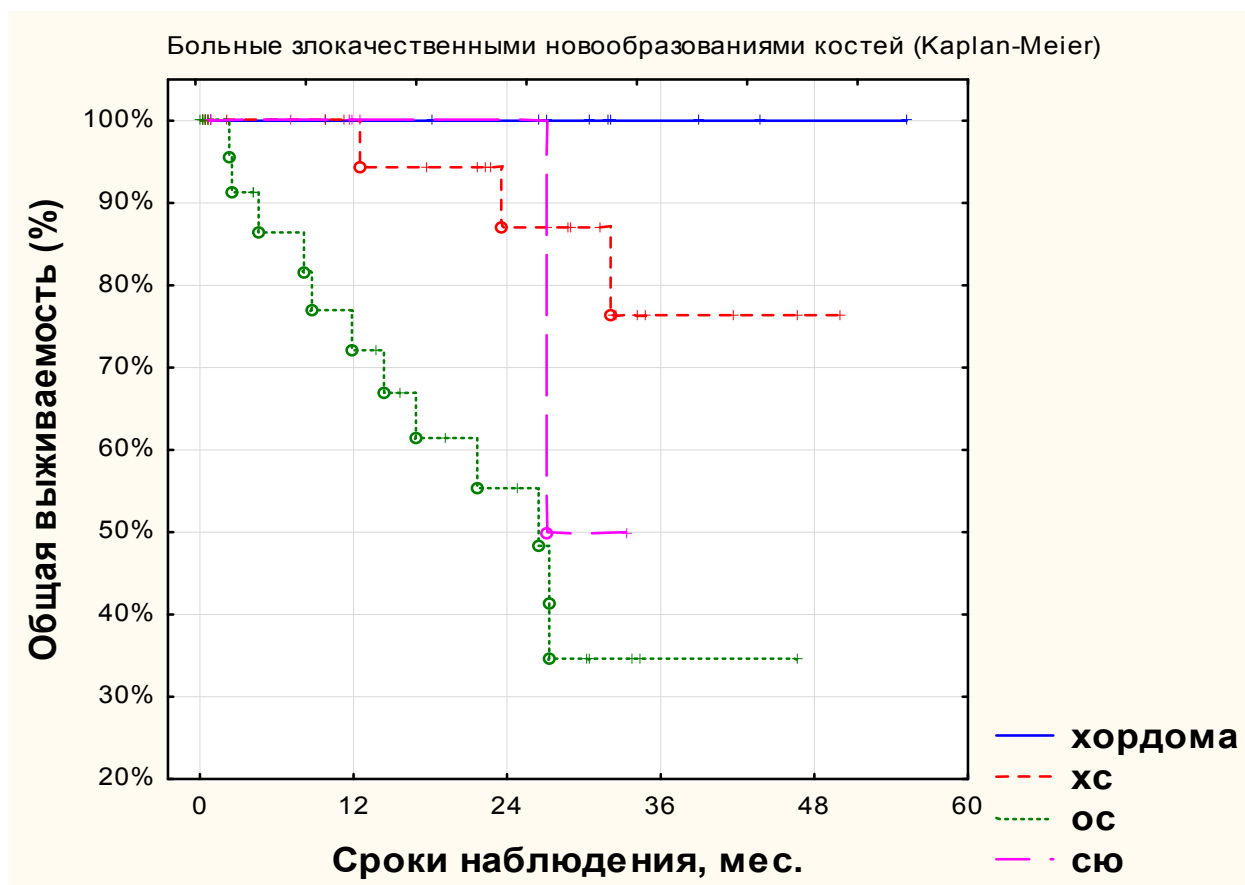


Рисунок 35. Общая выживаемость больных злокачественными новообразованиями костей в зависимости от гистологического строения опухоли.

Ранее нами было указано, что неблагоприятная G3 степень дифференцировки опухоли преобладала у большинства обследованных больных злокачественными опухолями костей. В связи с этим проанализировать связь степени дифференцировки сарком костей с отдаленными результатами лечения в этих группах не представлялось возможным.

В то же время, в группе больных типичной остеосаркомой кости при G1 степени дифференцировки опухоли показателей общей 3-летней выживаемости составил 100%, при G2 и G3 он не превышал 75% ($p > 0,05$).

В группе больных типичной хондросаркомой кости при критерии распространенности T1 показатель 3-летней общей выживаемости составил

100%, при критерии T2 – $90,9 \pm 8,7\%$, при критерии T3 снижался до $33,3 \pm 27,2\%$, (однако различия из-за малочисленности групп были статистически незначимы, $p=0,4$).

В группе из 3-х больных типичной остеосаркомой кости с критерием распространенности T1 все пациенты умерли, не пережив 3 года от начала лечения, при критерии T2 3-летняя общая выживаемость составила $40,6 \pm 13,2\%$, при критерии T3 - все 5 пациенты были живы на этапе выполнения исследования (различия статистически незначимы $p>0,05$).

В группе больных саркомой Юинга связь с критерием T1 не проводили из-за малочисленности наблюдений.

В группе больных типичной хондросаркомой кости критерий M1 не выявлен.

В группе больных типичной остеосаркомой критерий M1 выявлен у 4-х больных и связь этого фактора с отдаленными результатами лечения не проводили.

Не установлено связи отдаленных результатов лечения с типом пораженной кости.

Отметим, что все 6 больных типичной хондросаркомой и остеосаркомой кости с опухолевым поражением грудной клетки были живы на всем периоде наблюдения. Напротив, в группе из 9 больных типичной остеосаркомой с опухолевым поражением костей таза 3-летняя общая выживаемость составила всего $29,2 \pm 17,2\%$ с медианой срока жизни 12 месяцев, а в группе из 17 пациентов с опухолевым поражением нижних конечностей до $29,8 \pm 16,9\%$.

В группе из 12 больных типичной хондросаркомой с опухолевым поражением костей таза 3-летняя общая выживаемость незначительно снижалась до $85,7 \pm 13,2\%$, а в группе из 7 пациентов с опухолевым поражением нижних конечностей до $75,0 \pm 21,7\%$. Все наблюдаемые различия статистически незначимы.

4.2. Связь отдаленных результатов лечения больных злокачественными новообразованиями костей с учетом концентрации sVISTA в сыворотке крови.

В группе больных хордомой не установлено связи отдаленных результатов лечения с уровнями sVISTA в сыворотке крови пациентов, так как все больные были живы на этапе проведения исследования.

В группе больных типичной хондросаркомой кости статистически значимо худшие отдаленные результаты лечения отмечены при концентрациях sVISTA в сыворотке крови менее 1,0 нг/мл ($p=0,033$; таблица 29; рисунок 36).

Таблица 29.

Общая выживаемость больных типичной хондросаркомой кости в зависимости от уровня sVISTA в сыворотке крови

sVISTA нг/мл	N	Умерло	Прогрес- сирование	Общая выживаемость (%)		
				1-летняя	2-летняя	3-летняя
$\leq 1,0$	13	3 (23,1%)	4 (30,8%)	100	66,7 \pm 19,2	44,4 \pm 22,2
$> 1,0$	17	-	1 (5,9%)	100	100	100
P	$p=0,033$					

Так, в группе из 17 больных типичной хондросаркомой кости с концентрациями sVISTA в сыворотке крови $> 1,0$ нг/мл показатель общей 3-летней выживаемости составил 100%, а частота прогрессирования - 5,9%. Напротив, в группе пациентов с концентрациями sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл уже показатель 2-летней общей выживаемости снизился до 66,7 \pm 19,2%, а 3-летней до 44,4 \pm 22,2%, при этом частота прогрессирования опухолевого процесса была в 5,2 раза выше (30,8%). Таким образом, определение концентрации sVISTA в сыворотке крови больных типичной хондросаркомой кости может уточнить общий прогноз заболевания.

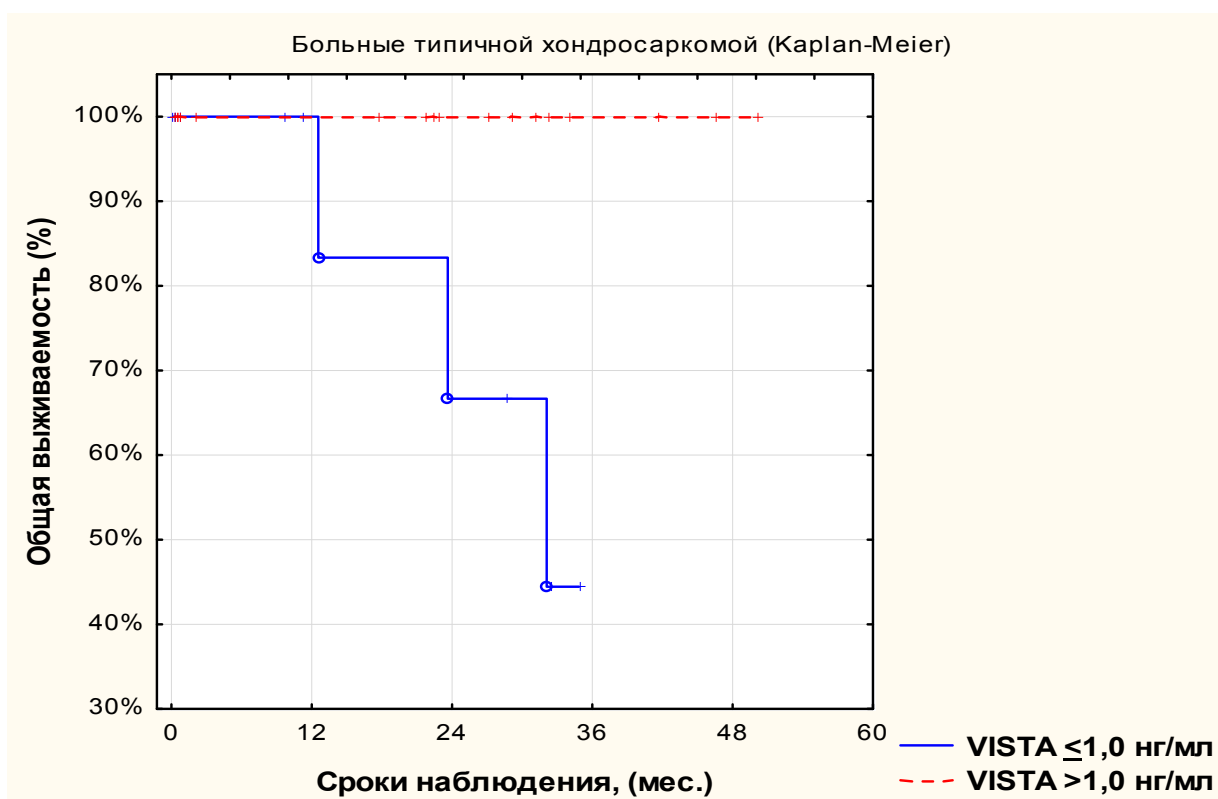


Рисунок 36. Общая выживаемость больных типичной хондросаркомой кости в зависимости от уровней sVISTA менее и более 1,0 нг/мл.

В то же время, в группе больных типичной остеосаркомой кости статистически значимой связи отдаленных результатов лечения с учетом концентрации sVISTA в сыворотке крови не отмечено ($p=0,7$; таблица 30; рисунок 37).

Таблица 30.

Общая выживаемость больных типичной остеосаркомой кости с учетом
уровня sVISTA в сыворотке крови

sVISTA нг/мл	N	Умерло	Прогрес- сирование	Общая выживаемость (%)		
				1-летняя	2-летняя	3-летняя
≤1,0	7	4 (57,1%)	4 (57,1%)	83,3±15,2	50,0±20,4	25,0±20,4
>1,0	22	7 (31,8%)	7 (31,8%)	65,6±12,6	57,4±13,4	45,9±14,9
P	$p=0,7$					

Так, показатель 3-летней общей выживаемости в группе из 7 больных типичной остеосаркомой кости с концентрацией sVISTA ≤1,0 нг/мл составил

всего $25,0 \pm 20,4\%$ (медиана срока жизни 21,6 месяцев), а в группе из 22 пациентов с уровнями sVISTA $>1,0$ нг/мл – $45,9 \pm 14,9\%$ (медиана срока жизни 22,7 месяцев) (рисунок 37). При этом, частота прогрессирования в группе с концентрациями sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл составила 57,1%, а в группе с концентрациями sVISTA $>1,0$ нг/мл – 31,8% ($p=0,22$).

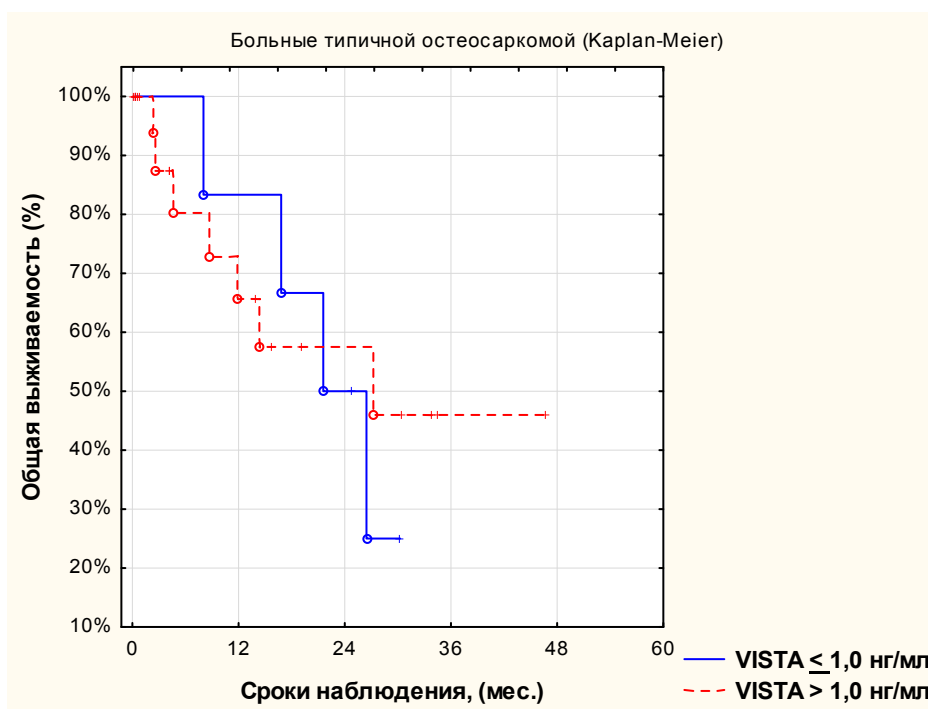


Рисунок 37. Общая выживаемость больных типичной остеосаркомой кости в зависимости от порогового уровня sVISTA менее и более 1,0 нг/мл.

В группе больных саркомой Юинга анализ связи отдаленных результатов лечения с концентрациями sVISTA не проводили из-за малого количества наблюдений.

Подводя итоги анализу результатов данной главы следует отметить:

- отдаленные результаты лечения больных злокачественными новообразованиями костей определяются преимущественно гистологическим вариантом строения опухоли ($p=0,00097$). Наилучшая 3-летняя общая выживаемость отмечена в группе больных хордомой (100%), а наихудшая – в группе больных типичной остеосаркомой кости ($34,5 \pm 11,8\%$); показатель 3-

летней общей выживаемости больных саркомой Юинга составил $50,0 \pm 35,3\%$, больных типичной хондросаркомой кости – $76,3 \pm 12,7\%$.

- В группе больных типичной хондросаркомой кости общая 3-летняя выживаемость снижалась со 100% при критерии T1 до $33,3 \pm 27,2\%$ при критерии T3 ($p=0,4$).

- Наиболее низкие отдаленные результаты лечения выявлены в группе больных типичной остеосаркомой кости с локализацией опухоли в костях таза (3-летняя общая выживаемость составила $29,2 \pm 17,2\%$) и при локализации опухоли в нижних конечностях ($29,8 \pm 16,9\%$).

- В группе больных типичной хондросаркомой кости выявлено статистически значимое ($p=0,033$) снижение отдаленных результатов лечения при концентрациях sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл (3-летняя общая выживаемость составила $44,4 \pm 22,2\%$), тогда как при уровнях сывороточного маркера более 1,0 нг/мл 3-летняя общая выживаемость составила 100%.

- Не обнаружили связи отдаленных результатов лечения больных типичной остеосаркомой кости с исходными до лечения концентрациями sVISTA в сыворотке крови.

- Общая выживаемость больных хондромой кости независимо от уровней sVISTA была наибольшей при 3-летнем сроке наблюдения и составила 100%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные опухоли костей считают одним из самых сложных разделов клинической и экспериментальной онкологии. Несмотря на относительно низкую частоту выявления злокачественных опухолей костей (сарком) среди различных солидных опухолей, они отличаются крайне агрессивным клиническим течением, быстрым метастазированием, неэффективностью существующих лекарственных методов терапии и низкими показателями выживаемости [86, 102, 135, 147]. Широкий спектр доброкачественных и злокачественных опухолей костей отличает их по частоте выявления, связи с

полом и возрастом, особенностям метастазирования и эффективностью хирургического и лекарственных методов лечения. Более подробно это описано во введении работы и обзоре литературы.

На современном этапе стандарты лечения сарком костей связаны в основном с хирургическим удалением опухоли и проведением адьювантной и неoadьювантной химиотерапии, однако процент рецидивов и смертность остаются высокими.

Надежды онкологи связывают с возможностью иммунотерапевтического воздействия на опухоли костей, а именно, с подавлением активности «контрольных точек иммунитета» [142, 153, 179,], потому, что КТИ связаны с рядом процессов в самой опухоли и ее микроокружении, способствуя прогрессированию онкологического заболевания [6, 163]. Среди важных процессов, которые контролируют КТИ, считают инвазию и метастазирование опухоли [60, 107, 128].

Необходимо подчеркнуть, что контрольные точки иммунитета выявлены относительно недавно и представляют различные молекулы, способные регулировать у человека развитие иммунной реакции [127]. Известно, что механизмы, связанные с экспрессией контрольных точек иммунитета, могут быть использованы опухолью для ускользания от иммунного ответа и стали понятными только в 2018 году, когда были открыты ингибиторы контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1.

Цель представленного нами исследования - повышение эффективности лабораторной диагностики и оценки прогноза злокачественных новообразований костей на основании анализа частоты выявления и содержания растворимой формы супрессора активации Т клеток VISTA в сыворотке крови больных первичными опухолями костей, его связи с основными клиническими и морфологическими характеристиками опухолей.

VISTA (V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation) представляет собой иммунный контрольный белок (трансмембранный белок I типа), который подавляет активацию Т-клеток, имеющий общую

гомологию последовательностей как с PD-1, так и с PD-L1 [145, 185] и принадлежащий семейству B7 [84, 90, 185]. При этом стало известно, что VISTA способна подавлять активацию Т-клеток, когда экспрессируется в виде лиганда на антигенпрезентирующих клетках или когда экспрессируется в виде рецептора на Т-клетках [120, 184, 185]. Исследования показывают, что VISTA может модулировать новый механизм иммунного уклонения и, таким образом, является потенциальной мишенью для иммунотерапии злокачественных опухолей.

Остановимся на тех разделах представленного исследования, которые могут иметь важное значение не только для теоретической, но и клинической онкологии. При этом, необходимо отметить, что в литературе представлены единичные клинические исследования растворимой формы VISTA в сыворотке крови онкологических больных.

У всех здоровых доноров и больных новообразованиями костей нами выявлены различные концентрации sVISTA в сыворотке крови, что подтверждают данные ИГХ экспрессии VISTA в опухолях других локализаций с преобладающим мембранным/цитоплазматическим окрашиванием [179].

Проведенный сравнительный анализ сывороточных концентраций sVISTA у здоровых доноров группы контроля и общей группы больных (пограничными и злокачественными) новообразованиями костей обнаружил достоверное снижение концентрации маркера в контроле (соответственно 4,7 и 1,4 нг/мл; $p=0,01$). У большинства больных новообразованиями костей преобладали в сыворотке крови уровни sVISTA ниже порогового уровня 2,0 нг/мл. При этом, показано, что частота выявления уровней sVISTA по порогу 2,0 нг/мл в контроле и у больных новообразованиями костей статистически значимо различалась ($p=0,016$). Так, условно низкие концентрации sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл обнаружены у 30,9% обследованных в группе контроля и у 59,2% больных новообразованиями костей. Однако частота значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл в группе больных пограничными опухолями составила 61,5% и была

сопоставима с таковой в группе больных злокачественными новообразованиями костей (58,9%).

Провели анализ информативности sVISTA в качестве диагностического маркера путем построения ROC кривой и вычисления площади под ней (AUC), который составил 0,622, индекс Юдена – 0,365, пороговый уровень маркера – 2,83 нг/мл. Проведенный нами ROC-анализ показал, что использовать определение уровня sVISTA в сыворотке крови в качестве опухолевого маркера в диагностике первичных новообразований костей на сегодняшний день невозможно в связи с низкими показателями чувствительности (65,6%) и специфичности (69,0%) теста.

При этом концентрации маркера зависели от возраста как здоровых доноров, так и больных первичными новообразованиями костей. Нами отмечено снижение концентрации sVISTA с увеличением возраста (анализ проведен по декадам жизни) как в группе здоровых доноров, так и у больных новообразованиями костей.

На наш взгляд, интересные данные выявлены нами в уровне маркера с учетом возраста больных опухолями костей. Так, в группе больных саркомами костей обнаружена значимая обратная корреляция между возрастом и концентрацией sVISTA в сыворотке крови, то есть меньшие концентрации sVISTA чаще выявляли у больных более старшего возраста. Кроме того, обнаружена тенденция к меньшим концентрациям маркера в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей в возрасте старше 18 лет по сравнению с таковыми у здоровых доноров старше 18 лет (1,3 нг/мл и 4,4 нг/мл соответственно; $p=0,05$). В группе больных злокачественными новообразованиями костей в возрасте младше 18 лет выявлено статистически значимое снижение маркера по сравнению с донорами в возрасте младше 18 лет (соответственно 2,2 и 5,32 нг/мл; $p=0,032$). При этом наибольшая медиана концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей выявлена у пациентов в возрасте моложе 18 лет (2,2 нг/мл), а наименьшая – в группе

пациентов старше 60 лет (0,4 нг/мл; $p=0,17$). Частота значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл была наименьшей у пациентов в возрасте до 30 лет (50%) и наибольшей у пациентов старше 60 лет (83,3%).

Поскольку, частота выявления различных гистологических вариантов сарком костей зависит не только от возраста, но и пола пациентов, провели анализ уровней sVISTA в сыворотке крови с учетом пола пациентов. Нами выявлены определенные особенности, которые заключались в следующем. Не выявили различий в медианах концентраций sVISTA между больными злокачественными опухолями костей женщин и мужчин (соответственно 1,0 и 1,8 нг/мл; $p=0,12$). При этом частота выявления значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл составила в сыворотке крови женщин группы контроля 26,1%, а в группе больных злокачественными опухолями костей женщин была в 2,3 раза статистически значимо выше (61,8%) ($p=0,015$).

Также не обнаружили различий в медианах концентраций sVISTA в сыворотке крови пациентов с пограничными и злокачественными опухолями костей (соответственно 0,8 и 1,4 нг/мл; $p=0,3$).

Кроме того, наименьшая медиана уровня маркера обнаружена в группе больных хордовой кости (0,5 нг/мл), наибольшая – у больных саркомой Юинга (2,6 нг/мл; $p=0,0068$). Частота значений sVISTA $\leq 2,0$ нг/мл была наименьшей у пациентов с саркомой Юинга (40%) и наибольшей у больных хордовой кости (85,7%). Различия медиан маркера в контроле и у больных хордовой были статистически значимы ($p=0,018$). Также медиана уровня sVISTA у пациентом гигантоклеточной опухолью была статистически значимо ниже, чем у больных саркомой Юинга (соответственно 0,7 и 2,6 нг/мл) ($p=0,033$).

Другие авторы также при анализе уровней экспрессии VISTA в аденокарциномах желудка выявили связь с морфологическим вариантом опухоли и показали, что у пациентов с менее чувствительным подтипом мезенхимального РЖ, отмечена высокая экспрессия VISTA, наряду с Т-клеточным иммуноглобулином, муциновым домен-содержащим белком 3

(TIM-3), его лигандом галектином-9 и трансформирующим фактором роста- β , что может служить потенциальной терапевтической иммунной мишенью.

Нами отмечена ассоциация концентраций sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с локализацией опухоли в костях скелета ($p=0,018$). Так, статистически значимо бóльшая медиана маркера выявлена при опухолевом поражении костей верхних конечностей (9,1 нг/мл; $p=0,018$). Концентрации sVISTA в группе пациентов с поражением костей нижних конечностей были статистически значимо ниже, чем в контроле (1,1 и 4,4 нг/мл соответственно, $p=0,015$) и значимо ниже, чем у пациентов с поражением костей верхних конечностей ($p=0,01$). Так же выявлено статистически значимое различие уровней маркера между группой контроля и больными новообразованиями костей нижних конечностей (4,7 и 1,1 нг/мл; $p=0,04$). При этом частота значений sVISTA ≤ 2 нг/мл была наименьшей у пациентов с поражением костей верхних конечностей (17,7%) и колебалась в широком диапазоне (62,5-68,4%) у больных с другой локализацией опухоли в костях скелета ($p=0,0012$).

Отмечена значимая связь уровней sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей с видом пораженной опухолью кости. Так, статистически значимо меньшая медиана маркера обнаружена при опухолевом поражении большеберцовой кости (0,4 нг/мл), крестца (0,54 нг/мл) и бедренной кости (1,1 нг/мл), а наибольшая – при поражении опухолью плечевой кости (9,7 нг/мл; $p=0,01$). Концентрации показателя маркера у больных с поражением опухолью крестца, большеберцовой и бедренной костей были ниже, чем в контроле ($p<0,05$). При этом частота значений sVISTA ≤ 2 нг/мл была наименьшей у пациентов с поражением плечевой кости (21,4%) и была наибольшей у больных с поражением крестца (81,3%) и большеберцовой кости (81,3%; $p=0,001$).

Не установлено значимой связи концентраций sVISTA в сыворотке крови с типом (губчатая, трубчатая) пораженной опухолью кости ($p>0,05$). Наименьшая медиана маркера выявлена в группе больных злокачественными

опухолями губчатых костей (0,7 нг/мл), частота выявления значений sVISTA ≤ 2 нг/мл в этой группе была наибольшей и составила 76,2%. Медиана концентрации sVISTA была достоверно ниже в группе больных злокачественными новообразованиями губчатых костей по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

К сожалению, нами не установлено значимой связи концентраций sVISTA в сыворотке крови больных саркомами костей со всеми критериями системы TNM, стадией заболевания и степенью дифференцировки опухоли, за исключением некоторых из этих критериев, которые следует указать: стадия IIb, критерий T2 системы TNM, степень дифференцировки опухоли G2. Для 3-х их выше указанных критериев отметили статистически значимо высокие уровни sVISTA в сыворотке крови больных новообразованиями костей по сравнению с соответствующими им другими критериями: IIb стадия vs другие стадии; G2 vs G1, G3; T2 vs T1, T3.

В целом, по данным ряда ИГХ исследований экспрессия VISTA увеличивается на опухолевых клетках, инфильтрирующих опухоль иммунных клетках, эндотелиальных клетках кровеносных сосудов с прогрессией заболевания, стадией и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах, что указывает на участие этого маркера в прогрессировании онкологического процесса. Что еще более важно, данные этих авторов подразумевают маркер VISTA как мишень для иммунотерапии опухолей [115].

Необходимо отметить противоречивость данных литературы по изучению растворимых форм КТИ при различных солидных опухолях. Так, например, содержание растворимых форм белков системы PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком повышается, в то время как при КРР их содержание чаще понижается. Это наводит на мысль о том, что системная концентрация исследуемых белков в крови не всегда может отражать их локальное содержание.

Большой интерес для нас представлял анализ связи уровней sVISTA с основными компонентами контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 (растворимыми формами рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1), а также анализ ассоциации показателей sVISTA с RANKL - ключевым компонентом системы RANK/RANKL/OPG, участвующим в формировании костных метастазов разных опухолей, который представляет собой лиганд рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF- κ B. В группе больных злокачественными новообразованиями костей указанная зависимость составила ($r_s=0,24$; $p<0,05$). Концентрации sVISTA не были связаны с уровнями sPD-L1 и sRANKL, определенными в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей. Однако указанная зависимость усиливалась в группе пациентов в возрасте старше 40 лет до значения ($r_s=0,41$; $p<0,05$), в группе больных саркомой Юинга и хордовой кости ($r_s=0,63$; $p<0,05$), при поражении губчатых костей до значения ($r_s=0,59$; $p<0,05$), при поражении крестца и ребер до значения ($r_s=0,65$; $p<0,05$). Кроме того, нами обнаружена в 2 раза бóльшая медиана коэффициента соотношения sPD-1/sVISTA в группе больных новообразованиями костей по сравнению с контролем (соответственно 25,1 и 12,5; $p=0,19$). Кроме того, соотношение медиан sPD-L1/sVISTA было статистически значимо выше в группе больных новообразованиями костей по сравнению с контролем (соотношения различались в 4,6 раза и составили соответственно 11,9 и 2,5; $p=0,008$). Выявлена тенденция к различию концентраций sPD-1 в подгруппах больных новообразованиями костей с уровнями sVISTA менее и более 2,0 нг/мл (медианы составили 46,4 и 57,1 пг/мл; $p=0,05$). Обнаружено достоверное различие медиан концентраций sPD-L1 в подгруппах больных новообразованиями костей с уровнями sVISTA менее и более 2,0 нг/мл (соответственно 19,6 и 25,8 пг/мл; $p=0,046$). Уровни sRANKL не зависели от пороговых концентраций sVISTA (менее и более 2,0 нг/мл), исследованных в сыворотке крови больных новообразованиями костей.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об определенных связях выше исследованных маркеров sVISTA сыворотки крови с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразований костей, а также с биохимическими маркерами сыворотки крови - sPD-1, sPD-L1 и sRANKL.

На следующем этапе провели анализ показателей общей выживаемости больных злокачественными новообразованиями костей и их связь с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания и сывороточными биохимическими маркерами в сыворотке крови.

Нами показано, что морфологический вариант опухоли является определяющим фактором ($p=0,00097$) в прогнозе длительности жизни больных злокачественными новообразованиями костей. Наилучший показатель 3-летней общей выживаемости выявлен в группе больных хордомой (100%), а наихудший – в группе больных типичной остеосаркомой кости ($34,5\pm 11,8\%$); показатель 3-летней общей выживаемости больных саркомой Юинга составил $50,0\pm 35,3\%$, больных типичной хондросаркомой кости – $76,3\pm 12,7\%$.

Также отметили, что в группе больных типичной остеосаркомой кости при G1 степени дифференцировки опухоли показатель общей 3-летней выживаемости составил 100%, при G2 и G3 он не превышал 75% ($p>0,05$).

В группе больных типичной хондросаркомой кости общая выживаемость была связана с критерием T системы TNM. Так, при критерии распространенности T1 показатель 3-летней общей выживаемости составил 100%, при критерии T2 – $90,9\pm 8,7\%$, при критерии T3 снижался до $33,3\pm 27,2\%$, однако из-за малочисленности наблюдений в группах различия были статистически незначимы.

В группе хрящеобразующих опухолей отдаленные результаты лечения оказались лучше, но не всегда были связаны с уровнем sVISTA. Так, например, в группе больных хордомой не установлено связи отдаленных результатов лечения с уровнями sVISTA в сыворотке крови пациентов, так

как все больные были живы на этапе проведения исследования. В группе больных типичной хондросаркомой кости статистически значимо худшие отдаленные результаты лечения отмечены при концентрациях sVISTA в сыворотке крови менее 1,0 нг/мл ($p=0,033$). Так, например, у 17 больных типичной хондросаркомой кости с уровнем sVISTA в сыворотке крови $>1,0$ нг/мл показатель общей 3-летней выживаемости составил 100%, а частота прогрессирования – 5,9%. Напротив, у пациентов с концентрациями sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл уже показатель 2-летней общей выживаемости снизился – до $66,7\pm 19,2\%$, а 3-летней – до $44,4\pm 22,2\%$, при этом частота прогрессирования опухолевого процесса была в 5,2 раза выше и составила 30,8%. Таким образом, определение концентрации sVISTA в сыворотке крови больных типичной хондросаркомой кости позволяет уточнить общий прогноз заболевания.

Стало быть, использование уровня концентраций растворимой формы VISTA в сыворотке крови может быть использовано для оценки прогноза выживаемости пациентов с типичной хондросаркомой, что подтверждают данные проведенного исследования: при пороговом значении концентрации sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл показатель 3-летней общей выживаемости составил $44,4\pm 22,2\%$, напротив, при уровнях маркера $>1,0$ нг/мл 3-летняя общая выживаемость составила 100%.

В то же время, в группе больных костеобразующей типичной остеосаркомой кости значимой связи отдаленных результатов лечения с учетом сывороточной концентрации sVISTA не отмечено ($p=0,7$). Так, показатель 3-летней общей выживаемости 7 больных типичной остеосаркомой кости с концентрацией sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл составил всего $25,0\pm 20,4\%$ (медиана срока жизни 21,6 месяцев), а в группе из 22 пациентов с уровнями sVISTA $>1,0$ нг/мл – $45,9\pm 14,9\%$ (медиана срока жизни 22,7 месяцев). При этом частота прогрессирования в группе с концентрациями

sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл составила 57,1%, а в группе с концентрациями sVISTA $> 1,0$ нг/мл – только 31,8% ($p=0,22$).

По данным К. Mulati et al. (2019) несмотря на высокую экспрессию VISTA в клетках некоторых опухолей человека (рак яичников, эндометрия) взаимосвязи между VISTA, клинико-патологическими особенностями и прогнозом у больных остаются до конца неизвестными, а в ряде случаев спорными. На основании данных многофакторного анализа экспрессия VISTA не служила независимым предиктором плохого прогноза у первичных больных ПКПР, в то время как пациенты с высокой экспрессией VISTA и низкой экспрессией CD8 (22/165) имели значительно более низкую общую выживаемость [196]. Напротив, некоторые авторы полагают, что выраженная экспрессия VISTA в опухолевых клетках, связана с хорошим прогнозом, например, при протоковом РПЖ. Более того, иммунотерапия антителами против VISTA потенциально может быть эффективной стратегией лечения протокового РПЖ [204]. Вышеуказанная зависимость VISTA с прогнозом отмечена при КРР. Особый интерес представляет эта работа, так как экспрессию маркера анализировали не только в опухолевых клетках, но и в TILs. Авторы показали, что высокая экспрессия VISTA в иммунных клетках коррелирует с ранней стадией заболевания, дефицитом системы MMR (mismatch repair) и благоприятным прогнозом [210]. Однако другие исследования КРР показали, что высокий уровень экспрессии VISTA был статистически связан с худшей общей выживаемостью исследовании [54].

Таким образом, полученные нами впервые данные по клинической значимости маркера sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными и пограничными опухолями костей указывают на важную роль этого маркера у данной категории пациентов. Следует указать, что в настоящее время в литературе представлены единичные работы по изучению VISTA у больных различными опухолями и роль этого белка до конца не изучена.

Нами, прежде всего, показано, статистически значимое снижение маркера в сыворотки крови больных новообразованиями костей по

сравнению с группой здоровых доноров. Кроме того, выявлена связь уровней маркера с некоторыми основными клинико-морфологическими характеристиками злокачественных опухолей костей. Очень важный раздел работы по отдаленным результатам лечения этой категории пациентов показал значимую роль гистологического варианта сарком костей в прогнозе общей выживаемости и определенную связь с исследованными биохимическими маркерами опухолей (sVISTA, sPD-1, sPD-L1, sRANKL). Эта работа крайне актуальна, представляет клинический интерес у онкологов, ее следует продолжать, но прежде всего, необходимо увеличить число наблюдений в группах для подтверждения полученных выводов. Полагаем, что дальнейшие исследования sVISTA у больных саркомами костей необходимо проводить с учетом не только клинико-морфологических характеристик заболевания, но и их связи с основными компонентами контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 (sPD-1, sPD-L1) в оценке не только прогноза заболевания, но и эффективности проводимой химиотерапии. Высказано предположение о том, что sVISTA может служить мишенью или маркером целенаправленной лекарственной терапии у больных злокачественными опухолями костей, тем более, что в литературе представлены предварительные данные о использовании анти-VISTA моноклональных антител в экспериментальных моделях рака замедляет рост опухоли [149, 184]. Антитела против VISTA показали противоопухолевую эффективность на различных моделях [112, 119, 185]. Эти предварительные данные убедительно указывают на то, что VISTA является перспективной мишенью в терапии злокачественных опухолей [146]. Успех иммунотерапии контрольных точек для управления роста злокачественных новообразований, в том числе и анти-VISTA, лежит в основе ключевой значимости иммуносупрессивных путей, которые не позволяют Т-клеткам эффективно распознавать и уничтожать свои неопластические аналоги [153]. Кроме того, что сочетание нескольких видов иммунотерапии с неперекрывающимися или частично дублирующимися механизмами действия может представлять

новую и многообещающую стратегию для увеличения скорости ответа опухоли на иммунотерапию [151]. Полученные авторами результаты демонстрируют тот факт, что блокада VISTA эффективно превращает CD8+ Т-клетки в функциональные эффекторные Т-клетки, но недостаточна для регрессии опухолевого роста ввиду слабой супрессии Treg в микроокружении опухоли [97]. Эти данные показывают, что комбинированная блокада CTLA-4 и VISTA более эффективна, чем комбинированная блокада PD-1 и VISTA для таких опухолей как плоскоклеточном раке головы и шеи, при которых Treg-опосредованная иммунная регуляция является доминирующей.

Из данных литературы известно, что белок VISTA ассоциирован с иммуносупрессивным фенотипом микроокружения опухоли, оказывая подавляющее действие на активацию Т-клеток и стимулируя созревание Treg. С одной стороны, накопленные результаты послужили основанием для использования этого белка в качестве новой мишени для иммунотерапии опухолей и на сегодняшний день проводится ряд клинические испытания монотерапии с использованием моноклональных антител или малых молекул направленных против VISTA. Однако данное исследование показывает, что клиническая и прогностическая значимость содержание растворимой формы sVISTA не всегда соответствует таковой непосредственно в опухоли. Именно поэтому для перехода в будущем к персонализированной терапии необходим тщательный анализ экспрессии VISTA как локально в первичной опухоли, так и системно в сыворотке крови. Сочетание этой информации поможет подобрать эффективную комбинированную терапию для каждого пациента.

ВЫВОДЫ

1. У всех обследованных больных злокачественными, пограничными опухолями костей и здоровых доноров (группа контроля) выявлена sVISTA в сыворотке крови, при этом медиана концентрации маркера была достоверно выше в контроле, чем у больных опухолями костей.
2. Обнаружена ассоциация уровней sVISTA с возрастом у здоровых доноров и больных опухолями костей, которая характеризовалась снижением концентрации маркера с увеличением возраста.
3. Сывороточные уровни sVISTA статистически значимо связаны с гистологическим строением, локализацией и типом опухоли: наименьшие уровни маркера обнаружены у больных хордовой кости, при опухолях большеберцовой и бедренной костей, крестца, при поражении губчатых костей скелета по сравнению с контролем, наибольшие – у пациентов с саркомой Юинга и злокачественными новообразованиями плечевой кости.
4. Выявлены статистически значимо высокие концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей при IIb стадии, при критерии T2 и степени дифференцировки опухоли G2 по сравнению с контролем.
5. Статистически значимая зависимость выявлена между уровнями sVISTA и sPD-L1, sRANKL у больных саркомами костей в возрасте старше 40 лет, при хордоме, саркоме Юинга и поражении губчатых костей. При этом обнаружено статистически значимое различие концентраций sPD-L1 в группах больных опухолями костей с уровнями sVISTA менее и более 2 нг/мл.
6. Отдаленные результаты лечения больных саркомами костей определяют преимущественно гистологический вариант опухоли: наилучшая 3-летняя выживаемость отмечена при хрящобразующих опухолях – хордоме (100%) и типичной хондросаркоме ($76,3 \pm 12,7\%$), а наихудшая – при костеобразующей типичной остеосаркоме ($34,5 \pm 11,8\%$). Наиболее низкие

показатели 3-летней общей выживаемости обнаружены при локализации опухоли в костях таза и нижних конечностей.

7. В группе больных типичной хондросаркомой кости обнаружено статистически значимое снижение общей 3-летней выживаемости при концентрации sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл в сыворотке крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

предназначены специалистам клинической лабораторной диагностики, врачам-онкологам.

1. Рекомендуется определение уровня растворимой формы VISTA для прогноза выживаемости пациентов с типичной хондросаркомой. При значении концентрации sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл 3-летняя общая выживаемость составляет $44,4 \pm 22,2$ %, а при уровнях показателя $> 1,0$ нг/мл 3-летняя общая выживаемость составляет 100%.

2. Целесообразно включить в программы повышения квалификации специалистов клинической лабораторной диагностики цикл лекций по проблеме диагностической и прогностической значимости сывороточных маркеров – ключевых точек иммунитета (sVISTA, sPD-L1, sRANKL).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение темы является перспективным направлением в диагностике и прогнозе опухолей костей. Наиболее перспективным путем разработки темы является сравнительный анализ сывороточных уровней sVISTA и уровня экспрессии VISTA в тканях опухоли у пациентов с первичными новообразованиями костей, а также анализ возможностей использования сывороточных уровней sVISTA в качестве критериев при оценке эффективности лекарственной терапии (таргетной терапии, химиотерапии, иммунотерапии) опухолей костей.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКЖ	аденокарциномами желудка
ГКО	гигантоклеточная опухоль кости
ЗОК	злокачественные опухоли костей
ЗНК	злокачественные новообразования костей
ПОК	пограничные опухоли костей
ПНК	пограничные новообразования костей
ИК	иммунные клетки
КРР	колоректальный рак
КТИ	контрольная точка иммунитета
НМРЛ	немелкоклеточный рак легкого
ОМЛ	острый миелобластный лейкоз
ОС	остеосаркома
ПКПР	плоскоклеточная карцинома полости рта
РА	рецепторы андрогенов
РМЖ	рак молочной железы
РП	рак простаты
РПЖ	рак поджелудочной железы
РЭ	рецепторы эстрогенов
СЮ	саркома Юинга
ХД	хордома
ХС	хондросаркома
ЦНС	центральная нервная система
EGFR	рецепторы эпидермального фактора роста
IC	иммунные клетки
MSI-H	нестабильные микросателлитные опухоли
QIF	ультитиплексную количественную иммунофлуоресценцию
qRT-PCR	количественный временной ПЦР
scRNA-seq	одноклеточной РНК-seq
sPD-1	растворимая форма рецептора программируемой гибели клетки
sPD-L1	растворимая форма лиганда 1 типа программируемой гибели клетки
sRANKL	лиганд рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF-κB (RANKL) системы RANK/RANKL/OPG, регулирующей дифференцировку остеокластов и остеолиз
sVISTA (B7-H5)	растворимая форма супрессора активации Т клеток (контрольная точка иммунитета, V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation)
TILs	лимфоциты, инфильтрирующие опухоль
Tregs	регуляторные Т-клетки

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алферов, А.А. Ключевые контрольные точки иммунитета и их ингибиторы в терапии опухолей костей. Часть 1. Сигнальная система белка программируемой клеточной гибели PD-1/PD-L / А.А. Алферов, М.М. Ефимова, Ю.Б. Кузьмин, И.Н. Кузнецов, Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // Технологии живых систем. – 2021. – Том 18, № 1. – С. 5-17.
2. Алферов, А.А. Ключевые контрольные точки иммунитета и их ингибиторы в терапии опухолей костей. Часть 2. Дополнительные мишени иммунотерапии опухолей костей и маркеры для оценки ее эффективности / А.А. Алферов, М.М. Ефимова, Ю.Б. Кузьмин, И.Н. Кузнецов, Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // Технологии живых систем. – 2021. – Том 18, № 1. – С. 18-31.
3. Бассалык, Л.С. Исследование рецепторов стероидных гормонов в остеогенных саркомах / Л.С. Бассалык, Н.Е. Кушлинский, Ю.Н. Соловьев, П.А. Синюков, А.Н. Феденко, В.Л. Еремин // Вопросы онкологии. – 1989. – Том XXXV, № 6. – С. 658-663.
4. Бассалык, Л.С. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания / Л.С. Бассалык, Н.Е. Кушлинский, Ю.Н. Соловьев, П.А. Синюков, А.Н. Феденко, В.Л. Еремин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Том 65, № 6. – С. 347-352.
5. Бассалык, Л.С. Стимуляция тестостероном роста штамма остеогенной саркомы человека, трансплантированного бестимусным крысам / Л.С. Бассалык, Н.Е. Кушлинский, Е.С. Ревазова, В.Г. Дегтярь // Экспериментальная онкология. – 1988. – Том 10, № 6. – С. 29-31.
6. Ковалева, О.В. Прогностическая значимость экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели PD-L1 в хордомах / О.В. Ковалева, И.В. Булычева, А.Н. Грачев, Н.С. Бабкин, Э.Р. Мусаев, Н.Е. Кушлинский // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2021. – Том 10, № S4. – С. 61-67.
7. Ковалева, О.В. Рак желудка. Клиническая значимость экспрессии ключевых компонентов контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 / О.В. Ковалева, П.П. Подлесная, А.Н. Грачев, В.Л. Чанг, Н.А. Огнерубов, Н.Е. Кушлинский // Современная онкология. – 2021. – Том 23, № 1. – С. 58-63.
8. Ковалева, О.В. Растворимая форма белка B7-H3 при раке яичников и его прогностическая значимость / О.В. Ковалева, Т.П. Белова, Е.А.

- Короткова, Д.Н. Кушлинский, А.Н. Грачев, Н.А. Петрикова [и соавт.] // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. – 2021. – Том 171, № 4. – С. 486-489.
9. Ковалева, О.В. Растворимые формы контрольных точек иммунитета при раке яичников / О.В. Ковалева, Т.П. Белова, Д.Н. Кушлинский, Е.А. Короткова, П.А. Подлесная, А.Н. Грачев [и соавт.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Том 66, № 2. – С. 80-86.
10. Кушлинский, Н.Е. Ассоциации одиночных нуклеотидных полиморфизмов со злокачественными и пограничными опухолями костей у больных в российской популяции / Н.Е. Кушлинский, Ю.С. Тимофеев, Э.В. Генерозов, В.А. Наумов, Ю.Н. Соловьев, И.В. Булычева // Молекулярная медицина. – 2013. – №1. – С. 20-23.
11. Кушлинский, Н.Е. Длинные некодирующие РНК как конкурентные эндогенные РНК при остеосаркоме / Н.Е. Кушлинский, М.В. Фридман, Э.А. Брага // Молекулярная биология. – 2020. – Том 54, № 5. – С. 776-801.
12. Кушлинский, Н.Е. Ключевые компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови при опухолях костей / Н.Е. Кушлинский, А.А. Алферов, Ю.С. Тимофеев, Е.С. Герштейн, И.В. Булычева, А.В. Бондарев [и соавт.] // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. – 2020. – Том 170, № 7. – С. 79-83.
13. Кушлинский, Н.Е. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при первичных опухолях костей: клинико-морфологические корреляции / Н.Е. Кушлинский, И.С. Черномаз, Е.С. Герштейн, И.В. Булычева, М.Д. Алиев, Ю.Н. Соловьев // Молекулярная медицина. – 2018. – Том 16, № 5. – С. 45-50.
14. Кушлинский, Н.Е. Молекулярные механизмы и микроРНК в патогенезе остеосаркомы (обзор) / Н.Е. Кушлинский, М.В. Фридман, Э.А. Брага // Биохимия. – 2016. – Том 81, Вып. 4. – С. 448-464.
15. Кушлинский, Н.Е. Молекулярные механизмы опухолевого роста / Н.Е. Кушлинский, М.В. Немцова // Медицинские новости. – 2014. – № 9. – С. 29-37.
16. Кушлинский, Н.Е. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические корреляции / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, Д.О. Уткин, Н.А. Петрикова, Д.Н. Кушлинский, М.А. Шабанов [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 6. – С. 80-88.
17. Кушлинский, Н.Е. Прогностическая значимость растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком желудка / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, В.Л.

- Чанг, Е.А. Короткова, А.А. Алферов, М.М. Конторщикова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Том 66, № 3. – С. 139-146.
18. Кушлинский, Н.Е. Сравнительный анализ уровней растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости / Н.Е. Кушлинский, А.А. Алферов, И.В. Булычева, Ю.С. Тимофеев, Е.А. Короткова, О.Т. Хван [и соавт.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Том 65, № 11. – С. 669-675.
19. Кушлинский, Н.Е. Экспрессия контрольной точки иммунитета B7-H3 в опухоли и ее растворимой формы в сыворотке крови больных новообразованиями костей / Н.Е. Кушлинский, О.В. Ковалева, А.А. Алферов, Ю.Б. Кузьмин, Е.А. Сушенцов, И.С. Стилиди // Альманах клинической медицины. – 2021. – Том 49, № 3. – С. 179-190.
20. Меркурьева, О.Н. Диагностическая и прогностическая значимость ингибитора ангиогенеза эндостатина у пациентов с саркомами костей. В материалах VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (21-23 декабря 2021 г., Москва) / О.Н. Меркурьева, А.А. Алферов, Ю.Б. Кузьмин, И.В. Бабкина, И.В. Булычева, Н.Е. Кушлинский // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – С. 58-59.
21. Тимофеев, Ю.С. Анализ нуклеотидных полиморфизмов rs7921(GH1), rs7956547(IGF1) при новообразованиях костей / Ю.С. Тимофеев // В материалах Международного научно-практического конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии» под ред. С.С. Алексанина. – Спб.: Человек, 2016, - С. 206.
22. Aloia, L. Differentiation of embryonic stem cells 1 (Diel1) is a component of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling pathway required for proper differentiation of mouse embryonic stem cells / L. Aloia, S. Parisi, L. Fusco, L. Pastore, T. Russo // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 7776-7783.
23. Antonia, S.J. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer / S.J. Antonia, A. Villegas, D. Daniel, D. Vicente, S. Murakami, R. Hui; PACIFIC Investigators // N. Engl. J. Med. – 2017. – Vol. 377, N 20. – P. 1919-1929.
24. Balli, D. Immune cytolytic activity stratifies molecular subsets of human pancreatic cancer / D. Balli, A.J. Rech, B.Z. Stanger, R.H. Vonderheide // Clin. Cancer Res. – 2017. – Vol. 23, N 12. – P. 3129-3138.
25. Bharaj, P. Characterization of programmed death-1 homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals / P. Bharaj,

- H.S. Chahar, O.K. Alozie, L. Rodarte, A. Bansal, P.A. Goepfert [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 3, N 10:e109103.
26. Bielack S.S., Werner M., Tunn P.U., Helmke K., Jürgens H., Calaminus G. [et al.] Methotrexate, doxorubicin, and cisplatin (MAP) plus maintenance pegylated interferon alfa-2b versus MAP alone in patients with resectable high-grade osteosarcoma and good histologic response to preoperative MAP: first results of the EURAMOS-1 good response // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 2279–2287.
27. Bishop, M.W. Future directions in the treatment of osteosarcoma / M.W. Bishop, K.A. Janeway, R. Gorlick // *Curr. Opin. Pediatr.* – 2016. – Vol. 28, N 1. – P. 26-33.
28. Blando, J. Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer / J. Blando, A. Sharma, M.G. Higa, H. Zhao, L. Vence, S.S. Yadav [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2019. – Vol. 116, N 5. – P. 1692-1697.
29. Body, J.J. phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases / Body J.J., Greipp P., Coleman R.E. [et al.] // *Cancer*. – 2003. – Vol. 97, Suppl. 3. – P. 887-892.
30. Böger, C. The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? / C. Böger, H.M. Behrens, S. Krüger, C. Röcken // *Oncoimmunology*. – 2017. – Vol. 6, N 4:e1293215.
31. Boutros, C. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination / C. Boutros, A. Tarhini, E. Routier, O. Lambotte, F.L. Ladurie, F. Carbonnel [et al.] // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 13, N 8. – P. 473-486.
32. Boyce, B.F. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling / B.F. Boyce, L. Xing // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. Vol. 473, N 2. – P. 139-146.
33. Brahmer, J.R. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer / J.R. Brahmer, S.S. Tykodi, L.Q. Chow, W.J. Hwu, S.L. Topalian, P. Hwu [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, N 26. – P. 2455-2465.
34. Branstetter, D.G. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone / Branstetter D.G., Nelson S.D., Manivel J.C. [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18, N 16. – P. 4415-4424.
35. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I.

- Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 394-424.
36. Brown, H.K. *Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments* / H.K. Brown, K. Schiavone, F. Gouin, M.F. Heymann, D. Heymann // *Calcif. Tissue Int.* – 2018. – Vol. 102, N 2. – P. 174-195.
37. Brown, J.M. *Opg, RANK1, and RANK in cancer metastasis: ex-pression and regulation* / J.M. Brown, J. Zhang, E.T. Keller // *Cancer Treat. Res.* – 2004. – Vol. 118. – P. 149-172.
38. Burkiewicz, J.S. *Denosumab in osteoporosis and oncology* / J.S. Burkiewicz, S.L. Scarpace, S.P. Bruce // *Ann. Pharmacother.* – 2009. – Vol. 43, N 9. – P. 1445-1455.
39. Burugu, S. *Emerging targets in cancer immunotherapy* / S. Burugu, A.R. Dancsok, T.O. Nielsen // *Semin. Cancer Biol.* 2018. Vol. 52, Pt. 2. P. 39-52.
40. Campbell, B.B. *Comprehensive analysis of hypermutation in human cancer* / B.B. Campbell, N. Light, D. Fabrizio, M. Zatzman, F. Fuligni, R. de Borja [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 171, N 5. – P. 1042-1056.e10.
41. Cao, X. *VISTA Expression on Immune Cells Correlates With Favorable Prognosis in Patients With Triple-Negative Breast Cancer* / X. Cao, X. Ren, Y. Zhou, F. Mao, Y. Lin, H. Wu [et al.] // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol. 10:583966.
42. Carthon, B.C. *Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial* / B.C. Carthon, J.D. Wolchok, J. Yuan, A. Kamat, D.S. Ng Tang, J. Sun [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16, N 10. – P. 2861-2871.
43. Casali, P.G. *Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up* / P.G. Casali, N. Abecassis, H.T. Aro, S. Bauer, R. Biagini, S. Bielack [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2018. – Vol. 29, Suppl. 4. – iv51–iv67.
44. Cathomas, R. *RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward?* / Cathomas R., Rothermundt C., Bode B. [et al.] // *Oncology.* – 2014. – Vol. 88, N 4. – P. 257-260.
45. Chang, C.T. *High-intensity focused ultrasound treatment for large and small solitary uterine fibroids* / C.T. Chang, C.J. Jeng., C.Y. Long, L.T. Chuang, J. Shen // *Int. J. Hyperthermia.* – 2022. – Vol. 39, N 1. – P. 485-489.
46. Chavin, G. *Expression of immunosuppressive B7-H3 ligand by hormone-treated prostate cancer tumors and metastases* / G. Chavin, Y. Sheinin, P.L. Crispen, S.A. Boorjian, T.J. Roth, L. Rangel [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, N 6. – P. 2174-2180.

- 47.Chen, H. Different clinical significance of novel B7 family checkpoints, VISTA and HHLA2, in human lung adenocarcinoma and colorectal cancer / H. Chen [et al.] // In LABORATORY INVESTIGATION. 2019. NATURE PUBLISHING GROUP 75 VARICK ST, 9TH FLR, NEW YORK, NY 10013-1917 USA.
- 48.Chen, L. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy of Human Cancer: Past, Present, and Future / L. Chen, X. Han // J. Clin. Invest. – 2015. – Vol. 125, N 9. – P. 3384-3391.
- 49.Chen, W. Cancer statistics in China / W. Chen, R. Zheng, P.D. Baade, S. Zhang, H. Zeng, F. Bray [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2016. – Vol. 66, N 2. – P. 115-132.
- 50.Choi, H.K. Early estrogen-induced gene 1, a novel RANK signaling component, is essential for osteoclastogenesis / Choi H.K., Kang H.R., Jung E. [et al.] // Cell Res. – 2013. – Vol. 23, N 4. – P. 524-536.
- 51.Costantini, A. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab / A. Costantini, C. Julie, C. Dumenil, Z. Hélias-Rodzewicz, J. Tisserand, J. Dumoulin [et al.] // Oncoimmunology. 2018. Vol. 7, N 8:e1452581.
- 52.de Alava, E.L.S. Chapter 19: Ewing sarcoma / E.L.S. de Alava, P.H. Sorensen // In: Fletcher C.D.M. B.J., Hogendoorn P.C.W., Mertens F., editors. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC; 2013.
- 53.Deng, J. A New VISTA on combination therapy for negative checkpoint regulator blockade / J. Deng, I. Le Mercier, A. Kuta, R.J. Noelle // J. Immunother. Cancer. – 2016. – Vol. 4. – P. 86.
- 54.Deng, J. Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment / J. Deng, J. Li, A. Sarde, J. Lines, Y. Lee, D. Qian [et al.] // Cancer Immunol. Res. – 2019. – Vol. 7, N 7. – P. 1079-1090.
- 55.Di Maio, S. Novel targeted therapies in chordoma: an update / S. Di Maio, S. Yip, G.A. Al Zhrani, F.E. Alotaibi, A. Al Turki, E. Kong [et al.] // Ther. Clin. Risk Manag. – 2015. – Vol. 11. – P. 873-883.
- 56.Dougall, W.C. RANKL signaling in bone physiology and cancer / W.C. Dougall // Curr. Opin. Support. Palliat. Care. – 2007. – Vol. 1, N 4. – P. 317-322.
- 57.El Beaino, M. Mesenchymal Chondrosarcoma: a Review with Emphasis on its Fusion-Driven Biology / M. El Beaino, J. Roszik, J.A. Livingston, W.L. Wang, A.J. Lazar, B. Amini [et al.] // Curr. Oncol. Rep. – 2018. – Vol. 20, N 5. – P. 37.

- 58.ElTanbouly, M.A. VISTA Re-programs Macrophage Biology Through the Combined Regulation of Tolerance and Anti-inflammatory Pathways / M.A. ElTanbouly, E. Schaafsma, N.C. Smits, P. Shah, C. Cheng, C. Burns [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11:580187.
- 59.Evola, F.R. Biomarkers of Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing Sarcoma / F.R. Evola, L. Costarella, V. Pavone, G. Caff, L. Cannavò, A. Sessa [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 150.
- 60.Fernández, L. Memory T cells expressing an NKG2D-CAR efficiently target osteosarcoma cells / L. Fernández, J.Y. Metais, A. Escudero, M. Vela, J. Valentín, I. Vallcorba [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23, N 19. – P. 5824-5835.
- 61.Ferrari, S. An update on chemotherapy for osteosarcoma / S. Ferrari, M. Serra // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2015. – Vol. 16, N 18. – P. 2727-2736.
- 62.Findlay, D.M. Relationship between serum RANKL and RANKL in bone / D.M. Findlay, G.J. Atkins // *Osteoporos Int.* – 2011. – Vol. 22, N 10. – P. 2597-2602.
- 63.Flies, D.B. Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the programmed death-1 homolog prevents graft-versus-host disease in mouse models / D.B. Flies, S. Wang, H. Xu, L. Chen // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, N 4. – P. 1537-1541.
- 64.Flies, D.B. Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell-mediated immunity / D.B. Flies, X. Han, T. Higuchi, L. Zheng, J. Sun, J.J. Ye [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2014. – Vol. 124, N 5. – P. 1966-1975.
- 65.Flies, D.B. Mechanistic assessment of PD-1H coinhibitory receptor-induced T cell tolerance to allogeneic antigens / D.B. Flies, T. Higuchi, L. Chen // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194, N 11. – P. 5294-5304.
- 66.Foley, K. Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer / K. Foley, V. Kim, E. Jaffee, L. Zheng // *Cancer Lett.* 2015. – Vol. 381, N 1. – P. 244-251.
- 67.Formenti, S.C. Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade / S.C. Formenti, N.P. Rudqvist, E. Golden, B. Cooper, E. Wennerberg, C. Lhuillier [et al.] // *Nat. Med.* – 2018. – Vol. 24, N 12. – P. P. 1845-1851.
- 68.Gao, J. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer / J. Gao, J.F. Ward, C.A. Pettaway, L.Z. Shi, S.K. Subudhi, L.M. Vence [et al.] // *Nat. Med.* – 2017. – Vol. 23, N 5. – P. 551-555.
- 69.Gershtein, E.S. Soluble forms of PD-1 and PD-L1 in blood plasma of gastric cancer patients and their associations with clinical and morphological

- characteristics of the disease / E.S. Gershtein, N.A. Ognerubov, V.L. Chang, V.V. Delektorskaya, E.A. Korotkova, N.Yu. Sokolov [et al.] // Russian Clinical Laboratory Diagnostics. – 2020. – Vol. 65, N 6. – P. 347-352.
70. Ghiringhelli, F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative / F. Ghiringhelli, N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2004. – Vol. 34, N 2. – P. 336-344.
71. Gomez-Veiga, F. Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition / Gomez-Veiga F., Ponce-Reixa J., Martinez-Breijo S. [et al.] // Actas Urol. Esp. – 2012. – Vol. 37, N 5. – P. 292-304.
72. Group ESESNW. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / Group ESESNW // Ann. Oncol. – 2014. – Vol. 25, Suppl. 3. – P. 113-123.
73. Hamanishi, J. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues / J. Hamanishi, M. Mandai, N. Matsumura, K. Abiko, T. Baba, I. Konishi // Int. J. Clin. Oncol. – 2016. – Vol. 21, N 3. – P. 462-473.
74. Hannon, R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover / R. Hannon, R. Eastell // Osteoporos Int. – 2000. – Vol. 11, Suppl. 6. – S30-44.
75. Harrison, D.J. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma / D.J. Harrison, D.S. Geller, J.D. Gill, V.O. Lewis, R. Gorlick // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 39-50.
76. Hasmim, M. Cutting edge: hypoxia-induced Nanog favors the intratumoral infiltration of regulatory T cells and macrophages via direct regulation of TGF- β 1 / M. Hasmim, M.Z. Noman, Y. Messai, D. Bordereaux, G. Gros, V. Baud [et al.] // J. Immunol. – 2013. – Vol. 191, N 12. – P. 5802-5806.
77. He, X. A meta-analysis of randomized control trials of surgical methods with osteosarcoma outcomes / X. He, Z. Gao, H. Xu, Z. Zhang, P. Fu // J. Orthop. Surg. Res. – 2017. – Vol. 12, N 1. – P. 5.
78. Hellmann, M.D. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden / M.D. Hellmann, T.E. Ciuleanu, A. Pluzanski, J.S. Lee, G.A. Otterson, C. Audigier-Valette [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2018. – Vol. 378, N 22. P. 2093-2104.
79. Helm, O. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma / O. Helm, R. Mennrich, D. Petrick, L. Goebel, S. Freitag-Wolf, C. Röder [et al.] // PLoS One. 2014. – Vol. 9, N 5: e94357.

80. Hematology/Oncology (Cancer) Approvals & Safety Notifications. FDA Web site.
<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm279174.htm>. Updated April 24, 2015. Accessed June 23, 2015.
81. Hong, S. Analysis of VISTA expression and function in renal cell carcinoma highlights VISTA as a potential target for immunotherapy / S. Hong, Q. Yuan, H. Xia, G. Zhu, Y. Feng, Q. Wang [et al.] // *Protein Cell*. – 2019. – Vol. 10, N 11. – P. 840-845.
82. Hsu, C.J. Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration / Hsu C.J., Lin T.Y., Kuo C.C. [et al.] // *J. Cell Biochem*. – 2010. – Vol. 111, N 1. – P. 138-147.
83. Huang, H.F. Progress in Research on Tumor Immune PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Malignant Bone Tumors / H.F. Huang, H. Zhu, X.T. Yang, X.Y. Guo, S.S. Li, Q. Xie [et al.] // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. – 2019. – Vol. 41, N 6. – P. 410-414.
84. Huang, X. VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy / X. Huang, X. Zhang, E. Li, G. Zhang, X. Wang, T. Tang [et al.] // *J. Hematol. Oncol*. – 2020. – Vol. 13, N 1. – P. 83.
85. Hugo, W. Genomic and Transcriptomic Features of Response to AntiPD-1 Therapy in Metastatic Melanoma / W. Hugo, J.M. Zaretsky, L. Sun, C. Song, B.H. Moreno, S. Hu-Lieskovan [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 165, N 1. – P. 35-44.
86. Itkin, B. Prognosis of metastatic giant cell tumor of bone in the pre-denosumab era. A systematic review and a meta-analysis / B. Itkin, S. Straminsky, G. De Ronato, D. Lewi, A. Marantz, A. Bardach // *Jpn. J. Clin. Oncol*. – 2018. – Vol. 48, N 7. – P. 640-652.
87. Ivanov, Yu.D. Nanoribbon Biosensor in the Detection of miRNAs Associated with Colorectal Cancer / Yu.D. Ivanov, K.V. Goldaeva, K.A. Malsagova, T.O. Pleshakova, R.A. Galiullin, V.P. Popov [et al.] // *Micromachines*. – 2021. – Vol. 12, Iss. 12. – P. 1581.
88. Jimi, E. The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review) / Jimi E., Shin M., Furuta H. [et al.] // *Int. J. Oncol*. – 2013. – Vol. 42, N 3. – P. 803-809.
89. Jindal, V. Immunotherapy: a glimmer of hope for metastatic prostate cancer / V. Jindal // *Chin. Clin. Oncol*. – 2018. – Vol. 7. – P. 61.
90. Johnston, R.J. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1 / R.J. Johnston, L.J. Pinckney, D. Critton, E. Boyer, A. Krishnakumar, M. Corbett [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 574, N 7779. – P. 565-570.

91. Kabir, T.F. Immune Checkpoint Inhibitors in Pediatric Solid Tumors: Status in 2018 / T.F. Kabir, A. Chauhan, L. Anthony, G.C. Hildebrandt // *Ochsner J.* – 2018. – Vol. 18, N 4. – P. 370-376.
92. Kakavand, H. Negative immune checkpoint regulation by VISTA: a mechanism of acquired resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma patients / H. Kakavand, L.A. Jackett, A.M. Menzies, T.N. Gide, M.S. Carlino, R.P.M. Saw [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2017. – Vol. 30, N 12. – P. 1666-1676.
93. Kang, F.-B. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway / F.-B. Kang, L. Wang, H.-C. Jia, D. Li, H.-J. Li, Y.-G. Zhang [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2015. – Vol. 15. – P. 45.
94. Kansara, M. Translational biology of osteosarcoma / M. Kansara, M.W. Teng, M.J. Smyth, D.M. Thomas // *Nat. Rev. Cancer.* – 2014. – Vol. 14, N 11. – P. 722–735.
95. Kim, M. Identifying Rational Candidates for Immunotherapy Targeting PD-1/PD-L1 in Cervical Cancer / M. Kim, H. Kim, D.H. Suh, K. Kim, H.Y. Kim, Y.B. Kim [et al.] // *Anticancer Res.* – 2017. – Vol. 37. – P. 5087-5094.
96. Koirala, P. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma / P. Koirala, M.E. Roth, J. Gill, S. Piperdi, J.M. Chinai, D.S. Geller [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6:30093.
97. Kondo, Y. Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma / Y. Kondo, T. Ohno, N. Nishii, K. Harada, H. Yagita, M. Azuma // *Oral Oncology.* – 2016. – Vol. 57. – P. 54-60.
98. Korpi, J.T. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma / J.T. Korpi, J. Hagstrom, N. Lehtonen, J. Parkkinen, T. Sorsa, T. Salo [et al.] // *Surg. Oncol.* – 2011. – Vol. 20, N 1. – P. 18-22.
99. Kovaleva, O.V. Soluble forms of immune checkpoints in ovarian cancer / O.V. Kovaleva, T.P. Belova, D.N. Kushlinsky, E.A. Korotkova, P.A. Podlesnaya, A.N. Gratchev [et al.] // *Clin. Lab. Diagn.* – 2021. – Vol. 66, N 2. – P. 80-86.
100. Kukita, A. Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis / A. Kukita, T. Kukita // *Future Oncol.* – 2013. – Vol. 9, N 11. – P. 1609-1622.
101. Kuklinski, L.F. VISTA expression on tumorinfiltrating inflammatory cells in primary cutaneous melanoma correlates with poor disease-specific survival / L.F. Kuklinski, S. Yan, Z. Li, J.L. Fisher, C. Cheng, R.J. Noelle [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2018. – Vol. 67, N 7. – P. 1113-1121.

102. Kumar, R. Primary Osteosarcoma in the Elderly Revisited: Current Concepts in Diagnosis and Treatment / R. Kumar, M. Kumar, K. Malhotra, S. Patel // *Curr. Oncol. Rep.* – 2018. – Vol. 20, N 2. – P. 13.
103. Kurzman, I.D. Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: results of randomized clinical trials using combined liposome-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin / I.D. Kurzman, E.G. MacEwen, R.C. Rosenthal, L.E. Fox, E.T. Keller, S.C. Helfand [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 1995. – Vol. 1, N 12. – P. 1595–1601.
104. Kushlinskii, N.E. Checkpoint Receptor (sPD-L1) in Blood Serum of Patients with Renal Cell Carcinoma / N.E. Kushlinskii, E.S. Gershtein, A.A. Morozov, I.O. Goryacheva, M.L. Filipenko, A.A. Alferov [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2019. – Vol. 166, N 3. – P. 353-357.
105. Kushlinskii, N.E. Comparative analysis of the levels of soluble forms of receptor and ligand of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in blood serum of patients with typical bone osteosarcoma and chondrosarcoma / N.E. Kushlinskii, A.A. Alferov, I.V. Boulytcheva, Yu.S. Timofeev, E.A. Korotkova, O.T. Khvan [et al.] // *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* – 2020. – Vol. 65, N 11. – P. 669-675.
106. Kushlinskii, N.E. Expression of the apoptosis inhibitor soluble Fas antigen in patients with malignant and benign bone neoplasms / N.E. Kushlinskii, Yu.N. Solov'ev, I.V. Babkina, S.G. Abbasova, I.A. Kostanian [et al.] // *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* – 2001. – N 3. – P. 3-8.
107. Kushlinskii, N.E. Clinical and prognostic significance of the soluble form of VISTA immunity checkpoint in patients with primary bone tumors / N.E. Kushlinskii, O.V. Kovaleva, Yu.B. Kuzmin, E.A. Korotkova, E.S. Gershtein, I.V. Bulycheva, [et al.] // *Klin. Lab. Diagn.* – 2021. – Vol. 66, N 9. – P. 533-538.
108. Kwan, Tat S. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology / Kwan Tat S., Padrines M., Theoleyre S. [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2004. – Vol. 15, N 1. – P. 49-60.
109. Kyi, C. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy / C. Kyi, M.A. Postow // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol. 588, N 2. – P. 368-376.
110. Lam, F.C. Primary Extradural Tumors of the Spine - Case Review with Evidence-guided Management / F.C. Lam, J.E. Arle, P.A. Glazer, E.M. Kasper // *Surg. Neurol. Int.* – 2014. – Vol. 5, Suppl. 7. – S373-375.
111. Lamble, A. Enhanced VISTA expression in a subset of patients with acute myeloid leukemia / Lamble A. [et al.] // *American Society of Hematology Washington, DC.* 2016.

112. Le Mercier, I. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity / I. Le Mercier, W. Chen, J.L. Lines, M. Day, J. Li, P. Sergent [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74, N 7. – P. 1933-1944.
113. Le, D.T. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer / D.T. Le, E. Lutz, J.N. Uram, E.A. Sugar, B. Onners, S. Solt [et al.] // *J. Immunother.* – 2013. – Vol. 36, N 7. – P. 382-389.
114. Lee, J.A. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma / Lee J.A., Jung J.S., Kim D.H. [et al.] // *Pediatr. Blood Cancer.* – 2011. – Vol. 56, N 5. – P. 738-743.
115. Liao, H. Expression of V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation is associated with the advanced stage and presence of lymph node metastasis in ovarian cancer / H. Liao, H. Zhu, S. Liu, H. Wang // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 16, N 3. – P. 3465-3472.
116. Liao, Y. Targeting programmed cell death ligand 1 by CRISPR/Cas9 in osteosarcoma cells / Y. Liao, L. Chen, Y. Feng, J. Shen, Y. Gao, G. Cote [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 18. – P. 30276–30287.
117. Lindsey, B.A. Osteosarcoma Overview / B.A. Lindsey, J.E. Markel, E.S. Kleinerman // *Rheumatol. Ther.* – 2017. – Vol. 4, N 1. – P. 25-43.
118. Lines, J.L. VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy / J.L. Lines, L.F. Sempere, T. Broughton, L. Wang, R. Noelle // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2, N 6. – P. 510-517.
119. Liu, J. High-Density Infiltration of V-domain Immunoglobulin Suppressor of T-cell Activation Up-regulated Immune Cells in Human Pancreatic Cancer / J. Liu, X. Xie, C. Xuan, T. Li, L. Wang, L. Teng, J. Liu // *Pancreas.* – 2018. – Vol. 47, N 6. – P. 725-731.
120. Liu, J. Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses / J. Liu, Y. Yuan, W. Chen, J. Putra, A.A. Suriawinata, A.D. Schenk [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2015. – Vol. 112, N 21. – P. 6682-6687.
121. Lizee, G. Harnessing the power of the immune system to target cancer / G. Lizee, W.W. Overwijk, L. Radvanyi, J. Gao, P. Sharma, P. Hwu // *Annu. Rev. Med.* – 2013. – Vol. 64. – P. 71-90.
122. Loeser, H. Integrin alpha V (ITGAV) expression in esophageal adenocarcinoma is associated with shortened overall-survival / H. Loeser, M. Scholz, H. Fuchs, A. Essakly, A.I. Damanakis, T. Zander [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1:18411.

123. Lopez-Pousa, A. Giant cell tumour of bone: new treatments in development / A. Lopez-Pousa, J.M. Broto, T. Garrido, J. Vazquez // Clin. Transl. Oncol. – 2015. – Vol. 17, N 6. – P. 419-430.
124. Lussier, D.M. Combination immunotherapy with α -CTLA-4 and α -PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma / D.M. Lussier, J.L. Johnson, P. Hingorani, J.N. Blattman // J. Immunother. Cancer. – 2015. – Vol. 3. – P. 21.
125. Maeda, N. Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients / N. Maeda, K. Yoshimura, S. Yamamoto, A. Kuramasu, M. Inoue, N. Suzuki [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2014. – Vol. 21, Suppl. 4. – P. 546-555.
126. Mak, I.W. A Translational Study of the Neoplastic Cells of Giant Cell Tumor of Bone Following Neoadjuvant Denosumab / Mak I.W., Evaniew N., Popovic S. [et al.] // J. Bone Joint. Surg. Am. – 2014. – Vol. 96, N 15:e127.
127. Mataraza, J.M. Recent advances in immuno-oncology and its application to urological cancers / J.M. Mataraza, P. Gotwals // BJU Int. – 2016. – Vol. 118, N 4. – P. 506-514.
128. McEachron, T.A. Profiling targetable immune checkpoints in osteosarcoma / T.A. McEachron, T.J. Triche, L. Sorenson, D.M. Parham, J.D. Carpten // Oncoimmunology. – 2018. – Vol. 7, N 12:e1475873.
129. McGranahan, N. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade / N. McGranahan, A.J. Furness, R. Rosenthal, S. Ramskov, R. Lyngaa, S.K. Saini [et al.] // Science. – 2016. – Vol. 351, N 6280. – P. 1463-1469.
130. Meazza, C. Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment / C. Meazza, P. Scanagatta // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2016 – Vol. 16, N 5. – P. 543-556.
131. Mehta, N. Structure and Functional Binding Epitope of V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation / N. Mehta, S. Maddineni, I.I. Mathews, R. Andres Parra Sperberg, P.S. Huang, J.R. Cochran // Cell Rep. – 2019. – Vol. 28, N 10. – P. 2509-2516.e5.
132. Mercatali, L. RANK/RANK-L/OPG in Patients with Bone Me-tastases Treated with Anticancer Agents and Zoledronic Acid: A Prospective Study / Mercatali L., Ricci M., Scarpi E. [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14, N 6. – P. 10683-10693.
133. Merchant, M.S. Phase I clinical trial of ipilimumab in pediatric patients with advanced solid tumors / M.S. Merchant, M. Wright, K. Baird, L.H. Wexler, C.

- Rodriguez-Galindo, D. Bernstein [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2016. – Vol. 22, N 6. – P. 1364-1370.
134. Merck, Multiplexed Evaluation of Soluble Immune-Checkpoint Molecules | MILLIPLEX® Assays. – 2023.
135. Mery, B. Biological aspects of chondrosarcoma: Leaps and hurdles / B. Mery, S. Espenel, J.B. Guy, C. Rancoule, A. Vallard, M.T. Aloy [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2018. – Vol. 126. – P. 32-36.
136. Meyers, P.A. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival – a report from the Children’s Oncology Group / P.A. Meyers, C.L. Schwartz, M.D. Krailo, J.H. Healey, M.L. Bernstein, D. Betcher [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 26, N 4. – P. 633–638.
137. Mikami, S. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma / Mikami S., Oya M., Mizuno R. [et al.] // Med. Mol. Morphol. – 2013. – Vol. 47, N 2. – P. 63-67.
138. Mills, A.M. Targetable immune regulatory molecule expression in high-grade serous ovarian carcinomas in African American Women: a study of PD-L1 and IDO in 112 cases from the African American Cancer Epidemiology Study (AACES) / A.M. Mills, L.C. Peres, A. Meiss, K.L. Ring, S.C. Modesitt, S.E. Abbott [et al.] // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2019. – Vol. 38, N 2. – P. 157-170.
139. Mori, K. Human osteosarcoma cells express functional re-ceptor activator of nuclear factor-kappa B / Mori K., Le Goff B., Berreur M. [et al.] // J. Pathol. – 2007. – Vol. 211, N 5. – P. 555-562.
140. Mori, K. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? / K. Mori, K. Ando, D. Heymann, F. Redini // Histol. Histopathol. – 2009. – Vol. 24, N 2. – P. 235-242.
141. Mori, K. Receptor activator of nuclear factor-kappaB lig-and (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells / Mori K., Berreur M., Blanchard F. [et al.] // Oncol. Rep. – 2007. – Vol. 18, N 6. – P. 1365-1371.
142. Mulati, K. VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function / K. Mulati, J. Hamanishi, N. Matsumura, K. Chamoto, N. Mise, K. Abiko [et al.] // Br. J. Cancer. – 2019. – Vol. 120, N 1. – P. 115-127.
143. Müller, C.R. Interferon-alpha as the only adjuvant treatment in high-grade osteosarcoma: long term results of the Karolinska hospital series / C.R. Müller, S. Smeland, H.C.F. Bauer, G. Saeter, H. Strander // Acta Oncol. – 2005. – Vol. 44, N 5. – P. 475–480.

144. Ni, L. New checkpoints in cancer immunotherapy / L. Ni, C. Dong // *Immunol. Rev.* – 2017. – Vol. 276, N 1. – P. 52-65.
145. Nowak, E.C. Immunoregulatory functions of VISTA / E.C. Nowak, J.L. Lines, F.S. Varn, J. Deng, A. Sarde, R. Mabaera [et al.] // *Immunol Rev.* – 2017. – Vol. 276, N 1. – P. 66-79.
146. Okudaira, K. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model / K. Okudaira, R. Hokari, Y. Tsuzuki, Y. Okada, S. Komoto, C. Watanabe [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2009. – Vol. 35, N 4. – P. 741-749.
147. Orosz, Z. Giant Cell-Containing Tumors of Bone / Z. Orosz, N.A. Athanasou // *Surg. Pathol. Clin.* – 2017. – Vol. 10, N 3. – P. 553-573.
148. Pelle, D.W. Targeting receptor-activator of nuclear kap-paB ligand in aneurysmal bone cysts: verification of target and therapeutic response / Pelle D.W., Ringler J.W., Peacock J.D. [et al.] // *Transl. Res.* – 2014. – Vol. 164, N 2. – P. 139-148.
149. Peng, M. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy / M. Peng, Y. Mo, Y. Wang, P. Wu, Y. Zhang, F. Xiong [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2019. – Vol. 23, N 18. – P. 128.
150. Peng, X. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer / Peng X., Guo W., Ren T. [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 3:e58361.
151. Pilonis, K.A. Converging focal radiation and immunotherapy in a preclinical model of triple negative breast cancer: contribution of VISTA blockade / K.A. Pilonis, M. Hensler, C. Daviaud, J. Kraynak, J. Fucikova, L. Galluzzi [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2020. – Vol. 9, N 1:1830524.
152. Redondo, A. Malignant bone tumors (other than Ewing's): clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up by Spanish Group for Research on Sarcomas (GEIS) / A. Redondo, S. Bagué, D. Bernabeu, E. Ortiz-Cruz, C. Valverde, R. Alvarez [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 80, N 6. – P. 1113-1131.
153. Ribas, A. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade / A. Ribas, J.D. Wolchok // *Science.* – 2018. – Vol. 23, N 359. – P. 1350-1355.
154. Rizvi, N.A. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer / N.A. Rizvi, M.D. Hellmann, A. Snyder, P. Kvistborg, V. Makarov, J.J. Havel [et al.] // *Science.* – 2015. – Vol. 348, N 6230. – P. 124-128.
155. Rosen, G. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma / G. Rosen, M.L. Murphy, A.G. Huvos, M. Gutierrez, R.C. Marcove // *Cancer.* – 1976. – Vol. 37, N 1. – P. 1-11.

156. Rousseau, J. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models / J. Rousseau, V. Escriou, F. Lamoureux, R. Brion, J. Chesneau, S. Battaglia [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2011. – Vol. 26, N 10. – P. 2452-2462.
157. Rucci, N. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 / Rucci N., Millimaggi D., Mari M. [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, N 15. – P. 6150-6160.
158. Sakr, M.A. GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase / M.A. Sakr, T. Takino, T. Domoto, H. Nakano, R.W. Wong, M. Sasaki [et al.] // *Cancer Science.* – 2010. – Vol. 101, N 11. – P. 2368-2374.
159. Santini D., Perrone G., Roato I. [et al.] Expression pattern of receptor activator of NF-kap-paB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases / Santini D., Perrone G., Roato I. [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 226, N 3. – P. 780-784.
160. Saraf, A.J. Osteosarcoma: Accelerating Progress Makes for a Hopeful Future / A.J. Saraf, J.M. Fenger, R.D. Roberts // *Front Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 4.
161. Schmid, P. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer / P. Schmid, S. Adams, H.S. Rugo, A. Schneeweiss, C.H. Barrios, H. Iwata [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – Vol. 29, N 379. – P. 2108-2121.
162. Sharma, P. The future of immune checkpoint therapy / P. Sharma, J.P. Allison // *Science.* – 2015. – Vol. 348, N 6230. – P. 56-61.
163. Shen, J.K. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma / J.K. Shen, G.M. Cote, E. Choy, P. Yang, D. Harmon, J. Schwab J. [et al.]. // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2, N 7. P. 690-698.
164. Singh, A.S. Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab / A.S. Singh, N.S. Chawla, S.P. Chawla. // *Biologics.* – 2015. – Vol. 9. – P. 69-74.
165. Snyder, L. ANTI - Vista Antibodies and Fragments / L. Snyder, G. Powers, M.A. Sepulveda, J. Alvarez // *Janssen Pharmaceutica Patent.* 2014. WO2016207717.
166. Tagliamento, M. VISTA: A Promising Target for Cancer Immunotherapy? / M. Tagliamento, E. Agostinetto, R. Borea, M. Brandão, F. Poggio, A. Addeo [et al.] // *Immunotargets Ther.* – 2021. – Vol. 10. – P. 185-200.
167. Tawbi, H.A. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase

- 2 trial / H.A. Tawbi, M. Burgess, V. Bolejack, B.A. Van Tine, S.M. Schuetze, J. Hu [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2017. – Vol. 18, N 11. – P. 1493-1501.
168. Taylor, R. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis / Taylor R., Knowles H.J., Athanasou N.A. // *J. Pathol.* – 2011. – Vol. 225, N 2. – P. 195-202.
169. Tempelaere, C. Osteosarcoma after the age of fifty: A clinicopathological study / C. Tempelaere, D. Biau, A. Babinet, P. Anract // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2019 – Vol. 45, N 7. – P. 1288-1292.
170. Torabi, A. PD-1 and PD-L1 expression in bone and soft tissue sarcomas / A. Torabi, C.N. Amaya, F.H. Jr. Wians, B.A. Bryan // *Pathology.* – 2017. – Vol. 49, N 5. – P. 506-513.
171. Tsuchie, H. Prognosis of Primary Osteosarcoma in Elderly Patients: A Comparison between Young and Elderly Patients / H. Tsuchie, M. Emori, H. Nagasawa, N. Miyakoshi, Y. Murahashi, J. Shimizu [et al.] // *Med. Princ. Pract.* – 2019. – Vol. 28, N 5. – P. 425-431.
172. Tsujikawa, T. Quantitative multiplex immunohistochemistry reveals myeloid-inflamed tumor-immune complexity associated with poor prognosis / T. Tsujikawa, S. Kumar, R.N. Borkar, V. Azimi, G. Thibault, Y.H. Chang [et al.] // *Cell Rep.* 2017. – Vol. 19, N 1. – P. 203-217.
173. Tsukahara, T. The future of immunotherapy for sarcoma / T. Tsukahara, M. Emori, K. Murata, E. Mizushima, Y. Shibayama, T. Kubo, T. Kanaseki [et al.] // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2016. – Vol. 16, N 8. – P. 1049-1057.
174. Ulas, A. Denosumab: Excellent response of metastatic giant cell tumor of the bone / Ulas A., Bulent Akinci M., Silay K. [et al.] // *J. BUON.* – 2015. – Vol. 20, N 2. – P. 666-667.
175. Unni, K.K. Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 10165 cases / K.K. Unni, C.Y. Inwards / Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
176. Van Allen, E.M. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma / E.M. Van Allen, D. Miao, B. Schilling, S.A. Shukla, C. Blank, L. Zimmer [et al.] // *Science.* – 2015. Vol. 350, N 6257. – P. 207-211.
177. Van den Eertwegh, A.J. Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 dose-escalation trial / A.J. Van den Eertwegh, J. Versluis, H.P. van den Berg, S.J. Santegoets, R.J. van Moorselaar, T.M. van der Sluis [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13, N 5. – P. 509-517.
178. Vaupel, P. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical Outcome / P. Vaupel, A. Mayer // *Cancer Metastasis Rev.* – 2007. – Vol. 26, N 2. – P. 225-239.

179. Villarroel-Espindola, F. Spatially Resolved and Quantitative Analysis of VISTA/PD-1H as a Novel Immunotherapy Target in Human Non-Small Cell Lung Cancer / F. Villarroel-Espindola, X. Yu, I. Datar, N. Mani, M. Sanmamed, V. Velcheti [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 24, N 7. – P. 1562-1573.
180. Vonderheide, R.H. Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma / R.H. Vonderheide, L.J. Bayne // *Curr. Opin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25, N 2. – P. 200-205.
181. Wachtel, M. Targets for cancer therapy in childhood sarcomas / M. Wachtel, B.W. Schäfer // *Cancer Treat. Rev.* – 2010. – Vol. 36, N 4. – P. 318-327.
182. Wagne, D. Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: are they of any help? / D. Wagner, A. Fahrleitner-Pammer // *Wien Med. Wochenschr.* – 2010. – Vol. 160, N 17-18. – P. 452-457.
183. Wagner, M.J. Chemotherapy for Bone Sarcoma in Adults / M.J. Wagner, J.A. Livingston, S.R. Patel, R.S. Benjamin // *J. Oncol. Pract.* – 2016. – Vol. 12, N 3. – P. 208-216.
184. Wang, J. VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T cell function / J. Wang, G. Wu, B. Manick, V. Hernandez, M. Renelt, C. Erickson [et al.] // *Immunology.* – 2019. – Vol. 156, N 1. – P. 74-85.
185. Wang, L. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses / L. Wang, R. Rubinstein, J.L. Lines, A. Wasiuk, C. Ahonen, Y. Guo [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208, N 3. – P. 577-592.
186. Wang, L. B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis / L. Wang, Q. Zhang, W. Chen, B. Shan, Y. Ding, G. Zhang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 8:e70689.
187. Wang, L. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity / L. Wang, I. Le Mercier, J. Putra, W. Chen, J. Liu, A.D. Schenk [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2014. – Vol. 111, N 41. – P. 14846-14851.
188. Wang, R. Multiplex profiling of peritoneal metastases from gastric adenocarcinoma identified novel targets and molecular subtypes that predict treatment response / R. Wang, S. Song, K. Harada, F. Amlashi, B. Badgwell, M. Pizzi [et al.] // *Gut.* – 2020. – Vol. 69, N 1. – P. 18-31.
189. Wang, Z. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1beta-stimulated

- human SW1353 chondrosarcoma cells / Wang Z., Ding L., Zhang S. [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2014. – Vol. 34, N 6. – P. 1720-1726.
190. Weber, J.S. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma / J.S. Weber, S. O'Day, W. Urba, J. Powderly, G. Nichol, M. Yellin [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, N 36. – P. 5950-5956.
191. Whelan, J.S. Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Chordoma / J.S. Whelan, L.E. Davis // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 36, N 2. – P. 188-194.
192. Whyte, M.P. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway / M.P. Whyte, S. Mumm // *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* – 2004. – Vol. 4, N 3. – P. 254-267.
193. Whyte, M.P. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling / M.P. Whyte // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1068. – P. 143-164.
194. Winograd, R. Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma / R. Winograd, K.T. Byrne, R.A. Evans, P.M. Odorizzi, A.R. Meyer, D.L. Bajor [et al.] // *Cancer Immunol. Res.* 2015. – Vol. 3, N 4. – P. 399-411.
195. Wolchok, J.D. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma / J.D. Wolchok, H. Kluger, M.K. Callahan, M.A. Postow, N.A. Rizvi, A.M. Lesokhin [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, N 2. – P. 122-133.
196. Wu, L. Expression of VISTA correlated with immunosuppression and synergized with CD8 to predict survival in human oral squamous cell carcinoma / L. Wu, W. Deng, C. Huang, L. Bu, G. Yu, L. Mao [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2017. – Vol. 66, N 5. – P. 627-636.
197. Xiao, X. The role of chemotherapy for metastatic, relapsed and refractory osteosarcoma / X. Xiao, W. Wang, Z. Wang // *Paediatr. Drugs.* – 2014. – Vol. 16, N 6. – P. 503-512.
198. Xie, S. Expression of the inhibitory B7 family molecule VISTA in human colorectal carcinoma tumors / S. Xie, J. Huang, Q. Qiao, W. Zang, S. Hong, H. Tan [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2018. – Vol. 67, N 11. – P. 1685-1694.
199. Xie, X. The Expression Pattern and Clinical Significance of the Immune Checkpoint Regulator VISTA in Human Breast Cancer / X. Xie, J. Zhang, Z. Shi, W. Liu, X. Hu, C. Qie [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11:563044.
200. Yang Y.S. SISP-1, a novel p53 target gene and use thereof. Google Patents. 201.
201. Yang, J.C. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis / J.C.

- Yang, M. Hughes, U. Kammula, R. Royal, R.M. Sherry, S.L. Topalian [et al.] // *J. Immunother.* – 2007. – Vol. 30, N 8. – P. 825-830.
202. Yang, W. Construction of a versatile expression library for all human single-pass transmembrane proteins for receptor pairings by high throughput screening / W. Yang, S.B. Padkjær, J. Wang, Z. Sun, B. Shan, L. Yang, H. Chen [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 260. – P. 18-30.
203. Yoon, K.W. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53 / K.W. Yoon, S. Byun, E. Kwon, S.Y. Hwang, K. Chu, M. Hiraki [et al.] // *Science.* – 2015. – Vol. 349, N 6247:1261669.
204. Zelin, H. Prognostic significance and therapeutic potential of the immune checkpoint VISTA in pancreatic cancer / H. Zelin, P. Yu, F. Qinglin, L. Yali, Z. Yuanyuan, L. Ying [et al.] // *Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2021. – Vol. 147, N 2. – P. 517-531.
205. Zhang, M. VISTA expression associated with CD8 confers a favorable immune microenvironment and better overall survival in hepatocellular carcinoma / M. Zhang, H.J. Pang, W. Zhao, Y.F. Li, L.X. Yan, Z.Y. Dong [et al.] // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 511.
206. Zheng, B. PD-1 axis expression in musculoskeletal tumors and antitumor effect of nivolumab in osteosarcoma model of humanized mouse / B. Zheng, T. Ren, Y. Huang, K. Sun, S. Wang, X. Bao [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2018. – Vol. 11, N 1. – P. 16.
207. Zheng, K. Giant cell tumor of the pelvis: a systematic review / K. Zheng, Z. Wang, S.J. Wu, Z.M. Ye, S.F. Xu, M. Xu [et al.] // *Orthop. Surg.* – 2015. – Vol. 7, N 2. – P. 102-107.
208. Zong, L. Expression of the immune checkpoint VISTA in breast cancer / L. Zong, S. Mo, S. Yu, Y. Zhou, M. Zhang, J. Chen [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2020. – Vol. 69, N 8. – P. 1437-1446.
209. Zong, L. VISTA expression is associated with a favorable prognosis in patients with high-grade serous ovarian cancer / L. Zong, Y. Zhou, M. Zhang, J. Chen, Y. Xiang // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2020. – Vol. 69, N 1. – P. 33-42.
210. Zong, L. High VISTA Expression Correlates With a Favorable Prognosis in Patients With Colorectal Cancer / L. Zong, S. Yu, S. Mo, Y. Zhou, Y. Xiang, Z. Lu, J. Chen // *J. Immunother.* – 2021 – Vol. 44, N 1. P. 22–28.