

Возможность прогнозирования эффективности лечения сарком мягких тканей на основе особенностей их иммунологического микроокружения

*Елена Юрьевна Златник, Инна Арнольдовна Новикова,
Евгения Марковна Непомнящая*, Олеся Николаевна Селютина,
Татьяна Валерьевна Аушева, Тимур Арсенович Алиев,
Лариса Николаевна Ващенко, Елена Петровна Ульянова,
Наталья Михайловна Мащенко*

*Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
г. Ростов-на-Дону, Россия*

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-167

Цель. Изучить возможность использования оценки факторов локального клеточного иммунитета для прогнозирования эффективности лечения сарком мягких тканей.

Методы. В исследование вошли 38 пациентов с саркомой мягких тканей: 22 с первичными опухолями и 16 с рецидивными, находившихся на хирургическом лечении в 2014–2016 гг. У всех пациентов с целью оценки показателей локального иммунитета исследовали полученные интраоперационно ткани опухоли, перитуморальной зоны и условно здоровые ткани, соответствующие линиям резекции (всего 114 образцов). Образцы тканей гомогенизировали, субпопуляции лимфоцитов определяли на проточном цитометре.

Результаты. Исследованы характеристики лимфоцитарного микроокружения сарком мягких тканей в связи с клиническим эффектом комплексного лечения больных. При первичных саркомах развитию у больных бессобытийной выживаемости более 12 мес после операции соответствовало более высокое содержание НК-клеток в ткани опухоли и более высокое соотношение уровней NKT-лимфоцитов в перитуморальной зоне и опухоли, а также более низкий уровень Tregs, чем у больных с бессобытийной выживаемостью менее 12 мес. При рецидивных саркомах короткая бессобытийная выживаемость была связана с высокими показателями уровня DN-клеток в опухоли и соотношения доли CD3⁺-лимфоцитов в перитуморальной зоне и опухоли. Все указанные различия статистически значимы ($p < 0,05$).

Вывод. Клинический эффект комплексного лечения сарком мягких тканей связан с исходным состоянием иммунологического микроокружения опухоли; ряд показателей локального клеточного иммунитета можно рассматривать в качестве прогностических факторов, различных для первичных и рецидивных сарком.

Ключевые слова: саркома мягких тканей, прогностические факторы, бессобытийная выживаемость, локальный иммунитет, субпопуляции лимфоцитов.

Possibility of predicting the efficiency of soft tissue sarcoma treatment on the basis of features of their immunological microenvironment

*E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, E.M. Nepomnyashchaya, O.N. Selyutina, T.V. Ausheva, T.A. Aliev, L.N. Vashchenko,
E.P. Ulyanova, N.M. Mashchenko*

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Aim. To study the possibility of using the evaluation of local cellular immunity factors for predicting the efficiency of soft tissue sarcoma treatment.

Methods. The study included 38 patients with soft tissue sarcoma: 22 with primary and 16 with recurrent tumors, admitted for surgical treatment in 2014–2016. In all patients, the intraoperative tumor tissue samples, peritumoral zone and relatively intact tissue samples corresponding to the resection lines (a total of 114 samples) were studied to assess the local immunity indices. The tissue samples were homogenized, lymphocyte subsets were detected with a flow cytometer.

Results. Characteristics of immunological lymphocytic microenvironment of soft tissue sarcomas were studied in connection with the clinical effect of complex treatment of patients. In primary sarcomas, event-free survival at over 12 months after the surgery was related to higher level of NK-cells in tumor tissue and higher level of NKT-lymphocytes in peritumoral zone and tumor, as well as lower Tregs level than in patients with event-free survival for less than 12 months. In recurrent sarcomas, poor event-free survival was associated with high level of DN-cells in the tumor and peritumoral zone/tumor ratio for CD3⁺ lymphocytes. All the detected differences were statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion. The clinical effect of complex treatment of soft tissue sarcomas is related to the initial state of immunological microenvironment of the tumor; some indicators of local cellular immunity can be regarded as prognostic factors different for primary and recurrent sarcomas.

Keywords: soft tissue sarcoma, prognostic factors, event-free survival, local immunity, lymphocyte subsets.

Развитие и течение злокачественных опухолей зависят от многочисленных экзогенных и эндогенных факторов, среди которых важное место занимает взаимодействие опухолевых клеток и иммунной системы организма. Однако, если прогностическая оценка пролиферативной активности опухолевых клеток и васкуляризации опухоли получила однозначную интерпретацию, то лимфоцитарная инфильтрация продолжает оставаться областью противоречивых трактовок.

К настоящему времени известно, что иммунологическое микроокружение злокачественных опухолей неодинаково при различной локализации, гистологической характеристике, стадии, степени дифференцировки, плоидности опухоли [1, 2] и других факторах, определяющих прогноз заболевания, что позволяет рассматривать особенности тканевого субпопуляционного состава лимфоцитов в прогностическом аспекте. Так, при прогностически наиболее благоприятном люминальном А-подтипе рака молочной железы описано максимальное количество НК-клеток в ткани опухоли по сравнению с опухолями других подтипов [3], а более длительная выживаемость больных связана с максимальным присутствием среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов CD8⁺-клеток [4]. У больных раком вульвы, у которых первый этап лечения был хирургическим, а в дальнейшем после проведения химиолучевой терапии развилась длительная ремиссия, первоначальный уровень Т-лимфоцитов в опухоли был выше за счёт CD8⁺-клеток, чем в опухолях больных с кратковременной ремиссией [5].

Исследования связи клинического течения и особенностей локального иммунитета при саркомах мягких тканей (СМТ) немногочисленны, хотя методы иммунотерапии этой патологии активно разрабатываются [6–9]. Данные опухоли отличаются тяжёлым течением, ранним и нередко многократным рецидивированием, слабой чувствительностью к принятым методам лечения, морфологической гетерогенностью [10, 11].

Инвалидизирующие операции, быстрая генерализация и в целом неблагоприятное течение СМТ делают особенно значимой разработку различных лабораторных тестов, направленных на улучшение диагностики, прогнозирования и возможной коррекции лечения. Хотя СМТ и гетерологичны по гистологическому строению, что

затрудняет поиск универсальных прогностических критериев, иммунологическое микроокружение связано не только с гистогенезом. Ранее нами, кроме обнаружения ряда различий показателей локального клеточного иммунитета при СМТ между образцами опухоли, перитуморальной зоны и линии резекции, особенности лимфоцитарного состава были также найдены в тканях первичных и рецидивных опухолей, а некоторые из этих особенностей представляются связанными со степенью дифференцировки опухоли [12].

Цель исследования — изучить возможность использования оценки факторов локального клеточного иммунитета для прогнозирования клинической динамики СМТ.

Исследование проведено на базе ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Министерства здравоохранения России».

Под наблюдением находились 38 пациентов с верифицированными злокачественными опухолями мягких тканей туловища и конечностей, проходивших хирургическое лечение с 2014 по 2016 гг. Сроки наблюдения за больными составили от 12 до 30 мес. В выборке были пациенты с первичными СМТ (n=22) и рецидивными опухолями (n=16), в целом сопоставимые по стадиям процесса, гистологическим подтипам опухолей, возрасту и гендерному составу (табл. 1).

У всех оперированных больных по линиям резекции опухолевые клетки не обнаруживались, по завершении оперативного этапа лечения больные получали адъювантную химио- и лучевую терапию в соответствии со стандартами лечения.

При проведении оценки результатов мы принимали во внимание индивидуальные особенности течения заболевания, на основании которых выделяли больных с условно благоприятным (отсутствие прогрессирования заболевания более 1 года после операции) и неблагоприятным (прогрессирование в течение 12 мес) течением заболевания. У всех пациентов с целью оценки показателей локального иммунитета исследовали полученные интраоперационно ткани опухоли, перитуморальной зоны и условно здоровые ткани, соответствующие линиям резекции (всего 114 образцов).

Образцы тканей измельчали с помощью BD Medimachine. Клеточные факторы локального иммунитета определяли

Таблица 1. Характеристика больных саркомой мягких тканей

Группы пациентов		С первичными опухолями (n=22)	С рецидивными опухолями (n=16)
Средний возраст, годы		53,6	54,8
Пол	мужской	10	8
	женский	12	8
Стадия заболевания	I	0	0
	II	7	5
	III	14	9
	IV	1	2
GRADE	HIGH	5	4
	LOW	17	12
Гистотип опухоли	Липосаркома	4	3
	Недифференцированная плеоморфная саркома	7	5
	Синовиальная саркома	1	1
	Лейомиосаркома	4	3
	Рабдомиосаркома	1	1
	Злокачественная шваннома	1	1
	Ангиосаркома	2	—
	Миксосаркома	1	1
	Злокачественная мезенхимомы	1	0
	Фибросаркома	0	1

на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, USA). Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов ткани опухоли, перитуморальной зоны и линии резекции оценивали с использованием моноклональных антител BD; исследовали не менее 10^6 событий. Определяли количественное содержание CD45⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19, CD16/56⁺, DN (CD3⁺CD4⁻CD8⁻), DP (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), NKT (CD3⁺CD16/56⁺), CD4⁺CD25⁺CD127dim (T-регуляторных, T-regs) клеток. Долю лимфоцитов, положительных по указанным маркерам, вычисляли в процентах от общего числа CD45-положительных лимфоцитов, а для T-regs — в процентах от CD3⁺CD4⁺-клеток. Кроме того, для каждого показателя клеточного иммунитета вычисляли соотношение, в числителе которого было процентное его содержание в перитуморальной зоне, а в знаменателе — в опухоли (ПЗ/ОП).

Статистическую обработку результатов оценки показателей локального иммунитета выполняли с использованием

параметрических (критерий Стьюдента) и непараметрических (критерий Уилкоксона–Манна–Уитни) методов. Бессобытийную выживаемость больных первичными и рецидивными СМТ определяли по методу Каплана–Мейера.

На основании показателей бессобытийной выживаемости больные первичными и рецидивными СМТ были разделены на четыре группы. На рис. 1 представлена бессобытийная выживаемость больных исследованных групп, рассчитанная по Каплану–Мейеру, причём «событием», как правило, было рецидивирование.

Среди 22 больных первичными СМТ у 18 бессобытийный период составил 12 мес и выше (первая группа), у 4 больных он оказался меньше 12 мес (вторая группа). При дальнейшем наблюдении различия бессобытийной выживаемости у этих больных были статистически значимы (см. рис. 1, А).

В группе из 16 рецидивных больных у 9 бессобытийная выживаемость превысила, а у 7 — не превысила 12 мес (третья и четвертая группы соответственно).

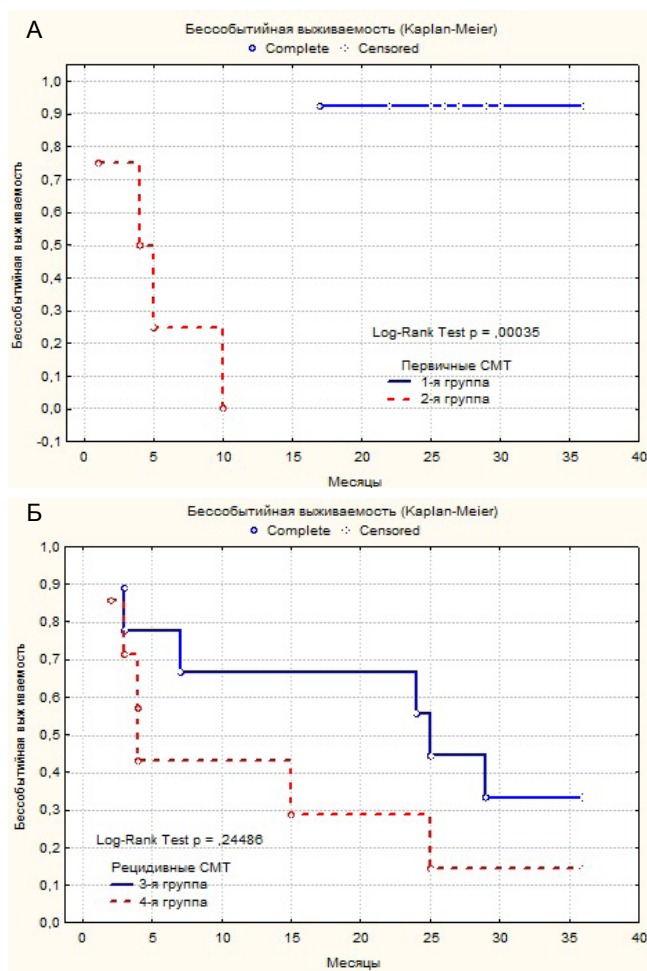


Рис. 1. Бессобытийная выживаемость больных первичными (А) и рецидивными (Б) саркомами мягких тканей

Указанные различия, хотя и выявлены в виде тенденции, выглядят демонстративно, особенно в период наблюдения 12–24 мес (см. рис. 1, Б).

Наиболее низкую бессобытийную выживаемость больных второй группы можно объяснить тем, что при развитии первого же рецидива они переходили в третью и четвертую группы и далее находились под наблюдением в их составе. Показатели локального содержания факторов клеточного иммунитета, имеющих статистически достоверные различия в зависимости от развившегося клинического эффекта, у больных сравниваемых групп представлены на рис. 2.

Различия между показателями первой и второй групп по уровням НК-клеток, Tregs и между показателями третьей и четвертой групп по DN-лимфоцитам статистически достоверны ($p < 0,05$).

Как видно из рис. 2, А, у больных первой и второй групп отмечены статистически значимые различия по уровням НК-клеток и Tregs в опухолевой ткани. Более высокий уровень НК-клеток ($12,2 \pm 1,6\%$ против $6,1 \pm 1,2\%$) и более низкий уровень Tregs ($7,52 \pm 0,9\%$ против $12,8 \pm 1,7\%$ CD3⁺CD4⁺-клеток) были ассоциированы с более длительной бессобытийной выживаемостью больных первичными CMT.

При рецидивных CMT раннее развитие повторных рецидивов было связано с более высоким уровнем DN-клеток в опухоли ($9,3 \pm 2,2\%$ против $5,5 \pm 0,8\%$; см. рис. 2, Б). Все указанные различия были статистически значимы ($p < 0,05$).

Другие показатели иммунологического микроокружения опухоли не продемонстрировали статистически достоверных межгрупповых различий, их

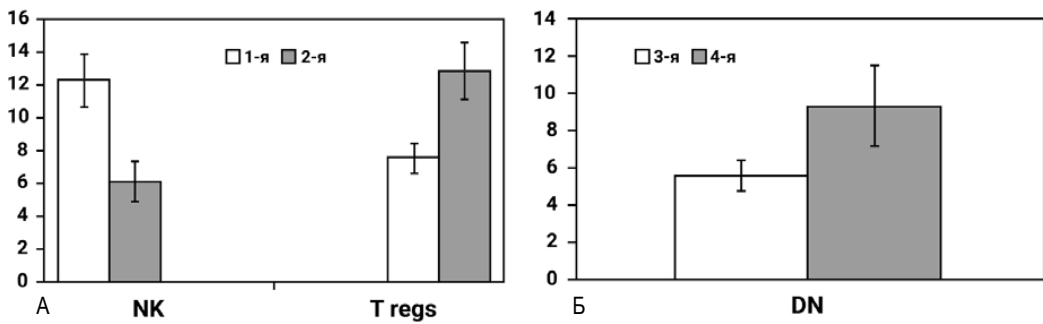


Рис. 2. Некоторые показатели локального иммунитета у больных саркомой мягких тканей (СМТ) с различным эффектом от лечения (ось Y — %); А — первичные СМТ (n=22); Б — рецидивные СМТ (n=16); первая группа — первичные СМТ с бессобытийным периодом 12 мес и выше (n=18); вторая группа — первичные СМТ с бессобытийным периодом до 12 мес (n=4); третья группа — рецидивные СМТ с бессобытийным периодом 12 мес и выше (n=9); четвертая группа — рецидивные СМТ с бессобытийным периодом 12 мес и выше (n=7)

не было также у показателей лимфоцитарного состава перитуморальных зон и линий резекции. Однако сравнительный анализ коэффициентов соотношения процентного содержания исследованных субпопуляций лимфоцитов в перитуморальной зоне по отношению к их содержанию в опухоли позволил установить следующие статистически достоверные различия. При первичных СМТ у больных первой группы отмечен более высокий коэффициент ПЗ/ОП для НКТ-лимфоцитов, который составлял $2,16 \pm 0,62$ против $0,81 \pm 0,084$ у больных второй группы ($p < 0,05$). При рецидивных СМТ коэффициент ПЗ/ОП, вычисленный для T(CD3⁺)-лимфоцитов, был статистически значимо ниже в третьей группе по сравнению с четвертой ($0,67 \pm 0,055$ и $1,17 \pm 0,2$ соответственно; $p < 0,05$).

Итак, выявлены статистически значимые различия некоторых показателей локального иммунитета у больных СМТ с различной бессобытийной выживаемостью после операции и проведенным адьювантным лечением.

При первичных СМТ низкое содержание НК-клеток и высокое Tregs в микроокружении опухоли ассоциировалось с рецидивированием, развивающимся в течение первого года после операции. Опухоли больных с бессобытийным периодом от 1 до 3 лет и более, напротив, характеризовались высоким локальным уровнем НК-клеток и более низким Tregs в опухоли, а также более высоким соотношением ПЗ/ОП для НК-Т-лимфоцитов. При рецидивных СМТ риск неблагоприятной клинической динамики был выше у больных с высоким уровнем DN-лимфоцитов в опухоли.

На основании представленных данных получен патент РФ №2625035 [13].

Обнаружение в ткани рецидивных СМТ высоких уровней DN-Т-лимфоцитов, не экспрессирующих рецепторов основных субпопуляций, возможно, отражает нарушения процессов дифференцировки Т-клеток, находящихся в микроокружении таких опухолей. Эти лимфоциты считают принадлежащими к субпопуляции Т-клеток с TCR $\gamma\delta$, которые могут обладать свойствами Tregs [14], хотя у них и не выявлено FoxP3. В норме их высокие количества содержатся в вилочковой железе (тимусе) и лимфоидном аппарате желудочно-кишечного тракта [15], однако описано повышение их уровня в крови при некоторых злокачественных опухолях [16], что предполагает негативные изменения иммунного статуса.

Судя по полученным нами данным, высокий уровень этих лимфоцитов в микроокружении опухоли делает его менее иммунологически полноценным, с чем может быть связано и неоднократное рецидивирование, наблюдаемое в данной группе больных. Что касается присутствия иммунофенотипически документированных Tregs в опухоли, то их негативная роль многократно описана при различных видах онкологической патологии, как и положительное значение наличия в опухолевом очаге НК-и НКТ-лимфоцитов, считающихся важнейшими факторами противоопухолевой защиты.

Ранее нами было показано более низкое содержание в ткани рецидивных СМТ по сравнению с первичными CD3⁺CD8⁺-Т-лимфоцитов и более высокое — Tregs, что,

по-видимому, характеризует иммуносупрессию, связанную с угнетением цитотоксического звена адаптивного иммунитета при рецидивах. Кроме того, при рецидивных СМТ показатели локального иммунитета в тканях, прилежащих к опухоли, менее значительно отличаются от показателей самой опухоли, чем при первичных, что предполагает выраженное дистантное влияние опухоли, связанное с преимущественным подавлением цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺ и CD16/56⁺) [12]. Отмеченную в работе W.W. Tsengetal (2014) [8] отрицательную связь присутствия опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов с общей и бессобытийной продолжительностью жизни больных липосаркомами авторы связывают с найденной ими гиперэкспрессией рецептора апоптоза PD-1 на CD8⁺-лимфоцитах и редкой частотой выявления NK-клеток в опухолях.

Итак, в нашей работе на исследованном контингенте больных были установлены потенциально прогностически значимые иммунологические характеристики микроокружения СМТ, различные у первичных и рецидивных опухолей. Для демонстрации полученных результатов приводим клинические примеры, демонстрирующие различный статус у больных СМТ с неблагоприятным и благоприятным прогнозом.

Пример №1.

Больной Д. Диагноз: «Рецидивирующая лейомиосаркома мягких тканей области правого плечевого сустава, G3pT2bN0M0, стадия III, состояние после комбинированного лечения (операция + адъювантная паллиативная химиотерапия в 2015 г., операция + 3 курса химиотерапии 2-й линии). Рецидив №2, состояние после хирургического лечения + 4 курса адъювантной паллиативной химиотерапии. Рецидив №3, генерализация процесса, метастазы в лёгкие, клиническая группа 2».

Гистологический анализ №60975-8/15 от 5.08.2015: «G3-лейомиосаркома с некрозом и кровоизлияниями».

Анамнез заболевания. 10.12.2014 по поводу диагноза «Лейомиосаркома мягких тканей области правого плечевого сустава, G3pT2bN0M0, стадия III, состояние после хирургического лечения, клиническая группа 2» выполнена операция: удаление опухоли мягких тканей области правого плеча с пластикой ротационным кожно-жировым лоскутом. По месту жительства проведён курс паллиативной химиотерапии:

ифосфамид 2,5 г/м² 1–3-й дни + месна 100% 1–4-й дни, дакарбазин 250 мг/м² 1–3-й дни, доксорубин 20 мг/м² 1–3-й дни. Без эффекта.

На фоне проводимого лечения у больного развился рецидив. 24.03.2015 удаление рецидива опухоли мягких тканей области правого плечевого сустава с резекцией акромиального отростка и пластикой аутодермотрансплантатом. Гистологический анализ: недифференцированная опухоль мягких тканей с обширными очагами некроза, инфильтративным ростом, G3. В поперечнополосатых мышцах крупные петрификаты. С 10.04.2015 по 02.06.2015 проведено 3 курса химиотерапии 2-й линии: трабектедин (йонделис) 2,5 мг на 500 мл изотонического раствора натрия хлорида внутривенно капельно.

Результаты исследования показателей локального иммунитета.

– Первичная опухоль (10.12.2014): CD3⁺ 78,3%, CD3⁺CD4⁺ 27,6%, CD3⁺CD8⁺ 43,6%, CD16/56⁺ 4,5%, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 6,5%, CD3⁺CD16/56⁺ 6,0%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127dim 25,3%.

– Перитуморальная зона: CD3⁺ 50,6%, CD3⁺CD4⁺ 21,0%, CD3⁺CD8⁺ 23,5%, CD16/56⁺ 5,6%, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 6,1%, CD3⁺CD16/56⁺ 3,6%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127dim 6,2%.

– Рецидивная опухоль (24.03.2015): CD3⁺ 83,1%, CD3⁺CD4⁺ 37,3%, CD3⁺CD8⁺ 23,1%, CD16/56⁺ 8,0%, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 22,2%, CD3⁺CD16/56⁺ 3,5%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127dim 20,8%.

– Перитуморальная зона: CD3⁺ 66,8%, CD3⁺CD4⁺ 31,5%, CD3⁺CD8⁺ 24,5%, CD16/56⁺ 6,6%, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 17,4%, CD3⁺CD16/56⁺ 2,3%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127dim 5,7%.

Проведённое лечение: 28.07.2015 — удаление опухоли области правого плечевого сустава с пластикой ротационным лоскутом.

Заключение: анализ иммунологических показателей свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания с развитием рецидивов.

В результате в феврале 2016 г. пациент обратился с жалобами на рецидив опухоли в области послеоперационного рубца размерами до 5×5×6 см, опухоль изъязвленная, экзофитной формы. При спиральной рентгеновской компьютерной томографии органов грудной клетки выявлены множественные метастазы в лёгкие. Направлен по месту жительства для проведения 6 курсов адъювантной паллиативной химиотерапии.

Пример №2.

Больной Б. Диагноз: «СМТ правой голени T2bN0M0 (pG3T2bN0M0), стадия III, состояние после хирургического лечения. Клиническая группа 2».

Анамнез. Опухоль появилась около 6 лет назад после тупой травмы. Сначала опухоль была небольших размеров, затем прогрессивно увеличилась, с чем больной и обратился в Ростовский научно-исследовательский онкологический институт.

Проведённое лечение: 17.04.14 фасциально-фулярное удаление опухоли мягких тканей правой голени.

Гистологический анализ №31355-362; 31363-366 от 22.04.2014: G3-полиморфная липосаркома. По линии резекции опухоли нет.

Результаты исследования показателей локального иммунитета (17.04.2014).

– Опухоль: CD3⁺ 62,9%, CD3⁺CD4⁺ 17,7%, CD3⁺CD8⁺ 41,8%, CD16/56⁺ 29,6%, CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 3,3%, CD3⁺CD16/56⁺ 7,2%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127dim 2,3%.

– Перитуморальная зона: CD3⁺ 65,5%, CD3⁺CD4⁺ 18,6%, CD3⁺CD8⁺ 45,4%, CD16/56⁺ 33,6%, CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 1,3%, CD3⁺CD16/56⁺ 15,3%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127dim 1,2%.

Заключение: анализ иммунологического статуса свидетельствует о благоприятном прогнозе.

В результате развитие рецидива не зарегистрировано.

В представленной статье конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кит О.И., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А. и др. Взаимоотношения ploидности и параметров локального иммунитета при опухолях толстой кишки. *Молекулярная мед.* 2016; (1): 26–30. [Kit O.I., Zlatnik E.Yu., Nikipelova E.A. et al. Relationship of ploidity and local immunity in tumors of the colon. *Molekulyarnaya meditsina.* 2016; (1): 26–30. (In Russ.)]

2. Li B., Severson E., Pignon J.C. et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol.* 2016; 17 (1): 174. DOI: 10.1186/s13059-016-1028-7.

3. Новикова И.А., Шатова Ю.С., Златник Е.Ю. и др. Проллиферативные и иммунологические характеристики молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы. *Международ. ж. прикл. и фундам. исслед. (РАЕ).* 2014; 11 (1): 116–119. [Novikova I.A., Shatova Yu.S., Zlatnik E.Yu. et al. Proliferative and immunologic characteristics of different breast cancer biomolecular subtypes *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. (RAE).* 2014; 11 (1): 116–119. (In Russ.)]

4. Шапилов Ф.А. Субпопуляции интратуморальных лимфоцитов при раке молочной железы.

РМЖ. Приложение. Онкология. 2012; (2): 60–65. [Shamilov F.A. Intratumoral lymphocytes subpopulations in breast cancer. *RMZh. Prilozhenie. Onkologiya.* 2012; (2): 60–65. (In Russ.)]

5. Неродо Г.А., Златник Е.Ю., Неродо Е.А., Загора Г.И. *Способ прогнозирования рецидива рака вульвы.* Патент на изобретение РФ №2532342. Бюлл. №31 от 10.11.2014. [Nerodo G.A., Zlatnik E.Yu., Nerodo E.A., Zakora G.I. *A method for prognosing vulval cancer recurrence.* Patent for invention RF№2532342. Bulletin №31 issued at 10.11.2014. (In Russ.)]

6. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Новик А.В. и др. Дендритные клетки, активированные раково-тестикулярными антигенами (РТА+), в лечении метастатических сарком мягких тканей. *Вопр. онкол.* 2014; (6): 700–706. [Baldueva I.A., Danilova A.B., Novik A.V. et al. Dendritic cells activated by cancer-testis antigens (РТА+) in the treatment of metastatic soft tissue sarcomas. *Voprosy onkologii.* 2014; (6): 700–706. (In Russ.)]

7. Finkelstein S.E., Fishman M. Clinical opportunities in combining immunotherapy with radiation therapy. *Frontiers in Oncology.* 2012; 2: 169. DOI: 10.3389/fonc.2012.00169.

8. Tseng W.W., Malu S., Zhang M. et al. Analysis of the intratumoral adaptive immune response in well differentiated and dedifferentiated retroperitoneal liposarcoma. *Sarcoma.* 2015; 547460. DOI: 10.1155/2015/547460.

9. Uehara T., Fujiwara T., Takeda K. et al. Immunotherapy for bone and soft tissue sarcomas. *Bio. Med. Research Intern.* 2015; 11. DOI: 10.1155/2015/820813.

10. Fisher C. The comparative roles of electron microscopy and immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumors. *Histopathology.* 2006; 48: 32–41. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2005.02287.x.

11. Goldberg B.R. Soft tissue sarcoma: An overview. *Orthop. Nurs.* 2007; 26 (1): 4–11. PMID: 17273099.

12. Златник Е.Ю., Непомнящая Е.М., Новикова И.А. и др. Характеристика факторов локального иммунитета у больных саркомы мягких тканей. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2016; 3. [Zlatnik E.Yu., Nepomnyashchaya E.M., Novikova I.A. et al. Characteristics of factors of local immunity in patients with soft tissue sarcomas. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; 3. (In Russ.)]

13. Кит О.И., Златник Е.Ю., Новикова И.А. и др. *Способ прогнозирования рецидивирования сарком мягких тканей.* Патент №2625035. Бюлл. №20 от 11.07.2017. [Kit O.I., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A. et al. *A method for prognosing soft tissue sarcoma recurrence.* Patent №2625035. Bulletin №20 issued at 11.07.2017. (In Russ.)]

14. McMurphy A.N., Bushell A., Levings M.K., Wood K.J. Moving to tolerance: clinical application of regulatory T cells. *Seminars In Immunology.* 2011; 23: 304–313. DOI: 10.1016/j.smim.2011.04.001.

15. Хаитов Р.М. *Физиология иммунной системы.* М.: ВИНТИРАН. 2001; 223 с. [Khaitov R.M. *Fiziologiya immunnnoy sistemy. (Physiology of the immune system.)* Moscow: VINITIRAN. 2001; 223 p. (In Russ.)]

16. Самотыя Е.Е. Двойные негативные (ДН) и двойные позитивные (ДП) Т-лимфоциты при раке и неопухолевых заболеваниях. *Онкол. ж.* 2011; 5 (3): 145. [Samotyaya E.E. Double negative and double positive T cells in cancer and non-cancer diseases. *Onkologicheskyy zhurnal.* 2011; 5 (3): 145. (In Russ.)]