

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-58-65



# Гипоксические белки VEGF A и CA IX и резистентность клеток сарком мягких тканей к химиопрепаратам: пилотный опыт *ex vivo* анализа

А.М. Щербаков<sup>1</sup>, Т.И. Фетисов<sup>1</sup>, Д.В. Сорокин<sup>1</sup>, В.Ю. Зиновьева<sup>1</sup>, Н.И. Моисеева<sup>1</sup>, Л.А. Лалетина<sup>1</sup>,  
Е.М. Кирилин<sup>2</sup>, А.Е. Маникайло<sup>1</sup>, Л.Я. Фомина<sup>1</sup>, Л.В. Мехеда<sup>1</sup>, А.Ю. Бохян<sup>1</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1</sup>, Л.С. Труханова<sup>1</sup>,  
Т.Г. Горькова<sup>1</sup>, Е.Е. Антошина<sup>1</sup>, О.В. Морозова<sup>1</sup>, К.И. Кирсанов<sup>1,3</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

**Контакты:** Александр Михайлович Щербаков [Alex.Scherbakov@gmail.com](mailto:Alex.Scherbakov@gmail.com)

**Введение.** Поиск предиктивных факторов является краеугольной задачей современной онкологии. Разработка большого числа новых таргетных препаратов определяет необходимость четкого предсказания хемочувствительности конкретного пациента к назначаемой терапии. В связи с этим активно ведется поиск биомаркеров прогноза ответа на терапию.

**Цель исследования** – изучение взаимосвязи между резистентностью опухолевых клеток и уровнем экспрессии CA IX (карбоангидразы IX) и VEGF A (фактора роста эндотелия сосудов A) в *ex vivo* культурах сарком мягких тканей.

**Материалы и методы.** В исследование были включены *ex vivo* культуры сарком мягких тканей, использованы резазуриновый тест, иммуноблоттинг.

**Результаты.** Получено 46 *ex vivo* образцов культур сарком мягких тканей, для которых с помощью резазуринового теста на цитотоксичность определена хемочувствительность к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям. Проведен анализ связи экспрессии гипоксических белков VEGF A и CA IX с резистентностью к химиопрепаратам. Обнаружена корреляция уровня экспрессии CA IX в гипоксии с резистентностью клеток к ифосфамиду и его комбинации с доксорубином. Образцы сарком мягких тканей, обладающие высоким индексом VEGF A, были резистентны к доксорубину, доцетакселу и его комбинации с гемцитабином ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Полученные на *ex vivo* культурах данные свидетельствуют о взаимосвязи гипоксического сигналинга и резистентности сарком мягких тканей к химиотерапии.

**Ключевые слова:** саркома мягких тканей, сигнальные пути, таргетная химиотерапия, прогноз индивидуальной чувствительности и развития лекарственной резистентности, VEGF A, CA IX

**Для цитирования:** Щербаков А.М., Фетисов Т.И., Сорокин Д.В. и др. Гипоксические белки VEGF A и CA IX и резистентность клеток сарком мягких тканей к химиопрепаратам: пилотный опыт *ex vivo* анализа. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):58–65. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-58-65.

## Hypoxia-related proteins VEGF A and CA IX and resistance of soft tissue sarcoma cells to chemotherapy: *ex vivo* pilot study

A.M. Scherbakov<sup>1</sup>, T.I. Fetisov<sup>1</sup>, D.V. Sorokin<sup>1</sup>, V.Yu. Zinovieva<sup>1</sup>, N.I. Moiseeva<sup>1</sup>, L.A. Laletina<sup>1</sup>, E.M. Kirilin<sup>2</sup>, A.E. Manikaylo<sup>1</sup>,  
L.Ya. Fomina<sup>1</sup>, L.V. Mekheda<sup>1</sup>, B.Yu. Bokhyan<sup>1</sup>, E.A. Lesovaya<sup>1</sup>, L.S. Trukhanova<sup>1</sup>, T.G. Gor'kova<sup>1</sup>, E.E. Antoshina<sup>1</sup>,  
O.V. Morozova<sup>1</sup>, K.I. Kirsanov<sup>1,3</sup>, M.G. Yakubovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow 119991, Russia;

<sup>3</sup>Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

**Contacts:** Aleksandr Mihaylovich Scherbakov [Alex.Scherbakov@gmail.com](mailto:Alex.Scherbakov@gmail.com)

**Introduction.** The identification of predictive factors is a cornerstone task of modern oncology. The development of new targeted drugs determines the need for prediction of chemosensitivity of each patient to the prescribed therapy, in this regard, the search for biomarkers of predictive response to therapy is actively conducted.

**The study objective** to investigate the relationship between tumor cell resistance and the expression levels of CA IX (carbonic anhydrase IX) and VEGF A (vascular endothelial growth factor A) in patient-derived cultures of soft tissue sarcomas.

**Materials and methods:** *ex vivo* soft tissue sarcoma cell culture, resazurin test, immunoblotting.

**Results.** We obtained 46 *ex vivo* samples of soft tissue sarcoma cultures for which chemosensitivity to doxorubicin, ifosfamide, docetaxel, gemcitabine, and their combinations was assessed by the resazurin cytotoxicity test. We analyzed the relationship between the expression of hypoxic proteins VEGF A and CA IX and the resistance to drugs. A correlation between the CA IX expression in hypoxia and cell resistance to ifosfamide and its combination with doxorubicin was found. Soft tissue sarcomas with high VEGF A index were resistant to doxorubicin, docetaxel, and its combination with gemcitabine ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** The data obtained on patient-derived cultures indicate the relationship between hypoxic signaling and resistance of soft tissue sarcomas to chemotherapeutics.

**Key words:** soft tissue sarcoma, signaling pathways, targeted chemotherapy, prediction of individual sensitivity and development of drug resistance, VEGF A, CA IX

**For citation:** Scherbakov A.M., Fetisov T.I., Sorokin D.V. et al. Hypoxia-related proteins VEGF A and CA IX and resistance of soft tissue sarcoma cells to chemotherapy: *ex vivo* pilot study. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):58–65. (In Russ.). DOI: 10.10.17650/2313-805X-2022-9-2-58-65.

## ВВЕДЕНИЕ

Наряду с хирургическим вмешательством и радиотерапией в лечении сарком мягких тканей (СМТ) активно применяется химиотерапия [1]. При этом противоопухолевые препараты оказываются эффективными лишь у 20–50 % пациентов. Это в первую очередь связано с молекулярными особенностями опухолевых клеток конкретных пациентов, обуславливающими резистентность опухоли к определенным схемам терапии, и развитием различных форм лекарственной устойчивости [2–4]. Как и все солидные новообразования, СМТ при прогрессии переходят в состояние кислородного голодания – гипоксии. Гипоксия связана с тем, что в быстрорастущий опухолевый узел не доставляется достаточное количество кислорода, это происходит как из-за низкой плотности капилляров, так и из-за их функциональной незрелости.

Одним из основных факторов, определяющих степень злокачественности новообразования, является способность опухолевых клеток продуцировать белки, отвечающие за адаптацию к гипоксическим условиям. К таким белкам относятся ростовые факторы, рецепторы, внутриклеточные киназы, поддерживающие выживаемость клеток в условиях кислородного голодания. Продукция гипоксических белков в опухоли стимулирует различные процессы как в опухоли, так и в окружающих тканях. Самым известным из таких процессов является опухолевый неоангиогенез – процесс формирования новых капилляров в опухоли [5]. Гипоксия индуцирует продукцию VEGF A (фактора роста эндотелия сосудов А) в опухолевых клетках, который, в свою очередь, запускает пролиферацию клеток эндотелия сосудов и рост новых капилляров. Активный гликолитический метаболизм – важный фактор, поддерживающий рост опухоли. При недостатке кислорода основные энергетические потребности опухолевых клеток обеспечиваются через гликолитические пути [6].

В результате жизнедеятельности злокачественных клеток генерируется избыток побочных продуктов метаболизма, таких как лактат,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}^+$ . Во избежание внутриклеточного ацидоза, несовместимого с биосинтетическими реакциями и передачей сигналов, в опухолевых клетках запускаются механизмы рН-регуляции [6]. Устранение внутриклеточного ацидоза (закисления) осуществляется посредством выброса лактата и  $\text{H}^+$ , диффузии и гидратации  $\text{CO}_2$  [7]. Кроме этого, активация механизмов рН-регуляции дает определенное преимущество опухолевым клеткам в приобретении агрессивного фенотипа [8]. В устранении клеточного ацидоза участвуют различные транспортеры и ферменты, такие как МСТs (monocarboxylate transporters, транспортеры монокарбоксилатов) и карбоангидраза. Карбоангидраза IX (CA IX) представляет собой связанный с опухолью мембранный гликопротеин (металлоэнзим), который индуцируется гипоксией. CA IX регулирует обратимую гидратацию углекислого газа до ионов гидрокарбоната и протонов, принимает участие в регуляции кислотно-щелочного баланса в клетке и межклеточной среде [9].

Оба упомянутых белка, VEGF A и CA IX, активно исследуются в СМТ. В частности, ряд исследователей указывают на роль этих белков в прогнозе заболевания [10–12].

**Цель исследования** – изучение взаимосвязи между резистентностью опухолевых клеток и уровнем экспрессии CA IX и VEGF A в переживающих (*ex vivo*) культурах СМТ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика СМТ.** Из 46 образцов СМТ получены переживающие культуры опухолевых клеток. Наибольшую группу составили недифференцированные плеоморфные саркомы, было получено 16 образцов таких опухолей. Синовиальные саркомы и липосаркомы включены в исследование в количестве 10 и 9 образцов

соответственно. Клинико-морфологические параметры больных СМТ приведены в табл. 1.

**Таблица 1.** Клинико-морфологические характеристики больных саркомами мягких тканей

**Table 1.** Clinical and morphological parameters of soft tissue sarcoma patients

Характеристика Characteristic	n (%)
Гистологический тип опухоли: Histological type of tumor:	
недифференцированные плеоморфные саркомы undifferentiated pleomorphic sarcoma	16 (35)
синовиальные саркомы synovial sarcoma	10 (22)
липосаркомы liposarcoma	9 (19)
другие саркомы other sarcomas	11 (24)
Возраст, лет: Age, years:	
<40	16 (35)
>40	30 (65)
Пол: Gender:	
мужской male	28 (61)
женский female	18 (39)
Степень злокачественности: Grade:	
G <sub>1</sub> –G <sub>2</sub>	8 (17)
G <sub>3</sub>	38 (83)
Стадия: Stage:	
I–II	11 (24)
III–IV	35 (76)

Чувствительность клеток к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям определяли с помощью резазуринового теста на цитотоксичность, как описано С.Ж. Qi и соавт. и J. Rodriguez-Sogales и соавт. [13, 14]. В исследовании использовали концентрации от 6,25 до 200 % плазматического пика препарата, описанные в работе С.Ж. Qi и соавт. [14] (табл. 2). Хемочувствительность образцов рассчитывали по формуле:

$$600 - \Sigma (\text{ингибирование клеточного роста концентрацией препарата } 6,25\text{--}200 \%).$$

Образец считали резистентным, если индекс чувствительности >250 [15].

**Инкубация в гипоксии и иммуноблоттинг.** Клетки СМТ культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, США) с высоким уровнем глюкозы, пируватом натрия и глутамином, содержащей 10 % сыворотки (HyClone, США) и антибиотик (пенициллин-стрептомицин, «ПанЭко», Рос-

сия). Для эксперимента клетки рассеивали на две 100-мм чашки Петри из расчета 4 млн клеток на чашку. Через 24 ч проводили смену культуральной среды в чашках, затем одну чашку возвращали в инкубатор с нормоксией (21 % кислорода, NuAir), вторую – переносили в двухгазовый инкубатор с гипоксией (1 % кислорода, Binder). Инкубировали клетки 24 ч и затем готовили пробы для белкового электрофореза, как описано ранее в работе А.М. Scherbakov и соавт. [16]. Иммуноблоттинг проводили с антителами к СА IX человека (CellSignaling, #5649). Нормирование результатов выполняли с помощью иммуноблоттинга с антителами к  $\alpha$ -тубулину (CellSignaling, #2144).

**Таблица 2.** Используемые в тесте *ex vivo* препараты и их комбинации, применяемые в 100 % концентрации

**Table 2.** Drugs and their combinations used in *in vitro* assay at 100 % concentration

Препарат, комбинация препаратов Drug, drug combination	100 % концентрация препарата, мг/мл 100 % drug concentration, mg/ml
Доксорубин Doxorubicin	1,0
4-гидроксиифосфамид (ифосфамид) 4-hydroxyifosfamide (ifosfamide)	3,0
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	1,0 + 3,0
Доцетаксел Docetaxel	11,3
Гемцитабин Gemcitabine	25,0
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	11,3 + 25,0

#### Определение VEGF A в культуральной среде СМТ.

Сбор образцов культуральных сред проводили сразу после окончания инкубации в нормоксии и гипоксии. В пробирки переносили 500 мкл среды и немедленно замораживали при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , не допускали повторную заморозку проб. Уровень VEGF A в образцах определяли с помощью набора реактивов для иммуноферментного анализа VEGF A Human ELISA Kit (Invitrogen, BMS277, Thermo Fisher Scientific, США). Измерение оптической плотности в плато при 450 нм выполняли на спектрофотометре Thermo Fisher Scientific (США); длину волны 620 нм использовали как референсную. Калибровочную кривую строили в программе OriginLab 9 и рассчитывали концентрацию VEGF A в образце с учетом рекомендаций производителя реактивов. Статистический анализ проводили с помощью расчета коэффициента корреляции Спирмена в программе GraphPad Prism 8.4.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Были определены хемочувствительность переживающих культур к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям, а также индекс чувствительности и чувствительность для каждого из препаратов (табл. 3).

Таблица 3. Хемочувствительность переживающих культур саркомы мягких тканей

Table 3. Chemosensitivity of patient-derived soft tissue sarcoma cultures

Препарат Drug	Чувствительные, n (%) Sensitive, n (%)	Резистентные, n (%) Resistant, n (%)
Доксорубин Doxorubicin	29 (63)	17 (37)
Ифосфамид Ifosfamide	27 (59)	19 (41)
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	16 (35)	30 (65)
Доцетаксел Docetaxel	38 (83)	8 (17)
Гемцитабин Gemcitabine	32 (70)	14 (30)
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	24 (52)	22 (48)

Описанный подход позволил выявить резистентность опухоли к определенным препаратам и провести выбор наиболее эффективной комбинации для каждой переживающей культуры СМТ.

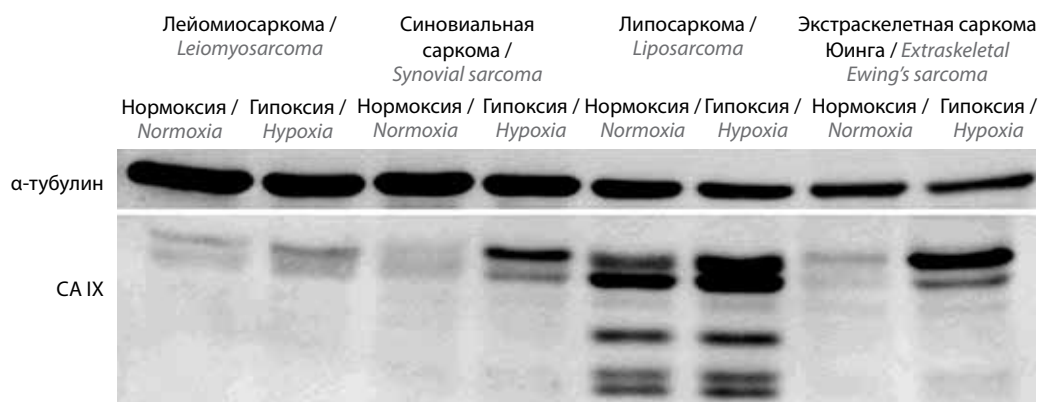
Все переживающие культуры СМТ инкубировали в течение 24 ч в нормоксии и гипоксии для определения экспрессии СА IX и VEGF A. В нормоксии в большинстве образцов не выявлена высокая экспрессия СА IX. На рисунке представлены типичные результаты иммуноблоттинга образцов СМТ с антителами к СА IX.

В нормоксии в СМТ определялись следовые количества СА IX, перевод клеток в гипоксию приводил к значительной стимуляции экспрессии СА IX в большинстве исследованных образцов.

Был проведен анализ корреляций уровня СА IX в клетках СМТ с их чувствительностью к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям. В табл. 4 представлены данные по взаимосвязи между уровнем СА IX и индексом чувствительности СМТ. В клетках СМТ с высокой экспрессией СА IX обнаружена резистентность к доксорубину, однако разница между группами не достигла уровня статистической значимости. Уровень СА IX достоверно коррелировал с резистентностью к ифосфамиду ( $p < 0,05$ ; коэффициент корреляции Спирмена  $R = 0,3$ ). Анализ комбинации 2 препаратов также выявил достоверную положительную корреляцию ( $p < 0,05$ ;  $R = 0,3$ ).

Во всех полученных культурах СМТ продемонстрировано, что гипоксия индуцирует продукцию VEGF A. В общей выборке СМТ не выявлена взаимосвязь между экспрессией VEGF A и чувствительностью к химиопрепаратам. Однако в группе липосаркомы наблюдали, что клетки с высоким уровнем экспрессии VEGF A в нормоксии имели высокую чувствительность к гемцитабину и его комбинации с доцетакселом, как это отражено в табл. 5. Кроме этого, клетки липосаркомы с высокой экспрессией VEGF A в гипоксии также были более чувствительны к комбинации гемцитабина с доцетакселом. Однако в анализе экспрессии VEGF A при изменении условий культивирования от нормоксии к гипоксии было показано, что образцы, обладающие высоким индексом VEGF A, резистентны к доксорубину, доцетакселу и его комбинации с гемцитабином ( $p < 0,05$ ).

Анализу роста СМТ в гипоксических условиях посвящено достаточно много экспериментальных работ. Первые сообщения о снижении чувствительности к химиотерапии СМТ в гипоксии появились в конце



Экспрессия СА IX в образцах саркомы мягких тканей. Клетки саркомы мягких тканей 24 ч инкубировали в нормоксии или гипоксии и затем уровень экспрессии СА IX определяли с помощью иммуноблоттинга. Для контроля загрузки геля и нормирования использовали антитела к  $\alpha$ -тубулину  
CA IX expression in soft tissue sarcoma. Soft tissue sarcoma cells were incubated in normoxia or hypoxia for 24 hours and then CA IX expression was determined by immunoblotting. Antibodies to  $\alpha$ -tubulin were used to control gel loading and normalization



Таблица 4. Анализ взаимосвязи между уровнем СА IX и хемочувствительностью саркомы мягких тканей

Table 4. Analysis of the relationship between CA IX expression and chemosensitivity of soft tissue sarcoma

Препарат Drug	Саркомы мягких тканей (общая группа) Soft tissue sarcoma (common group)		Плеоморфные саркомы Pleomorphic sarcoma		Липосаркомы Liposarcoma		Синовиальные саркомы Synovial sarcoma	
	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia
	Доксорубицин Doxorubicin	R = 0,1 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,09	R = 0,1 p = 0,7	R = 0,1 p = 0,6	R = 0,1 p = 0,8	R = 0,02 p = 0,9	R = 0,2 p = 0,7
Ифосфамид Ifosfamide	R = 0,05 p = 0,7	<b>R = 0,3</b> <b>p &lt; 0,05</b>	R = 0,1 p = 0,7	R = 0,4 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,1 p = 0,8	R = -0,3 p = 0,5	R = 0,4 p = 0,2
Доксорубицин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	R = 0,1 p = 0,61	<b>R = 0,3</b> <b>p &lt; 0,05</b>	R = 0,3 p = 0,4	R = 0,4 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,2 p = 0,6	R = -0,3 p = 0,7	R = 0,5 p = 0,2
Доцетаксел Docetaxel	R = -0,2 p = 0,3	R = -0,02 p = 0,9	R = -0,1 p = 0,7	R = -0,04 p = 0,9	R = -0,3 p = 0,4	R = 0,2 p = 0,6	R = -0,5 p = 0,3	R = -0,4 p = 0,3
Гемцитабин Gemcitabine	R = -0,1 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,3	R = 0,1 p = 0,9	R = 0,3 p = 0,3	R = -0,3 p = 0,4	R = -0,04 p = 0,90	R = -0,4 p = 0,4	R = -0,1 p = 0,8
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	R = -0,1 p = 0,4	R = 0,1 p = 0,7	R = 0,2 p = 0,6	R = 0,1 p = 0,6	R = -0,2 p = 0,7	R = 0,1 p = 0,8	R = -0,5 p = 0,2	R = -0,2 p = 0,6

**Примечание.** Здесь и в табл. 5 жирным шрифтом выделены наблюдения с  $p < 0,05$ .

*Note.* Here and in table 5 observations with  $p < 0.05$  are highlighted in bold.

70-х – начале 80-х годов XX века. Так, в пионерской работе W.M. Martin и N.J. McNally показано, что саркома мышцы линии WHF1B приобретает резистентность к доксорубину в гипоксических условиях [17]. Позднее были описаны разные *in vitro* и *in vivo* модели СМТ, в которых при гипоксических воздействиях формировалась радиорезистентность и резистентность к различным химиопрепаратам [18–21].

Адаптация СМТ к гипоксии происходит по общим закономерностям, характерным для всех солидных образований [22]. Снижение уровня кислорода приводит к стабилизации и активации транскрипционных факторов HIF, регулирующих экспрессию значительного ряда гипоксических генов. Среди белковых продуктов таких HIF-зависимых генов – VEGF A и СА IX – их экспрессия стремительно возрастает с первых часов кислородного голодания.

Высокая экспрессия этих факторов может способствовать более быстрой прогрессии новообразования. В частности, СА IX рассматривается в ряде работ как фактор плохого прогноза СМТ. К. Måseide и соавт. проанализировали 47 образцов СМТ, полученных из парафиновых блоков; уровень экспрессии СА IX, определенный в образцах иммуногистохимически, значительно варьировал, в 31 (66 %) из 47 образцов экспрессия СА IX выявлена в мембранной части

клеток. В группе пациентов с СА IX-положительными СМТ определена более низкая общая выживаемость, чем в группе пациентов с СА IX-отрицательными опухолями [23]. Дальнейшее наблюдение за пациентами, включенными в наше исследование, позволит оценить возможную связь экспрессии СА IX в гипоксии с общей и безрецидивной выживаемостью в соответствующих группах.

VEGF A также активно исследуется как возможный фактор прогноза, влияющий на выживаемость больных СМТ. Так, показано, что VEGF A не является независимым фактором прогноза общей и безрецидивной выживаемости, при этом у 78 % умерших на момент исследования пациентов был выявлен высокий уровень VEGF A в опухоли [10]. Степень злокачественности опухоли значительно коррелировала с экспрессией VEGF A. Для опухолей низкой степени злокачественности характерен низкий уровень VEGF A, тогда как в опухолях высокой степени злокачественности выявлен высокий уровень этого показателя ( $p < 0,05$ ). Т.К. Kilvaeg и соавт. изучили 249 образцов СМТ и показали, что VEGF A – фактор прогноза безрецидивной выживаемости ( $p < 0,05$ ) в однофакторном анализе. При переходе к многофакторному анализу не было доказано, что VEGF A является независимым фактором прогноза; в качестве такого фактора для

Таблица 5. Анализ взаимосвязи между уровнем VEGF A и хемочувствительностью саркомы мягких тканей

Table 5. Analysis of the relationship between VEGF A expression and chemosensitivity of soft tissue sarcoma

Препарат Drug	Саркомы мягких тканей (общая группа) Soft tissue sarcoma (common group)			Плеоморфные саркомы Pleomorphic sarcoma			Липосаркомы Liposarcoma			Синовиальные саркомы Synovial sarcoma		
	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*
Доксорубин Doxorubicin	R = 0,05 p = 0,8	R = 0,02 p = 0,9	R = -0,05 p = 0,8	R = 0,05 p = 0,9	R = 0,09 p = 0,8	R = 0,08 p = 0,8	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,1 p = 0,9	<b>R = 0,8</b> <b>p = 0,04</b>	R = -0,5 p = 0,4	R = -0,5 p = 0,4	R = 0,03 p > 0,9
Ифосфамид Ifosfamide	R = 0,3 p = 0,1	R = 0,2 p = 0,2	R = -0,3 p = 0,1	R = 0,2 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,5	R = -0,4 p = 0,2	R = 0,01 p > 0,9	R = 0,1 p = 0,9	R = 0,3 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,2 p = 0,7	R = -0,8 p = 0,1
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	R = 0,2 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,4	R = -0,2 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,6	R = -0,4 p = 0,2	R = -0,1 p = 0,8	R = -0,1 p = 0,9	R = 0,4 p = 0,3	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,3 p = 0,6
Доцетаксел Docetaxel	R = -0,1 p = 0,8	R = -0,05 p = 0,8	R = 0,01 p = 0,9	R = 0,4 p = 0,1	R = 0,3 p = 0,3	R = -0,6 p = 0,06	R = -0,7 p = 0,05	R = -0,6 p = 0,1	<b>R = 0,9</b> <b>p = 0,001</b>	R = -0,4 p = 0,4	R = -0,4 p = 0,4	R = 0,2 p = 0,7
Гемцитабин Gemcitabine	R = 0,04 p = 0,8	R = 0,01 p = 0,9	R = 0,1 p = 0,5	R = 0,4 p = 0,2	R = 0,3 p = 0,3	R = -0,2 p = 0,5	<b>R = -0,8</b> <b>p = 0,03</b>	R = -0,7 p = 0,1	R = 0,6 p = 0,1	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,2 p = 0,7	R = 0,4 p = 0,4
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	R = -0,03 p = 0,8	R = -0,03 p = 0,9	R = 0,02 p = 0,3	R = 0,1 p = 0,6	R = -0,01 p = 0,9	R = -0,2 p = 0,5	<b>R = -0,8</b> <b>p = 0,02</b>	<b>R = -0,7</b> <b>p = 0,04</b>	<b>R = 0,8</b> <b>p = 0,04</b>	R = -0,5 p = 0,4	R = -0,5 p = 0,4	R = 0,1 p = 0,8

\*Индекс VEGF A рассчитывали как отношение уровней экспрессии показателя в гипоксии и нормоксии.

\*The VEGF A index was calculated as the ratio of the expression of in hypoxia and normoxia.

СМТ авторы предлагают VEGFR-3, один из рецепторов семейства VEGFR [11].

Основное ограничение всех указанных работ – достаточно высокая вариабельность условий при заборе и хранении образцов СМТ. Поскольку при хирургическом вмешательстве происходит разная степень оксигенации опухолевой ткани, можно предположить, что до момента процессинга образец подвергается достаточно длительному воздействию кислорода из атмосферы. Воздействие атмосферы может значительно изменить уровень некоторых гипоксических факторов, особенно это значимо для факторов HIF, которые в ответ на реоксигенацию быстро деградируют. Эти обстоятельства заметно осложняют изучение гипоксических белков в клиническом материале. Предложенная нами *ex vivo* система не имеет таких недостатков и позволяет стандартизировать анализ СМТ в гипоксии: все образцы подвергаются одинаковой обработке

в течение 24 ч, исключена вариабельность условий эксперимента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе данной работы получен ряд образцов переживающих культур СМТ, для которых определена чувствительность к основным химиопрепаратам (доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину) и их комбинациям. Впервые на *ex vivo* модели СМТ проанализирована связь хемочувствительности с экспрессией гипоксических белков CA IX и VEGF A. Экспрессия CA IX коррелировала с резистентностью клеток СМТ к ифосфамиду и его комбинации с доксорубином. Культуры липосарком с высоким уровнем экспрессии VEGF A имели высокую чувствительность к гемцитабину и его комбинации с доцетакселом, в то время как способность СМТ изменять активность экспрессии VEGF A в ответ на гипоксию была

связана с резистентностью к доксорубину, доцетакселу и его комбинации с гемцитабином. Полученные на переживающих культурах данные свидетельствуют о взаимосвязи гипоксического сигналинга и резистентности СМТ к химиотерапии. Дальнейшее

развитие направления позволит оценить рациональность включения новых *ex vivo* тестов в рутинную практику, в частности, предстоит проследить взаимосвязь экспериментальных данных и отдаленных клинических наблюдений.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hoang N.T., Acevedo L.A., Mann M.J. et al. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res* 2018;10:1089–114. DOI: 10.2147/CMAR.S159641.
- Jimenez R.E., Zalupski M.M., Frank J.J. et al. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. *Cancer* 1999;86(6):976–81. DOI: 10.1002/(sici)1097-0142(19990915)86:6<976::aid-cncr12>3.0.co;2-3.
- Hsu J.Y., Seligson N.D., Hays J.L. et al. Clinical utility of CDK4/6 Inhibitors in sarcoma: successes and future challenges. *JCO Precis Oncol* 2022;6:e2100211. DOI: 10.1200/po.21.00211.
- Yuan J., Li X., Yu S. Molecular targeted therapy for advanced or metastatic soft tissue sarcoma. *Cancer Control* 2021;28:10732748211038424. DOI: 10.1177/10732748211038424.
- Majidpoor J., Mortezaee K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors – clinical perspectives. *Cell Oncol (Dordr)* 2021;44(4):715–37. DOI: 10.1007/s13402-021-00602-3.
- Ibrahim-Hashim A., Estrella V. Acidosis and cancer: from mechanism to neutralization. *Cancer Metastasis Rev* 2019;38(1–2):149–55. DOI: 10.1007/s10555-019-09787-4.
- Swietach P. What is pH regulation, and why do cancer cells need it? *Cancer Metastasis Rev* 2019;38(1–2):5–15. DOI: 10.1007/s10555-018-09778-x.
- Gatenby R.A., Gillies R.J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8(1):56–61. DOI: 10.1038/nrc2255.
- Becker H.M. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br J Cancer* 2020;122(2):157–67. DOI: 10.1038/s41416-019-0642-z.
- Chao C., Al-Saleem T., Brooks J.J. et al. Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Ann Surg Oncol* 2001;8(3):260–7. DOI: 10.1007/s10434-001-0260-9.
- Kilvaer T.K., Valkov A., Sorbye S. et al. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. *PLoS One* 2010;5(12):e15368. DOI: 10.1371/journal.pone.0015368.
- Forker L., Gaunt P., Sioletic S. et al. The hypoxia marker CAIX is prognostic in the UK phase III Vortex-Biobank cohort: an important resource for translational research in soft tissue sarcoma. *Br J Cancer* 2018;118(5):698–704. DOI: 10.1038/bjc.2017.430.
- Rodríguez-Corrales J., Josan J.S. Resazurin live cell assay: setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results. *Methods Mol Biol* 2017;1647:207–19. DOI: 10.1007/978-1-4939-7201-2\_14.
- Qi C.J., Ning Y.L., Zhu Y.L. et al. *In vitro* chemosensitivity in breast cancer using ATP-tumor chemosensitivity assay. *Arch Pharm Res* 2009;32(12):1737–42. DOI: 10.1007/s12272-009-2211-0.
- Neubauer H., Stefanova M., Solomayer E. et al. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res* 2008;28(2a):949–55.
- Scherbakov A.M., Zhabinskii V.N., Khrupach V.A. et al. Biological evaluation of a new brassinosteroid: antiproliferative effects and targeting estrogen receptor  $\alpha$  pathways. *Chem Biodivers* 2019;16(9):e1900332. DOI: 10.1002/cbdv.201900332.
- Martin W.M., McNally N.J. Cytotoxicity of adriamycin to tumour cells *in vivo* and *in vitro*. *Br J Cancer* 1980;42(6):881–9. DOI: 10.1038/bjc.1980.336.
- Yamauchi T., Raffin T.A., Yang P. et al. Differential protective effects of varying degrees of hypoxia on the cytotoxicities of etoposide and bleomycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19(4):282–6. DOI: 10.1007/bf00261473.
- Young S.D., Hill R.P. Effects of reoxygenation on cells from hypoxic regions of solid tumors: anticancer drug sensitivity and metastatic potential. *J Nat Cancer Inst* 1990;82(5):371–80. DOI: 10.1093/jnci/82.5.371.
- Woods M.L., Koch C.J., Lord E.M. Detection of individual hypoxic cells in multicellular spheroids by flow cytometry using the 2-nitroimidazole, EF5, and monoclonal antibodies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34(1):93–101. DOI: 10.1016/0360-3016(95)02006-3.
- Harrison L., Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 2004;9(Suppl. 5):31–40. DOI: 10.1634/theoncologist.9-90005-31.
- Nordmark M., Alsner J., Keller J. et al. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer* 2001;84(8):1070–5. DOI: 10.1054/bjoc.2001.1728.
- Måseide K., Kandel R.A., Bell R.S. et al. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(13):4464–71. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0541.

### Вклад авторов:

А.М. Щербаков: проведение экспериментов, анализ данных, написание статьи, управление проектом, разработка дизайна исследования;  
Т.И. Фетисов, Д.В. Сорокин: проведение экспериментов, анализ данных, написание статьи;  
В.Ю. Зиновьева, Н.И. Моисеева, Л.А. Лалетина, А.Е. Манайко, Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда, А.Ю. Боян, Е.А. Лесовая, Л.С. Труханова, Т.Г. Горькова, Е.Е. Антошина, О.В. Морозова: получение и характеристика клинических образцов;  
Е.М. Кирилин: анализ данных;  
К.И. Кирсанов\*: управление проектом, редактирование статьи;  
М.Г. Якубовская\*: управление проектом, разработка дизайна исследования.  
\*Равнозначный вклад авторов.

**Authors' contributions**

A.M. Scherbakov: conducting experiments, data analysis, writing the manuscript, project management, study design;  
T.I. Fetisov, D.V. Sorokin: conducting experiments, data analysis, writing the manuscript;  
V.Yu. Zinovieva, N.I. Moiseeva, L.A. Laletina, A.E. Manikaylo, L.Ya. Fomina, L.V. Mekheda, B.Yu. Bokhyan, E.A. Lesovaya, L.S. Trukhanova, T.G. Gor'kova, E.E. Antoshina, O.V. Morozova: obtaining and characterization of clinical samples;  
E.M. Kirilin: data analysis;  
K.I. Kirsanov\*: project management, manuscript editing;  
M.G. Yakubovskaya\*: project management, study design.  
\*Equivalent contribution of the authors.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.М. Щербakov / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>  
Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>  
Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>  
В.Ю. Зиновьева / V.Yu. Zinovieva: <https://orcid.org/0000-0003-2809-8487>  
Н.И. Моисеева / N.I. Moiseeva: <https://orcid.org/0000-0001-6697-7154>  
Л.А. Лалетина / L.A. Laletina: <https://orcid.org/0000-0002-8839-5881>  
Е.М. Кирилин / E.M. Kirilin: <https://orcid.org/0000-0003-4960-8925>  
А.Е. Маникайло / A.E. Manikaylo: <https://orcid.org/0000-0002-1574-0082>  
Л.Я. Фомина / L.Ya. Fomina: <https://orcid.org/0000-0002-9306-5465>  
Л.В. Мехеда / L.V. Mekheda: <https://orcid.org/0000-0002-6445-9983>  
А.Ю. Бохян / B.Yu. Bokhyan: <https://orcid.org/0000-0002-1396-3434>  
Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>  
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>  
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-09095).  
**Financing.** The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09095).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. с изменениями 2013 г. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (проект № 18-29-09095, протокол № 18-29-09095 от 28.09.2018).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of 1964, as amended in 2013. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.N. Blokhin National Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia (project 18-29-09095, protocol No. 18-29-09095 dated September 28, 2018).

All patients gave written informed consent to participate in the study.