

Экспрессия PD-L1 и PU.1 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов

А.Т. Абдулжалиев¹, И.В. Булычева¹, О.В. Ковалева¹, Е.А. Сушенцов¹,
А.И. Сендерович², А.К. Валиев¹, Н.Е. Кушлинский¹

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов (ЗООПН) представляют собой редкую гетерогенную группу агрессивных новообразований мезенхимального происхождения, для которой до сих пор не определена взаимосвязь между уровнем экспрессии PD-L1 и прогнозом заболевания. Кроме того, в отношении солидных опухолей данного типа остается неизученной роль клеток опухолевого микроокружения, в частности макрофагов, ассоциированных с опухолью. Цель исследования – оценить степень влияния экспрессии PD-L1 и ядерного маркера макрофагов PU.1 на общую выживаемость (ОВ) и безрецидивную выживаемость (БРВ) у пациентов с ЗООПН.

Материалы и методы. В исследование были включены 46 пациентов с ЗООПН, которым в период с 1998 по 2021 год выполняли хирургическое или комбинированное лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Проведен анализ клинических и морфологических показателей, изучены результаты хирургического лечения. Анализ экспрессии PD-L1, PU.1 и Ki-67% проводили иммуногистохимическим методом.

Результаты. Положительное окрашивание на PD-L1 наблюдалось в 28% исследованных случаев. Экспрессию PU.1 выявили во всех образцах. Обнаружена статистически достоверная корреляция между уровнем экспрессии PU.1 и PD-L1. При медиане наблюдения 37 месяцев положительный PD-L1 статус ассоциирован с более низкой медианой общей и безрецидивной выживаемости в группе пациентов с низкодифференцированными ЗООПН (Grade 3) ($p=0,0003$ и $p=0,004$, соответственно). Медиана общей выживаемости для опухолей с высоким и низким содержанием PU.1+ клеток составила 21 месяц и 78 месяцев, соответственно ($p<0,0001$).

Заключение. В данном исследовании впервые описана прогностическая значимость макрофагального маркера PU.1 у пациентов со ЗООПН. Высокий уровень содержания PU.1+ клеток вне зависимости от степени злокачественности, а также экспрессия PD-L1 >1% у пациентов с опухолями Grade 3 достоверно негативно влияли на ОВ и БРВ. Полученные результаты позволяют использовать анализ экспрессии данных маркеров как прогностических, а также, вероятно, для разработки новых терапевтических возможностей.

Ключевые слова: злокачественная опухоль из оболочек периферических нервов, PD-L1, иммуногистохимическое исследование, PU.1, хирургическое лечение

Для корреспонденции: Адиль Тахирович Абдулжалиев. E-mail: AdilNGY@yandex.ru

Для цитирования: Абдулжалиев А.Т., Булычева И.В., Ковалева О.В., Сушенцов Е.А., Сендерович А.И., Валиев А.К., Кушлинский Н.Е. Экспрессия PD-L1 и PU.1 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):44–53. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.44-53.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 14.03.2023. Получена после рецензирования 30.03.2023. Принята в печать 10.04.2023.

PD-L1 and PU.1 expression in malignant peripheral nerve sheath tumors

А.Т. Абдулжалиев¹, И.В. Булычева¹, О.В. Ковалева¹, Е.А. Сушенцов¹,
А.И. Сендерович², А.К. Валиев¹, Н.Е. Кушлинский¹

¹ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

² Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) belong to a rare heterogeneous group of aggressive neoplasms of mesenchymal origin. The relationship between the PD-L1 expression and

development and prognosis of MPNSTs has not yet been determined. In addition, it is yet to explore the role of tumor microenvironment, in particular tumor-associated macrophages, in solid tumors. The aim of the study was to determine the relationship between (1) PD-L1 expression and the nuclear marker of PU.1 expression in stromal cells and (2) overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) in patients with MPNSTs. *Materials and methods.* The retrospective study included 46 adult patients with MPNSTs who underwent surgical or combined treatment from 1998 to 2021 at the N.N. Blokhin Oncology Research Center. We analyzed clinical and morphological parameters as well as the outcomes of surgical treatment. Immunohistochemistry was used to detect the expression of PD-L1, PU.1, and Ki-67.

Results. We found positive PD-L1 staining in 28% of cases. PU.1 expression was observed in all samples. We showed a statistically significant correlation between PU.1 and PD-L1 expression levels. At a median follow-up of 37 months, PD-L1 positive status was associated with a lower median OS and RFS in the group of patients with grade III tumors ($p=0.0003$ and $p=0.004$, respectively). The median OS for tumors with high and low number of PU.1+ cells was 21 and 78 months, respectively ($p<0.0001$).

Conclusion. To the best of our knowledge, this is the first study to describe the prognostic value of the macrophage marker PU.1 in patients with MPNST. High levels of PU.1+ cells, regardless of the tumor grade, and PD-L1 expression $>1\%$ of tumor cells in the patients with poorly-differentiated MPNSTs, produced a negative effect on OS and RFS. The analyzed expression of these markers can be used in prognostic tests and developing novel therapeutic treatment options.

Keywords: malignant peripheral nerve sheath tumor, PD-L1 immunohistochemistry, PU.1, surgical treatment

Corresponding author: Adil T. Abdulzhaliev. E-mail: AdilNGY@yandex.ru

For citation: Abdulzhaliev A.T., Boulytcheva I.V., Kovaleva O.V., Sushentsov E.A., Senderovich A.I., Valiev A.K., Kushlinskii N.E. PD-L1 and PU.1 expression in malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):44–53 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.44-53.

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Received 14.03.2023. **Received in revised form** 30.03.2023. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов (ЗООПН) представляют собой гетерогенную высокоагрессивную группу опухолей мягких тканей, встречающихся в основном у взрослых [1]. Около 50% из них возникает у пациентов, страдающих нейрофиброматозом 1-го типа (НФ 1-го типа, или болезнь Реклингхаузена), а 5–10% развивается вторично, после проведенной лучевой терапии [2]. В клинической практике диагноз «злокачественная опухоль из оболочек периферических нервов» устанавливается на основании классических диагностических признаков, включая экспрессию S-100, SOX-10, H3k27me3 в ассоциации с НФ 1-го типа.

Стандартом лечения ЗООПН остается радикальная хирургическая резекция, в то время как эффективность лучевой и химиотерапии ограничена ввиду вероятности локального рецидива и отдаленных метастазов у половины пациентов [3]. Данные обстоятельства способствуют развитию новых терапевтических стратегий, в частности использованию иммунотерапии для опухолей данного типа [4]. Так, рецептор PD-1 (рецептор запрограммированной клеточной смерти, CD279) и его лиганд PD-L1 являются элементами системы так называемых иммунных контрольных точек, главные задачи которой – регуляция и модулирование иммунного ответа [5]. Для ускользания опухоли от иммунологического надзора опухолевые клетки могут использовать экспрессию PD-L1, который при связывании со своим рецептором блокирует активацию цитотоксических

Т-лимфоцитов [6]. Применение ингибиторов PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб) и PD-L1 (аделиумаб, атезолизумаб) препятствует инактивированию цитотоксических Т-клеток, тем самым преодолевая иммунную супрессию [6].

Несмотря на то, что препараты, направленные на систему PD-1/PD-L1, были одобрены и эффективно применяются при лечении многих злокачественных новообразований, таких как меланома или немелкоклеточный рак легкого, возможность их использования при саркомах мягких тканей остается до конца не определенной вследствие ограниченности имеющихся сведений, ассоциированной с малым числом наблюдений [7]. Кроме того, необходимо выявление дополнительных маркеров, помогающих отбирать пациентов, у которых с наибольшей вероятностью применение иммунотерапии будет наиболее эффективным. Ряд авторов сообщает, что положительная экспрессия PD-L1 коррелирует с худшим прогнозом у пациентов с саркомами мягких тканей, включая ЗООПН [8]. Однако в исследовании L. Davis et al. у пациентов с новообразованиями, развившимися на фоне НФ 1-го и 2-го типа, не было обнаружено связи между экспрессией PD-L1, инфильтрацией CD8+ лимфоцитами и выживаемостью больных [9]. В настоящее время из литературы известно о четырех пациентах с ЗООПН с различными уровнями экспрессии PD-L1, у которых наблюдали полный метаболический ответ на анти-PD-1 терапию [9–11]. Помимо злокачественных опухолей в некоторых исследованиях приводятся данные об увеличении экспрессии PD-L1

в случае плексиформных нейрофибром у пациентов с НФ 1-го типа, считающихся облигатными предшественниками ЗООПН [12].

Для пациентов с саркомами мягких тканей также неизвестна роль компонентов опухолевой стромы, в частности макрофагов, на течение и прогноз заболевания [13]. Полагают, что изучение макрофагов, ассоциированных с опухолью (МАО), следует считать перспективным направлением для определения проопухолевых факторов и биомаркеров, влияющих на клиничко-морфологические характеристики разных онкологических заболеваний. Известно, что МАО способны влиять на различные характеристики воспаления, включая как про-, так и противоопухолевый эффект, пролиферацию опухолевых клеток, формирование и разрушение стромы, ангиогенез [14]. Транскрипционный фактор PU.1, кодируемый геном *Sp1*, играет ключевую роль в клеточной регуляции иммунной системы путем активирования экспрессии генов в развитии клеток миелоидной, эритроидной и В-лимфоидной линий. Экспрессия данного белка является независимым фактором прогноза при таких солидных опухолях, как рак молочной железы и глиома [15, 16]. Также показано, что данный белок можно использовать в качестве иммуногистохимического маркера для выявления макрофагов в опухолях [17, 18]. В исследовании сарком разных типов (14 гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), пять синовиальных сарком, четыре лейомиосаркомы и три других новообразования) показано, что макрофаги обнаружены в 90% (45/50) исследованных опухолей [19]. В другом исследовании The Cancer Genome Atlas (TCGA) на 206 образцах сарком мягких тканей у взрослых высокое содержание макрофагов наблюдали в случае дедифференцированных липосарком, миксофибросарком, недифференцированных плеоморфных сарком (НПС) и редко в случае синовиальных сарком [13].

В данном исследовании проведена комплексная оценка экспрессии PD-L1, ядерного транскрипционного фактора PU.1 и маркера клеточной пролиферации Ki-67 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ исходов заболевания пациентов с ЗООПН, которым проводили хирургическое или комбинированное лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 1998 по 2021 год. Гистогенез опухолей подтвержден данными морфологического исследования согласно Международной классификации опухолей мягких тканей (ВОЗ, 2020). Полезными критериями в диагностике ЗООПН явились наличие в анамнезе НФ 1-го типа; локализация новообразований в проекции периферических нервов и спинальных корешков; присутствие ультраструктурных признаков шванновских клеток при положительном окрашивании опухоли с маркерами

S100, SOX10, H3k27me3 при иммуногистохимическом исследовании.

В настоящее исследование были включены 46 пациентов с ЗООПН: 28 женщин (61%) и 18 мужчин (39%). Средний возраст пациентов составил 50,2 года (диапазон от 18 до 83 лет). В зависимости от локализации новообразования распределялись следующим образом: в верхних конечностях – 22% наблюдений, в нижних конечностях – 17%, паравертебрально – 37% и забрюшинно – 24%. Общая характеристика исследованной выборки представлена в таблице 1.

Анализ экспрессии PD-L1 и Ki67 проводили на приборе BenchMark GX Ventana (Ventana Medical Systems, США). Для оценки PD-L1 использовали антитела Anti-PD-L1 (клон РВМ-1А4, «ПраймБиоМед», Россия) в разведении 1:50. Инкубацию проводили в течение 32 минут. Условием положительной экспрессии PD-L1 считалось полное или частичное окрашивание не менее 1% опухолевых и/или иммунных клеток. На основании PD-L1-статуса пациенты были разделены

Таблица 1 | Table 1

Характеристика пациентов с ЗООПН | Clinical and pathological features of patients with MPNSTs

Характеристика Indicator	Число пациентов, абс. (отн.) Number of patients, abs. (rel.)
Возраст, лет Age, years • <50 • ≥50	23 (50%) 23 (50%)
Пол Sex • мужской male • женский female	18 (39%) 28 (61%)
Размер опухоли, см Tumor size, cm • ≤5 ≤5 • >5 >5	7 (15%) 39 (85%)
Степень дифференцировки опухоли Histologic grade • Grade 1 • Grade 2 • Grade 3	12 (26%) 14 (30%) 20 (44%)
Количество PD-L1+ клеток Number of PD-L1+ cells • <1% • ≥1%	33 (72%) 13 (28%)
Подтип опухоли Tumor subtype • спорадические sporadic • НФ-1-ассоциированные NF-1-associated	36 (78%) 10 (22%)
Индекс Ki-67 Ki-67 index • ≤20% • >20%	24 (52%) 22 (48%)
Характер опухоли Tumor type • первичная primary • рецидив relapse	27 (59%) 19 (41%)

на две группы: с низким уровнем экспрессии, что соответствует негативному PD-L1 статусу (PD-L1 <1% клеток), и с высоким уровнем экспрессии, характерным для положительного PD-L1 статуса (PD-L1 \geq 1% клеток). Пороговое значение в 1% выбрано, исходя из данных литературы для ЗООПН и сарком мягких тканей [6, 20].

Для определения уровня экспрессии Ki-67 использовали антитела anti-Ki-67 (клон 30-9, Ventana Medical Systems, США), инкубацию проводили в течение 16 минут. Экспрессию PD-L1 исследовали в опухолевых и/или иммунных клетках [20]. В качестве контроля для иммуногистохимических реакций использованы ткани миндалины и плаценты.

Экспрессию маркера PU.1 оценивали иммуногистохимическим методом на опухолевых образцах с использованием TrisEDTA, буфер pH 9,0 («ПраймБиоМед», Россия). Инкубацию с антителами к PU.1 (PBM-4G6; «ПраймБиоМед», Россия) в разведении 1:200 проводили в течение 30 минут. Система детекции PrimeVision MS/RB HRP/DAB («ПраймБиоМед», Россия) применялась соответственно инструкции производителя.

Окрашенные готовые препараты анализировали при помощи микроскопа BX53 (Olympus, Япония), камеры INFINITY2-2C (Lumenera, Канада) и программы Infinity analyze (Lumenera, Канада). В каждом образце оценку количества PU.1 положительных клеток проводили в 5 независимых полях зрения при $\times 400$ прямым подсчетом. Среднее значение количества окрашенных клеток в одном поле зрения указывало на содержание PU.1 в строме опухоли.

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics (выпуск 26.0) (IBM, США). При анализе отдаленных результатов безрецидивной выживаемости считали период от хирургического вмешательства до появления признаков рецидива опухоли, последнего наблюдения или смерти по причине, не связанной с основным заболеванием; общей выживаемостью считали период от хирургического вмешательства до смерти по любой причине. В независимых группах с целью анализа статистически значимых различий применяли критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Анализ выживаемости выполняли по методу Каплана–Мейера с

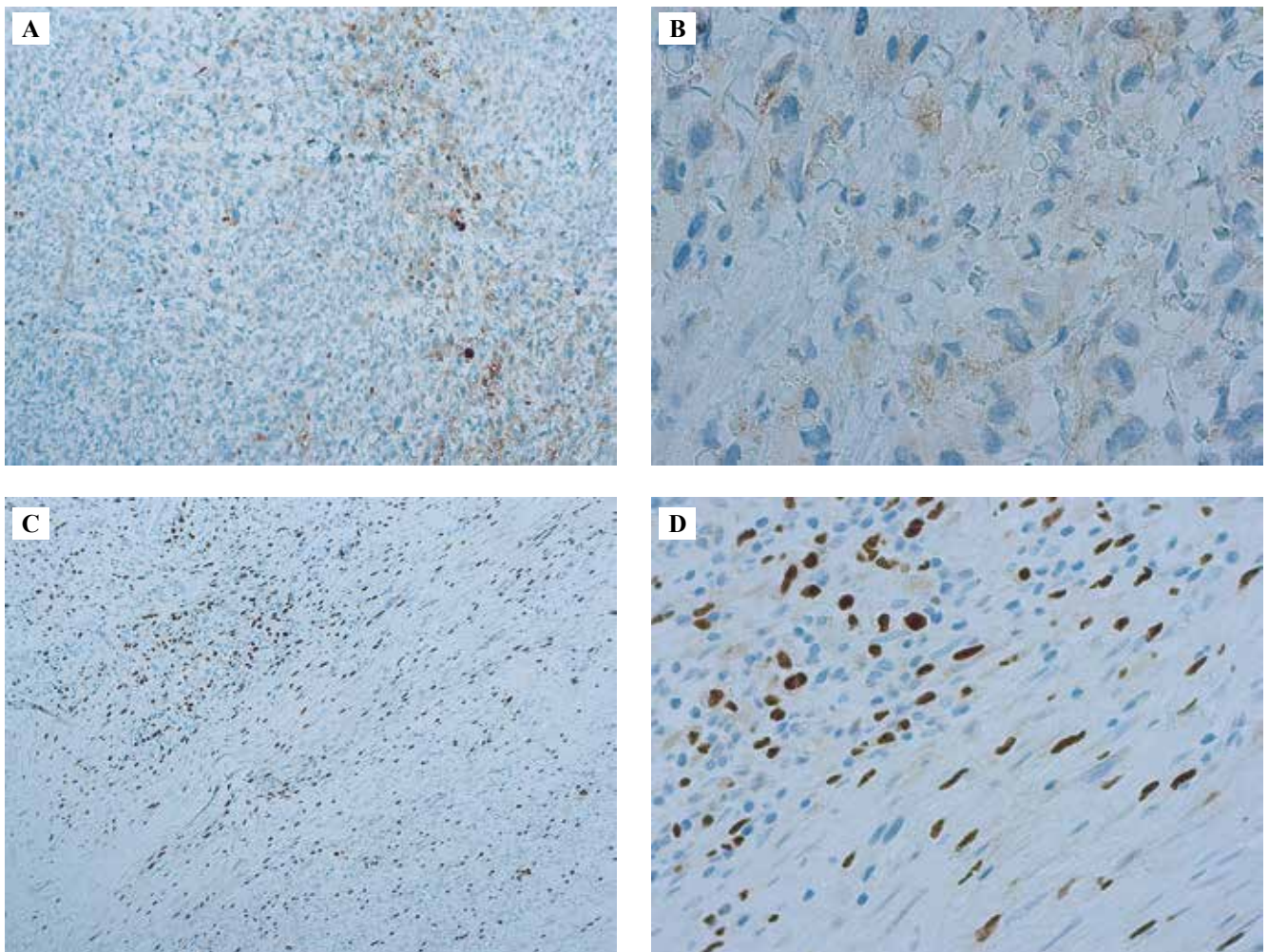


Рис. 1. Экспрессия PD-L1 и PU.1 в образцах ЗООПН. Иммуногистохимическое окрашивание. А, С – $\times 200$, В, D – $\times 400$
 Fig. 1. PD-L1 and PU.1 expression in MPNSTs. IHC assay, A, C – $\times 200$, B, D – $\times 400$

использованием log-rank-теста. Для оценки потенциального влияния различных факторов риска на выживаемость дополнительно выполняли многофакторный анализ с использованием непараметрической модели пропорциональных рисков Кокса. Статистически значимым считали результат при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ экспрессии PU.1 в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания

Положительная экспрессия PU.1 выявлена во всех 46 опухолевых образцах ЗООПН (100% случаев). Среднее содержание PU.1+ клеток в 1 поле зрения составило 22 клетки (диапазон 3-61). Образцы ИГХ препаратов PU.1 и PD-L1 отображены на рисунке 1.

Проведен анализ ассоциации содержания PU.1+ клеток в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, содержание PU.1+ клеток не ассоциировано с клиническими характеристиками, за исключением уровня

экспрессии PD-L1 ($p=0,004$) и Ki-67% ($p=0,027$). Медиана индекса пролиферации (Ki-67%) составила 18%, диапазон значений варьировал от 3% до 70%.

Анализ экспрессии PD-L1 в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания

На следующем этапе исследования провели анализ клинической значимости экспрессии PD-L1 у пациентов с ЗООПН. В результате исследования высокий уровень экспрессии PD-L1 $\geq 1\%$ наблюдали в 13 случаях (28%), в то время как отрицательная реакция, соответствующая негативному статусу PD-L1 (PD-L1 $< 1\%$), встречалась в 33 случаях (72%). Общие характеристики изучаемой группы пациентов в зависимости от статуса PD-L1 представлены в таблице 3.

Как видно из представленных данных, в целом экспрессия PD-L1 практически не ассоциирована с клиническими характеристиками, за исключением степени дифференцировки опухоли. Высокую экспрессию PD-L1 чаще наблюдали в низкодифференцированных опухолях (Grade 3) по сравнению с высокодифференцированными (Grade 1).

Таблица 2 | Table 2

Ассоциация содержания PU.1+ клеток с клинико-морфологическими характеристиками пациентов | Association between PU.1+ cells and clinical and morphological characteristics of the patients

Характеристика Indicator	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)	PU.1 медиана (мин.–макс.) PU.1 median (min.–max.)	p-value
Возраст, лет Age, years			
• <50	23 (50%)	19 (4–61)	0,709
• ≥ 50	23 (50%)	16,5 (3–44)	
Пол Sex			
• мужской male	18 (39%)	17,5 (3–46)	0,973
• женский female	28 (61%)	16,5 (3–55)	
Размер опухоли, см Tumor size, cm			
• ≤ 5 ≤ 5	7 (15%)	16,5 (5–41)	0,472
• > 5 > 5	39 (85%)	25 (3–61)	
Степень дифференцировки Histologic Grade			
• Grade 1/Grade 2	12 (26%)/14 (30%)	16,5 (4–49)	0,597
• Grade 3	20 (44%)	20 (3–61)	
Количество PD-L1+ клеток Number of PD-L1+ cells			
• $< 1\%$	33 (72%)	16 (3–42)	0,004*
• $\geq 1\%$	13 (28%)	26,2 (5–61)	
Подтип опухоли Tumor subtype			
• спорадические sporadic	36 (78%)	18,9 (3–55)	0,743
• NF-1-ассоциированные NF-1-associated	10 (22%)	19,5 (3–40)	
Индекс Ki-67, % Ki-67 index, %			
• $\leq 20\%$	24 (52%)	13,8 (4–35)	0,0002*
• $> 20\%$	22 (48%)	24,4 (3–61)	
Характер опухоли Tumor type			
• первичная primary	27 (59%)	18,9 (4–40)	0,902
• рецидив relapse	19 (41%)	18,8 (3–55)	

* Статистически значимо | Statistically significant

Таблица 3 | Table 3

Ассоциация экспрессии PD-L1 с клинико-морфологическими характеристиками пациентов |
Association between PD-L1 expression and clinical and morphological characteristics of the patients

Характеристика Indicator	PD-L1 <1% n=33	PD-L1 ≥1% n=13	p-value
Возраст, лет Age, years			
• <50	15 (33%)	8 (17%)	0,514
• ≥50	18 (39%)	5 (11%)	
Пол Sex			
• мужской male	12 (26%)	6 (13%)	0,738
• женский female	21 (46%)	7 (15%)	
Размер опухоли, см Tumor size, cm			
• ≤5	6 (13%)	1 (2%)	0,654
• >5	27 (59%)	12 (26%)	
Степень дифференцировки Histologic Grade			
• Grade 1	12 (26%)	0	0,036
• Grade 2	8 (18%)	6 (13%)	
• Grade 3	13 (28%)	7 (15%)	
Характер опухоли Tumor type			
• первичная primary	21 (46%)	6 (13%)	0,278
• рецидив relapse	12 (26%)	7 (15%)	
Подтип опухоли Tumor subtype			
• спорадические sporadic	28 (61%)	8 (17%)	0,084
• NF-1-ассоциированные NF-1-associated	5 (11%)	5 (11%)	
Индекс Ki-67, % Ki-67 index, %			
• ≤20%	18 (39%)	6 (13%)	0,607
• >20%	15 (33%)	7 (15%)	

Анализ прогностической значимости экспрессии PU.1 и PD-L1 в ЗООПН

Для определения прогностической значимости PU.1+ клеток при ЗООПН пациенты были разделены на две группы – с низким (<40) и высоким (>40) содержанием клеток в поле зрения. Показано, что при высоком содержании PU.1+ клеток наблюдаются статистически значимое снижение как общей выживаемости (ОВ) пациентов, так и безрецидивной выживаемости (БРВ). Медиана ОВ для опухолей с высоким содержанием PU.1+ клеток составила 21 месяц, в то время как в группе с низким содержанием PU.1+ клеток – 78 месяцев ($p<0,0001$). БРВ пациентов с ЗООПН с высоким содержанием PU.1+ клеток составила 6,5 месяца и 78 месяцев для опухолей с низким содержанием PU.1+ клеток ($p<0,0001$) (рис. 2).

Как видно из представленных графиков, количество PU.1+ клеток, инфильтрирующих опухоль, является значимым прогностическим фактором при ЗООПН. Так, впервые показано, что высокое содержание макрофагов в строме опухолей – статистически значимо неблагоприятный прогностический фактор при анализе как ОВ, так и БРВ.

Далее проведен анализ прогностической значимости экспрессии PD-L1 в ЗООПН. При медиане на-

блюдения 37 месяцев ОВ пациентов с положительным PD-L1 статусом составила 24 месяца против 78 месяцев в группе пациентов с уровнем экспрессии PD-L1 <1% ($p=0,0002$) (рис. 3). БРВ у пациентов с положительным и негативным PD-L1 статусом составила 9 и 78 месяцев, соответственно ($p=0,004$).

Выполнен многофакторный статистический анализ прогностической значимости исследованных белков, результаты которого представлены в таблице 4.

Проведенный регрессионный анализ Кокса показал, что высокое содержание PU.1+ клеток и высокий уровень экспрессии PD-L1 при ЗООПН являются независимыми факторами прогноза, ассоциированными со снижением выживаемости. Таким образом, в данном исследовании представлены два прогностических маркера ЗООПН.

С учетом того, что степень дифференцировки опухоли – независимый прогностический фактор, нами дополнительно проведен анализ выживаемости пациентов в зависимости от статуса экспрессии PD-L1 и PU.1 по отдельности в группах опухолей разной степени злокачественности. В данной работе высокодифференцированные (Grade 1) PD-L1 положительные ЗООПН не выявлены. В случае умеренно дифференцированных опухолей не было получено статистически

значимой разницы в показателях ОБ и БРВ в зависимости от экспрессии PD-L1. У пациентов с низкодифференцированной ЗООПН (Grade 3) медиана общей выживаемости в группе опухолей с высоким уровнем экспрессии PD-L1 составила 14 месяцев, в то время как с низким – 60 месяцев ($p=0,0003$), и это свидетельствует о том, что экспрессия PD-L1 является неблагоприятным прогностическим фактором низкодифференцированных (Grade 3) ЗООПН.

При анализе прогностической значимости макрофагальной инфильтрации в зависимости от опухоле-

вой дифференцировки показано, что для всех опухолей оболочек периферических нервов вне зависимости от степени злокачественности наличие PU.1+ клеток – неблагоприятный прогностический фактор течения заболевания.

На последнем этапе исследования проведен корреляционный анализ между количеством PU.1+ клеток и статусом экспрессии PD-L1. Проведенный анализ показал, что экспрессия PD-L1 прямо коррелирует с содержанием макрофагов в строме исследуемых опухолей ($r=0,417$; $p=0,004$), и это свидетельствует о том, что именно макро-

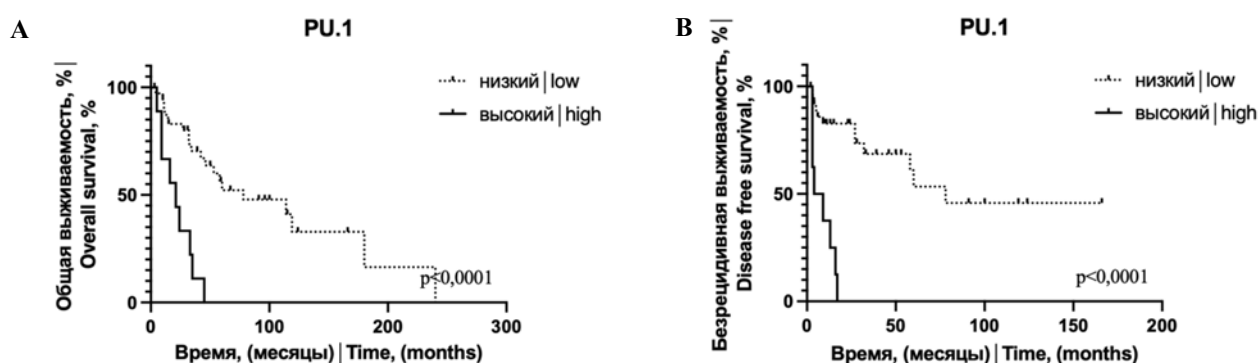


Рис. 2. Анализ общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от содержания PU.1+ клеток при ЗООПН по методу Каплана–Мейера (низкий уровень – менее 40 клеток, высокий уровень – более 40 клеток)

Fig. 2. Analysis of overall and recurrence-free survival depending on the presence of PU.1+ cells in MPNSTs, Kaplan–Meier curves (low – fewer than 40 cells, high – more than 40 cells)

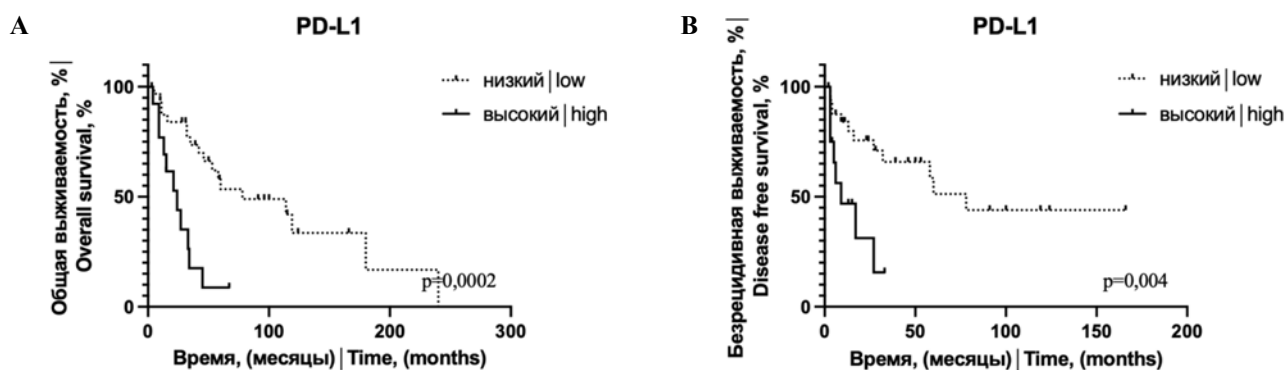


Рис. 3. Анализ общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от экспрессии PD-L1 при ЗООПН по методу Каплана–Мейера (низкий уровень – отрицательный PDL-статус (PD-L1 <1% клеток), высокий уровень – положительный PDL-статус (PD-L1 ≥1% клеток))

Fig. 3. Analysis of overall and recurrence-free survival depending on the presence of PD-L1+ cells in MPNSTs, Kaplan–Meier curves [(low – negative PDL-status (PD-L1 <1% cells), high – positive PDL-status (PD-L1 ≥1% cells)]

Таблица 4 | Table 4

Статистический анализ прогностической значимости PU.1 |
Statistical analysis of prognostic significance of PU.1

Параметр Indicator	Однофакторный анализ Univariate analysis			Многофакторный анализ Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
PD-L1 (высокий/низкий) PD-L1 (high/low)	3,573	1,275–10,02	p=0,0002	3,997	1,608–9,944	0,0026
PU.1 стромы (высокий/низкий) PU.1 stroma (high/low)	4,392	1,254–15,38	p<0,0001	5,453	2,036–14,46	0,0006

фаги опухолевого микроокружения являются основным типом клеток, экспрессирующих PD-L1.

Обсуждение

Известно, что ЗООПН характеризуются агрессивным клиническим течением и сложным генетическим профилем. Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов, в том числе ассоциированные с НФ 1-го типа, для которых в настоящее время отсутствуют эффективные стандарты лечения, имеют неблагоприятный прогноз, а их хирургическая резекция сопряжена с высоким риском рецидива [21]. Невзирая на большой массив имеющихся данных о влиянии опухолевого микроокружения на прогноз и течение заболевания, в настоящий момент роль макрофагальной инфильтрации ЗООПН остается неизвестной. Несмотря на успехи иммунотерапии многих солидных опухолей с использованием препаратов, влияющих на контрольные точки иммунитета, для лекарственного лечения сарком мягких тканей значительных изменений не произошло, и использование данных агентов не показало обнадеживающих результатов [22, 23].

В представленной работе впервые в нашей стране проведен анализ клинической и прогностической значимости PD-L1 и транскрипционного фактора PU.1 у пациентов с ЗООПН. Для выявления макрофагов в опухолях нами использован ядерный транскрипционный фактор PU.1, который благодаря своей ядерной локализации в отличие от других маркеров макрофагов упрощает визуализацию этого типа клеток и их количественную оценку [17, 18].

В настоящей работе высокое количество PU.1+ клеток явилось значимым фактором неблагоприятного прогноза вне зависимости от дифференцировки опухоли, а также достоверно коррелировало с положительной экспрессией PD-L1, что подтверждает макрофагальную экспрессию данного белка. В целом, высокое содержание макрофагов в опухоли является маркером неблагоприятного прогноза при различных типах опухолей, в том числе и в случае сарком мягких тканей [24, 25].

Для ЗООПН прогностическая значимость макрофагов еще не определена ввиду недостаточного числа исследований. Нами впервые показано, что использование PU.1 в качестве панмакрофагального маркера позволяет эффективно выявлять макрофаги в опухолях подобного типа и их высокое содержание однозначно ассоциировано с неблагоприятным прогнозом.

На следующем этапе работы дополнительно проанализировали значимость экспрессии PD-L1 в ЗООПН. Согласно данным исследований, представленным в литературе, экспрессия PD-L1 зависит от гистологического типа опухоли [26]. Также в литературе представлены результаты по экспрессии PD-L1 в ЗООПН [23]. В самом крупном опубликованном исследовании, посвященном поиску новых терапевтических мишеней и прогностических маркеров, включавшем более 2500 пациентов с различными типами сарком (22 гисто-

логических подтипа), экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках встречалась в 50% случаев сарком мягких тканей, однако ее прогностическая значимость не выявлена [27]. Напротив, в работе J. Kim et al., охватывающей 105 случаев сарком мягких тканей, из которых шесть случаев ЗООПН, положительная экспрессия PD-L1, обнаруженная в 58% всех исследованных сарком и в трех (50%) случаях ЗООПН, была ассоциирована с поздней стадией заболевания, более низкой дифференцировкой опухоли, а также более коротким периодом БРВ и ОВ [28], что частично согласуется с полученными нами результатами. Одни исследователи показывают полное отсутствие экспрессии PD-L1 [29] в образцах ЗООПН, в то время как другие демонстрируют показатели частоты экспрессии маркера в 13–17% исследованных образцов [6, 9], что сопоставимо с нашими результатами. В работе E. Shurell et al. окрашивание не менее 1% наблюдалось в 3% доброкачественных опухолей и в 17% ЗООПН, однако ассоциации между экспрессией PD-L1 с выживаемостью пациентов не выявлено. Помимо этого авторы показали, что экспрессия PD-L1 чаще выявляется в образцах ЗООПН по сравнению с доброкачественными опухолями, в то время как в исследовании K. Haworth et al. существенной разницы не обнаружено. Таким образом, прогностическая значимость экспрессии PD-L1 для ЗООПН в настоящее время остается спорной. В проведенном нами исследовании положительный PD-L1 статус в клетках ЗООПН и опухолевого микроокружения был ассоциирован с неблагоприятным прогнозом, причем в группе опухолей высокой степени злокачественности. Кроме того, необходимо отметить отсутствие экспрессии PD-L1 в образцах опухолей низкой степени злокачественности.

Заключение

В представленном исследовании впервые описана прогностическая значимость макрофагального маркера PU.1 у пациентов со злокачественными опухолями из оболочек периферических нервов. Ядерная локализация данного белка делает его удобным для одновременного окрашивания совместно с другими маркерами, экспрессирующимися в цитоплазме или на мембране, например PD-L1. Одновременный анализ экспрессии PD-L1 в иммунных клетках микроокружения может стать новым перспективным прогностическим маркером для опухолей данного типа, что подтверждает наша работа. Экспрессия PD-L1 >1% у пациентов с низкодифференцированными (Grade 3) вариантами злокачественных опухолей из оболочек периферических нервов, а также высокий уровень экспрессии PU.1 вне зависимости от степени злокачественности в нашем исследовании статистически значимо негативно влияли на прогноз у пациентов с такими новообразованиями. Полученные результаты позволяют использовать анализ экспрессии представленных маркеров как прогностических факторов, а также, вероятно, для разработки новых терапевтических возможностей.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – И.В. Булычева, О.В. Ковалева, Н.Е. Кушлинский.
Сбор и обработка материала – А.Т. Абдулжалиев, Е.А. Сушенцов, А.И. Сендерович.
Написание текста – А.Т. Абдулжалиев.
Редактирование – А.Т. Абдулжалиев, А.К. Валиев.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – I.V. Boulytcheva, O.V. Kovaleva, N.E. Kushlinskii.
Collected the data and performed the analysis – A.T. Abdulzhaliyev, E.A. Sushentsov, A.I. Senderovich.
Wrote the paper – A.T. Abdulzhaliyev.
Edited the manuscript – A.T. Abdulzhaliyev, A.K. Valiev.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Prieto-Granada CN, Wiesner T, Messina JL, Jungbluth AA, Chi P, Antonescu CR. Loss of H3K27me3 expression is a highly sensitive marker for sporadic and radiation-induced MPNST. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(4):479–89. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000564.
- Marjanska A, Galazka P, Wysocki M, Styczynski J. New frontiers in therapy of peripheral nerve sheath tumors in patients with neurofibromatosis type 1: Latest evidence and clinical implications. *Anticancer Res.* 2020;40(4):1817–31. DOI: 10.21873/anticancer.14136.
- James AW, Shurell E, Singh A, Dry SM, Eilber FC. Malignant peripheral nerve sheath tumor. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(4):789–802. DOI: 10.1016/j.soc.2016.05.009.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015;348(6230):56–61. DOI: 10.1126/science.aaa8172.
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1974–82. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4358.
- Shurell E, Singh AS, Crompton JG, Jensen S, Li Y, Dry S et al. Characterizing the immune microenvironment of malignant peripheral nerve sheath tumor by PD-L1 expression and presence of CD8+ tumor infiltrating lymphocytes. *Oncotarget.* 2016;7(39):64300–8. DOI: 10.18632/oncotarget.11734.
- Gong J, Chehrrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: A comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):8. DOI: 10.1186/s40425-018-0316-z.
- Hashimoto K, Nishimura S, Ito T, Akagi M. Characterization of PD-1/PD-11 immune checkpoint expression in soft tissue sarcomas. *Eur J Histochem.* 2021;65(3):3203. DOI: 10.4081/ejh.2021.3203.
- Davis LE, Nicholls LA, Babiker HM, Liau J, Mahadevan D. PD-1 inhibition achieves a complete metabolic response in a patient with malignant peripheral nerve sheath tumor. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(9):1396–400. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0072.
- Payandeh M, Sadeghi M, Sadeghi E. Complete response to pembrolizumab in a patient with malignant peripheral nerve sheath tumor: The first case reported. *J Appl Pharm Sci.* 2017;7(10):182–4. DOI: 10.7324/JAPS.2017.71026.
- Mei J, Wang H, Fan H, Ding J, Xu J. Case Report: Successful immunotherapy improved the prognosis of the unfavorable subset of cancer of unknown primary. *Front Immunol.* 2022;13:900119. DOI: 10.3389/fimmu.2022.900119.
- Haworth KB, Arnold MA, Pierson CR, Choi K, Yeager ND, Ratner N et al. Immune profiling of NF1-associated tumors reveals histologic subtype distinctions and heterogeneity: Implications for immunotherapy. *Oncotarget.* 2017;8(47):82037–48. DOI: 10.18632/oncotarget.18301.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell.* 2017;171(4):950–965.e28. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.014.
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 1992;13(7):265–70. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90008-U.
- Lin J, Liu W, Luan T, Yuan L, Jiang W, Cai H et al. High expression of PU.1 is associated with Her-2 and shorter survival in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(6):8220–6. DOI: 10.3892/ol.2017.7204.
- Xu Y, Gu S, Bi Y, Qi X, Yan Y, Lou M. Transcription factor PU.1 is involved in the progression of glioma. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3753–9. DOI: 10.3892/ol.2018.7766.
- Matsubara E, Komohara Y, Esumi S, Shinchi Y, Ishizuka S, Mito R et al. SPP1 derived from macrophages is associated with a worse clinical course and chemo-resistance in lung adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2022;14(18):4374. DOI: 10.3390/cancers14184374.
- Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А., Рашидова М.А., Самойлова Д.В., Соколов Н.Ю и др. PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(2):32–39. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39.
- Kovaleva OV, Gratchev AN, Podlesnaya PA, Rashidova MA, Samoilova DV, Sokolov NYu et al. PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer. Clinical and experimental morphology. 2021;10(2):32–39 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39.
- Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: A meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2012;7(12):e50946. DOI: 10.1371/journal.pone.0050946.
- Бугаев В.Е., Никулин М.П., Поспехова Н.И., Сафронова В.М., Кокосадзе Н.В., Божченко Я.А. и др. Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами. Успехи молекулярной онкологии. 2019;6(3):37–48. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-37-48.
- Bugaev VE, Nikulin MP, Pospekhova NI, Safronova VM, Kokosadze NV, Bozhchenko YA et al. Prognostic significance of PD-L1 expression and evaluation of microsatellite instability status in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas. *Advances in Molecular Oncology.* 2019;6(3):37–48 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-37-48.
- Varin J, Poulain L, Hivelin M, Nusbaum P, Hubas A, Laurendeau I et al. Dual mTORC1/2 inhibition induces anti-proli-

- ferative effect in NF1-associated plexiform neurofibroma and malignant peripheral nerve sheath tumor cells. *Oncotarget*. 2016;7(24):35753–67. DOI: 10.18632/oncotarget.7099.
22. Toulmonde M, Penel N, Adam J, Chevreau C, Blay JY, Le Cesne A et al. Use of PD-1 targeting, macrophage infiltration, and IDO pathway activation in sarcomas a phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(1):93–7. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.1617.
 23. D'Angelo SP, Mahoney MR, Van Tine BA, Atkins J, Milhem MM, Jahagirdar BN et al. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): Two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol*. 2018;19(3):416–26. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30006-8.
 24. Ковалева О.В., Грачев А.Н., Макарова Э.И., Бежанова С.Д., Стилиди И.С., Матвеев В.Б. и др. Прогностическая значимость sPD-1/sPD-L1 при раке почки в зависимости от фенотипа опухолевых и стромальных клеток. *Онкоурология*. 2022;18(2):17–28. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28. Kovaleva OV, Gratchev AN, Makarova EI, Bezhanova SD, Stilidi IS, Matveev VB et al. Prognostic significance of sPD-1/sPD-L1 in renal cancer depending on the phenotype of tumor and stromal cells. *Cancer Urology*. 2022;18(2):17–28 (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28.
 25. Fujiwara T, Healey J, Ogura K, Yoshida A, Kondo H, Hata T et al. Role of tumor-associated macrophages in sarcomas. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1086. DOI: 10.3390/cancers13051086.
 26. Orth MF, Buecklein VL, Kampmann E, Subklewe M, Noessner E, Cidre-Aranaz F et al. A comparative view on the expression patterns of PD-L1 and PD-1 in soft tissue sarcomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(7):1353–62. DOI: 10.1007/s00262-020-02552-5.
 27. Movva S, Wen W, Chen W, Millis SZ, Gatalica Z, Reddy S et al. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: Identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget*. 2015;6(14):12234–47. DOI: 10.18632/oncotarget.3498.
 28. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM et al. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2013;8(12):e82870. DOI: 10.1371/journal.pone.0082870.
 29. D'Angelo SP, Shoushtari AN, Agaram NP, Kuk D, Qin LX, Carvajal RD et al. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum Pathol*. 2015;46(3):357–65. DOI: 10.1016/j.humphath.2014.11.001.

Информация об авторах

Адиль Тахирович Абдулжалиев – аспирант онкологического отделения хирургических методов лечения № 9 (вертебральной онкологии) отдела общей онкологии Научно-исследовательского института клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Ирина Владиславовна Булычева – доктор медицинских наук, врач-патологоанатом отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Ольга Владимировна Ковалева – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Евгений Александрович Сушенцов – кандидат медицинских наук, заведующий онкологическим отделением хирургических методов лечения № 14 (онкоортопедии) отдела общей онкологии Научно-исследовательского института клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Анастасия Ильинична Сендерович – кандидат медицинских наук, врач – лабораторный генетик лаборатории иммуноморфологии и молекулярной генетики ЦКБ с поликлиникой.

Аслан Камратдинович Валиев – доктор медицинских наук, заведующий отделом общей онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Николай Евгеньевич Кушлинский – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Author information

Adil T. Abdulzhaliyev – Postgraduate Student, Oncological Department of Surgical Treatment Methods No. 9 (Spinal Oncology), General Oncology Division, Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0001-9156-9822>

Irena V. Boulytcheva – Dr. Sci. (Med.), Pathologist, Department of Morphological and Molecular Tumor Diagnosis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0001-7592-4249>

Olga V. Kovaleva – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>

Evgeny A. Sushentsov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Oncological Department of Surgical Treatment Methods No. 14 (Orthopedic Oncology), General Oncology Division, Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0003-3672-1742>

Anastasia I. Senderovich – Cand. Sci. (Med.), Laboratory Geneticist, Laboratory of Immunomorphology and Molecular Genetics, Central Clinical Hospital with a Polyclinic. <https://orcid.org/0000-0003-2213-5785>

Aslan K. Valiev – Dr. Sci. (Med.), Head of the General Oncology Division, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0002-2038-3729>

Nikolay E. Kushlinskii – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>