



Оригинальная статья

Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1, CD4, CD8, CD20 и PU.1 в дедифференцированной хондросаркоме кости: клиническая и прогностическая значимость

Ковалева О.В.¹ • Булычева И.В.¹ • Рогожин Д.В.¹ • Грачев А.Н.¹ • Прищеп П.Л.¹ • Кушлинский Н.Е.¹

Актуальность. Дедифференцированная хондросаркома – редкий и крайне агрессивный вариант мезенхимальных опухолей костей, который имеет бифазное строение, представленное структурами классической хондросаркомы, как правило, низкой или средней степени злокачественности в сочетании с резким переходом в высокозлокачественную нехрящевую саркому. Дедифференцированная хондросаркома ассоциирована с неблагоприятным прогнозом, низкой эффективностью лекарственной терапии и высокими показателями летальности. Одно из перспективных направлений лечения данных опухолей – иммунотерапия, для использования которой необходимо более глубокое понимание иммунологического статуса опухоли и состава ее микроокружения.

Цель – анализ экспрессии маркеров воспалительного инфильтрата опухолевой стромы PD-L1, CD4, CD8, CD20 и PU.1 в образцах первичных опухолей дедифференцированной хондросаркомы для поиска новых мишеней прогноза и терапии, а также потенциальных предикторов ее эффективности.

Материал и методы. Ретроспективно проанализированы данные иммуногистохимического (ИГХ) исследования образцов опухоли, полученных от 42 пациентов с дедифференцированной хондросаркомой (18 мужчин и 24 женщин в возрасте от 24 до 94 лет; медиана – 65 лет). Исследованные образцы дедифференцированной хондросаркомы содержали 2 компонента: высокодифференцированную хондросаркому и низкодифференцированную нехрящевую саркому, представленную плеоморфной недифференцированной саркомой (n = 33),

остеосаркомой (n = 6), рабдомиосаркомой (n = 2) и ангиосаркомой (n = 1). ИГХ-анализ проводили в автоматизированном режиме на ИГХ-стейнере Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, США) с использованием оптимизированного протокола и антител анти-PD-L1 (клон SP142) и в ручном режиме для окраски с использованием антител к PU.1, CD4, CD8 и CD20. Оценку экспрессии PD-L1 выполняли отдельно в дедифференцированном и хондроидном компонентах клеток опухоли. Особо учитывали образцы, содержащие лимфоциты, экспрессирующие PD-L1.

Результаты. Экспрессия PD-L1 в дедифференцированном компоненте опухоли наблюдалась в 40% (17 из 42) случаев, в хондроидном компоненте – в 26% (11 из 42), в обоих компонентах опухоли – в 17% (7 из 42) образцов. Ассоциации между экспрессией PD-L1 в различных компонентах опухоли с клинико-морфологическими особенностями заболевания не установлено. При отсутствии экспрессии PD-L1 медиана выживаемости пациентов составила 68,6 месяца, тогда как при наличии экспрессии – 7,7 месяца (p = 0,096). Среднее содержание макрофагов в дедифференцированном компоненте опухоли составило 17,3 ± 12,8%, CD4⁺-Т-клеток – 4 ± 3,5%, CD8⁺-Т-клеток – 4 ± 2,4%, В-клеток – 6,7 ± 3,8%. Анализ ассоциации содержания иммунных клеток с клинико-морфологическими характеристиками показал: высокая инфильтрация опухоли В-клетками характерна для более ранней стадии заболевания (p = 0,045). Прогностическая значимость исследованных стромальных маркеров не выявлена, однако высокая макрофагальная инфильтрация образцов

дедифференцированной хондросаркомы имела тенденцию к неблагоприятному течению заболевания (p = 0,112). Количество PU.1⁺-клеток в стромах опухоли прямо положительно коррелировало с экспрессией PD-L1 как в хондроидном (r = 0,357, p = 0,028), так и в дедифференцированном (r = 0,343, p = 0,033) компонентах опухоли, а также с содержанием Т-клеток (r = 0,402, p = 0,014).

Заключение. Полученные нами результаты ИГХ-исследования экспрессии PD-L1, CD4, CD8, CD20 и PU.1 указывают на клиническую и прогностическую значимость иммунного микроокружения дедифференцированной хондросаркомы, что открывает дополнительные перспективы для прогнозирования заболевания и разработки иммунотерапевтических подходов. Тем не менее для более точного определения клинической значимости выявленных маркеров необходимо продолжение исследований с привлечением расширенной выборки пациентов.

Ключевые слова: дедифференцированная хондросаркома, экспрессия PD-L1, CD4, CD8, CD20, PU.1, прогноз, иммунотерапия

Для цитирования: Ковалева ОВ, Булычева ИВ, Рогожин ДВ, Грачев АН, Прищеп ПЛ, Кушлинский НЕ. Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1, CD4, CD8, CD20 и PU.1 в дедифференцированной хондросаркоме кости: клиническая и прогностическая значимость. Альманах клинической медицины. 2025;53(2). doi: 10.18786/2072-0505-2025-53-006

Поступила 26.09.2024; доработана 20.03.2025; принята к публикации 27.03.2025; опубликована онлайн 09.04.2025



Дедифференцированная хондросаркома – редкий пример крайне агрессивного варианта мезенхимальных опухолей костей с установленными и описанными в литературе морфологическими, рентгенологическими и клиническими проявлениями. Этот вариант опухоли встречается с частотой от 1–2 до 10% случаев хондросарком и обычно диагностируется у пациентов старше 50 лет, что отличает его от остеосаркомы, поражающей преимущественно подростков и взрослых до 30 лет [1, 2]. Бифазное строение опухоли, представленное структурами классической хондросаркомы, как правило, низкой или средней степени злокачественности (low grade) в сочетании с резким переходом в высокозлокачественную (high grade) нехрящевую саркому, считается основополагающим признаком данного варианта опухоли [3]. Если классическая хондросаркома демонстрирует относительно медленный рост и ограниченную чувствительность к химио- и радиотерапии, то дедифференцированная форма, наоборот, обладает высокой склонностью к быстрому прогрессированию и метастазированию. Для лечения дедифференцированной саркомы, в отличие от ее классического варианта, часто используется лекарственная терапия, но прогноз заболевания остается крайне неблагоприятным [4].

Дедифференцированная хондросаркома формируется на фоне хондросаркомы низкой степени злокачественности в результате накопления генетических и эпигенетических нарушений, приводящих к потере контроля над клеточной дифференцировкой и пролиферацией, таких как мутации *IDH1*, *IDH2*, *TP53*; инактивация *CDKN2A*; aberrантная экспрессия *MDM2* и *CDK4*. Эти молекулярные изменения делают дедифференцированную хондросаркому устойчивой ко многим традиционным методам лечения и объясняют ее крайне агрессивное клиническое течение [1, 5, 6]. Несмотря на достижения в области молекулярной онкологии, на сегодняшний день таргетная терапия для опухолей данного типа не разработана. Иммунное микроокружение дедифференцированной хондросаркомы отличается выраженной иммуносупрессией, хроническим воспалением и сниженной активностью противоопухолевого иммунного ответа [7]. К ключевым характеристикам относится преобладание макрофагов опухолевого микроокружения, представленных в основном M2-подтипом, который способствует подавлению иммунного ответа и ремоделированию внеклеточного матрикса. Эти макрофаги

Ковалева Ольга Владимировна – д-р биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>. E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Булычева Ирина Владиславовна – д-р мед. наук, врач-патологоанатом, патологоанатомическое отделение¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7592-4249> ☒ 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация. E-mail: irena@boulytcheva.com

Рогожин Дмитрий Викторович – д-р мед. наук, зав. отделом морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>. E-mail: patol.777@mail.ru

Грacheв Алексей Николаевич – д-р биол. наук, заведующий лабораторией биологии стромальных клеток опухолей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>. E-mail: alexei.gratchev@mail.com

Прицеп Полина Леонидовна – аспирант, врач детский онколог детского онкологического отделения № 2 (химиотерапии опухолей опорно-двигательного аппарата) Научно-исследовательского института детской онкологии и гематологии им. академика РАМН Л.А. Дурнова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0810-8238>. E-mail: paulig92@mail.ru

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель клинико-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

секретируют иммуносупрессорные факторы, включая антагонист рецептора интерлейкина-1, интерлейкин-10 и трансформирующий фактор роста β , создавая условия, при которых цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺) теряют способность эффективно уничтожать опухолевые клетки [8].

Регуляторные Т-клетки (Tregs) также играют важную роль в подавлении иммунного ответа, блокируя активность натуральных киллеров (NK-клеток) и CD8⁺-Т-клеток. Высокая инфильтрация Tregs связана с неблагоприятным прогнозом многих солидных опухолей, поскольку эти клетки способствуют устойчивости опухоли к иммунному ответу, тогда как высокая инфильтрация CD8⁺-клетками ассоциирована с благоприятным прогнозом [9, 10]. Дополнительно опухолевые клетки активно экспрессируют PD-L1, что позволяет им избегать атаки со стороны Т-клеток, подавляя их пролиферацию и активность [11]. В совокупности эти факторы создают условия, при которых дедифференцированная хондросаркома практически не поддается иммунотерапии ингибиторами контрольных точек (анти-PD-1, анти-CTLA-4), а противоопухолевый иммунный ответ остается недостаточным для борьбы с прогрессией заболевания. Имеются единичные данные о том, что некоторые методы иммунотерапии, такие как применение провоспалительных цитокинов, онколитических вакцин и адаптивный перенос активированных Т-клеток, показали эффективность в лечении пациентов с саркомами костей и мягких тканей, но не в случае дедифференцированной хондросаркомы [12, 13]. В связи с этим целью данной работы был анализ экспрессии маркеров воспалительного инфильтрата опухолевой стромы PD-L1, CD4, CD8, CD20 и PU.1 в образцах первичных опухолей дедифференцированной хондросаркомы для поиска новых мишеней прогноза и терапии, а также потенциальных предикторов ее эффективности.

Материал и методы

Ретроспективно проанализированы образцы первичных опухолей дедифференцированной хондросаркомы, полученные от 42 пациентов (18 мужчин и 24 женщин в возрасте от 24 до 94 лет; медиана – 65 лет), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2012 по 2023 г. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол от 02.09.2021). Клинические данные, включая возраст, пол, гистологический подтип дедифференцированного компонента опухоли, стадию заболевания, дифференцировку опухоли, были собраны из медицинских карт пациентов. Критерии включения в исследование: гистологически подтвержденный диагноз, наличие доступных архивных гистологических образцов, полные клинические данные. Критерии исключения: неполные данные наблюдения, неoadъювантная химиотерапия, наличие сопутствующих злокачественных новообразований.

Иммуногистохимический (ИГХ) анализ проводили в автоматизированном ИГХ-стейнере Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, США) с применением оптимизированного протокола и антител анти-PD-L1 (клон SP142, Ventana Medical Systems, США) и в ручном режиме для окраски с использованием антител к PU.1 (клон 9G7, Cell Signaling Technology, США), CD4, CD8 (клон C8/144B, Dako, США) и CD20 (клон RM272, Sigma-Aldrich, США). Клетки-мишени обнаруживали с помощью универсальной системы детекции OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, США) согласно инструкции производителя. Для контроля протокола ИГХ-исследования при окрашивании на PD-L1 использовали внутрилабораторные тканевые позитивные контроли (ткани миндалина, плаценты, мелкоклеточного рака легкого).

Оценку окрашивания проводили при помощи микроскопа Olympus BX53F (Olympus, Япония) путем определения процентного содержания исследуемых клеточных популяций. В случае PD-L1 оценку экспрессии выполняли отдельно в дедифференцированном и хондроидном компонентах клеток опухоли. Особо учитывали образцы, содержащие PD-L1-экспрессирующие лимфоциты. Все образцы были разделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии PD-L1.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 10.0. Для выбора критерия оценки статистической значимости отличия выборок проведена оценка нормальности распределения с помощью критерия Д'Агостино. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали t-критерий Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с помощью определения коэффициента корреляции Пирсона. Анализ таблиц сопряженности осуществляли с использованием точного критерия Фишера и критерия χ^2 . Для анализа выживаемости группы были сформированы относительно содержания PD-L1

в опухолевых клетках (наличие или отсутствие экспрессии) или среднего процентного содержания иммунных клеток микроокружения. Анализ выживаемости проводили с помощью построения кривых дожития по методу Каплана – Майера. Период наблюдения составил временной интервал с момента операции до смерти пациента или его последнего посещения врача. Сравнение статистической значимости различий выполняли при использовании логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Микроскопическое исследование показало, что дедифференцированная опухоль состояла из 2 компонентов: высокодифференцированной хондросаркомы и низкодифференцированной нехрящевой саркомы. Наиболее часто диагностирована плеоморфная недифференцированная саркома – в 33 случаях, остеосаркома выявлена в 6 случаях, рабдомиосаркома – в 2 и ангиосаркома – в 1 наблюдении. Описание клинико-морфологических характеристик приведено в табл. 1.

Анализ экспрессии PD-L1 в образцах дедифференцированной хондросаркомы выявил следующие закономерности. Экспрессия PD-L1 в дедифференцированном компоненте опухоли наблюдалась в 40% (17 из 42) случаев, в хондроидном компоненте – в 26% (11 из 42), в обоих

Таблица 1. Характеристика пациентов с дедифференцированной хондросаркомой

Характеристика	Число наблюдений, абс.
Пол пациента:	
мужской	18
женский	24
Дифференцировка опухоли:	
G1	22
G1–2	15
G3	5
Стадия заболевания:	
II	21
III–IV	21
Дедифференцированный компонент при диагнозе:	
установлен	16
не установлен	26

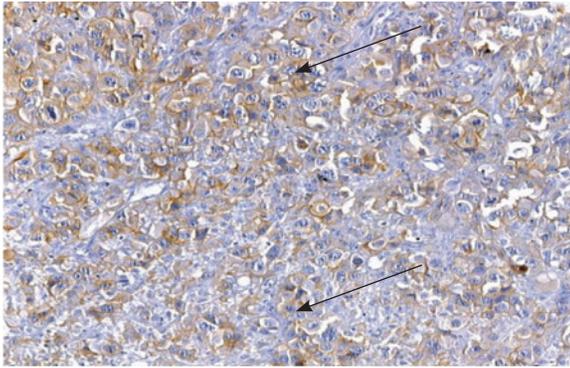


Рис. 1. Иммуногистохимический метод исследования. Положительная ядерно-цитоплазматическая экспрессия маркера PD-L1 в опухолевых клетках и опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах в полиморфноклеточном саркоматозном образце дедифференцированной хондросаркомы (стрелки). Микропрепарат (x200)

компонентах опухоли – в 17% (7 из 42) случаев. Пример иммуногистохимического окрашивания на PD-L1 представлен на рис. 1.

Анализ клинической значимости экспрессии PD-L1 показал, что ни один из изученных факторов (возраст, пол, гистологический подтип опухоли, степень дифференцировки, стадия заболевания и наличие дедифференцированного компонента опухоли на момент диагностики) не ассоциирован с экспрессией PD-L1 в дедифференцированном компоненте, хондроидном компоненте или в обоих компонентах дедифференцированной хондросаркомы (табл. 2).

Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках, особенно в случае ее выявления в дедифференцированном компоненте опухоли, имела тенденцию к неблагоприятному прогнозу (отношение риска 3,150; $p = 0,096$) (табл. 3).

Таблица 2. Ассоциация экспрессии PD-L1 с клинико-морфологическими характеристиками больных дедифференцированной хондросаркомой

Характеристика, абс.*	Дедифференцированный компонент опухоли			Хондроидный компонент опухоли			Оба компонента в одном образце		
	PD-L1 +	PD-L1 -	p	PD-L1 +	PD-L1 -	p	PD-L1 +	PD-L1 -	p
Возраст:									
< 65 лет	6	17	0,058	5	18	0,504	2	21	0,214
> 65 лет	11	8		6	13		5	14	
Пол:									
мужской	7	11	> 0,999	5	13	> 0,999	3	15	> 0,999
женский	10	14		6	18		4	20	
Гистологический тип:									
недифференцированная саркома	13	20	0,639	8	25	0,409	5	28	0,603
остеосаркома	2	4		3	3		2	4	
рабдомиосаркома	1	1		0	2		0	2	
ангиосаркома	1	0		0	1		0	1	
Дифференцировка опухоли:									
G1	9	13	0,574	5	17	0,729	5	17	0,427
G1–2	7	8		4	11		2	13	
G3	1	4		2	3		0	5	
Стадия заболевания:									
II	7	14	0,530	5	16	> 0,999	2	19	0,409
III–IV	10	11		6	15		5	16	
Дедифференцированный компонент при установлении диагноза:									
да	6	10	> 0,999	7	9	0,070	3	13	> 0,999
нет	11	15		4	22		4	22	

PD-L1 + – наличие экспрессии PD-L1, PD-L1 – – отсутствие экспрессии PD-L1

* Количество наблюдений

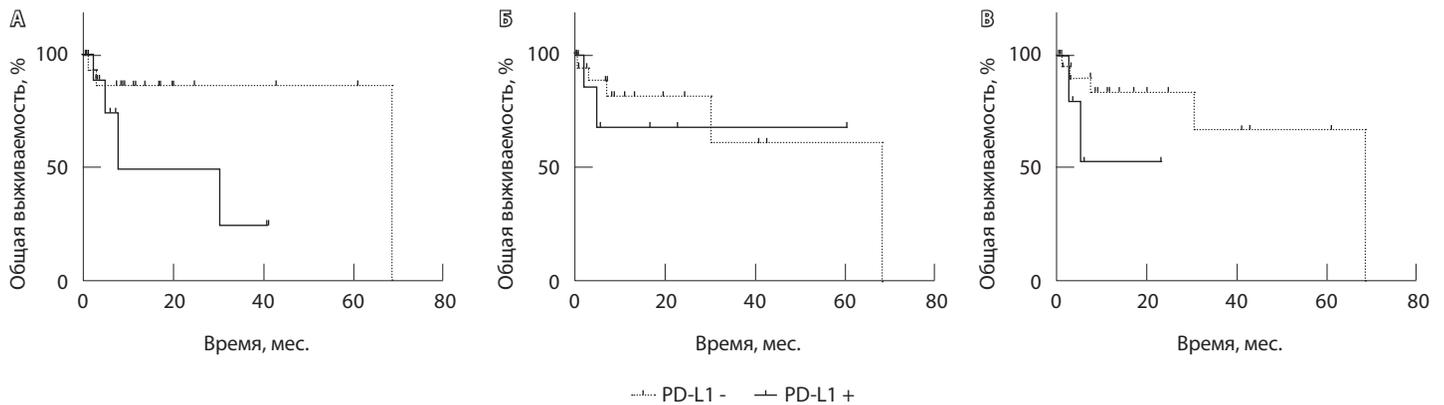


Рис. 2. Анализ прогностической значимости экспрессии PD-L1 в различных компонентах дедифференцированной хондросаркомы: общая выживаемость пациентов в зависимости от экспрессии PD-L1 в дедифференцированном (А), хондроидном (Б) и в обоих (В) компонентах опухоли. PD-L1 – отсутствие экспрессии PD-L1, PD-L1 + – наличие экспрессии PD-L1

В группе больных дедифференцированной хондросаркомой с отсутствием экспрессии PD-L1 медиана выживаемости составила 68,6 месяца, а в группе с наличием экспрессии данного маркера – 7,7 месяца (рис. 2).

Проведен ИГХ-анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата дедифференцированного компонента исследуемых опухолей. Для выявления макрофагов в опухолевой строме использовали пан-макрофагальный маркер PU.1, для выявления Т-клеток – CD4 и CD8, а для В-клеток – CD20 (рис. 3).

Доминирующей популяцией иммунных клеток в строме дедифференцированной хондросаркомы были макрофаги. Среднее содержание макрофагов в дедифференцированном компоненте опухоли составило $17,3 \pm 12,8\%$, CD4⁺-Т-клеток – $4 \pm 3,5\%$, CD8⁺-Т-клеток – $4 \pm 2,4\%$, В-клеток – $6,7 \pm 3,8\%$.

Обнаружена значимая ассоциация между содержанием CD20⁺-клеток в опухоли и стадией заболевания, а именно: более высокая инфильтрация опухоли В-клетками характерна для более ранней стадии заболевания ($p = 0,045$). Установлено также, что при идентификации дедифференцированного компонента опухоли на этапе установления диагноза для данного типа опухолей наблюдалась более высокая значимая инфильтрация макрофагами и В-клетками ($p = 0,003$ и $p = 0,017$ соответственно) (табл. 4). Вместе с тем прогностической значимости исследованных маркеров не выявлено (рис. 4). Однако стоит отметить, что высокая макрофагальная инфильтрация опухолей дедифференцированной хондросаркомы имеет тенденцию к неблагоприятному прогнозу течения заболевания, а медиана выживаемости пациентов отличается вдвое (30,5 месяца против 68,6 месяца) (отношение риска 3,205; $p = 0,112$).

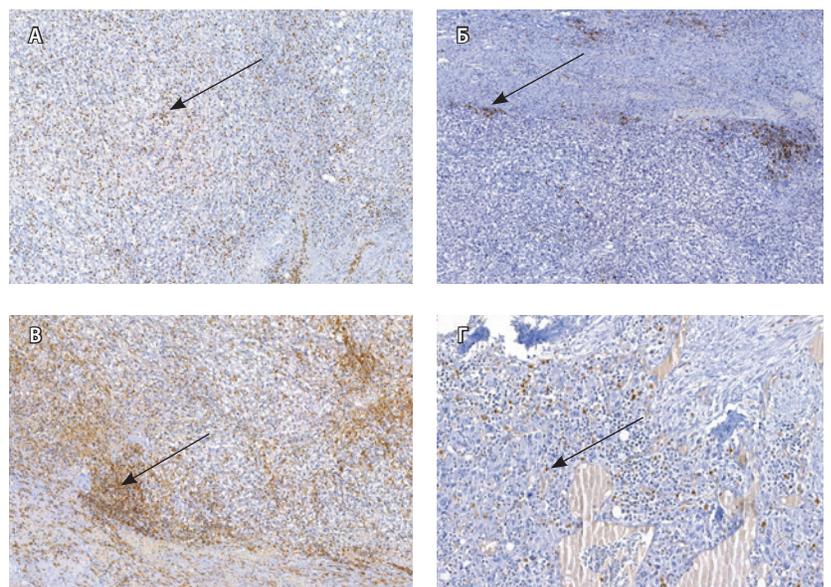


Рис. 3. Иммуногистохимический метод исследования. Экспрессия маркеров PU.1 (А), CD20 (Б), CD4 (В) и CD8 (Г) в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах в образцах ткани дедифференцированной хондросаркомы (стрелки). Микропрепарат ($\times 100$)

Таблица 3. Статистический анализ прогностической значимости PD-L1 при дедифференцированной хондросаркоме

Высокая / низкая экспрессия PD-L1	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	p
Дедифференцированный компонент	3,150	0,6230–15,93	0,096
Хондроидный компонент	1,503	0,2440–9,262	0,6143
Оба компонента в одном образце	3,122	0,3023–32,25	0,1365

ДИ – доверительный интервал, ОР – отношение риска

**Таблица 4.** Ассоциация содержания иммунных клеток PU.1⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺ у пациентов с дедифференцированной хондросаркомой с учетом клинико-морфологических характеристик

Характеристика	PU.1		CD4		CD8		CD20	
	M ± SD, %	p	M ± SD, %	p	M ± SD, %	p	M ± SD, %	p
Возраст:								
< 65 лет	16,8 ± 12,2	0,790	3,7 ± 3,7	0,642	4,4 ± 2,7	0,451	6,6 ± 4,3	0,764
> 65 лет	17,9 ± 13,9		4,3 ± 3,3		3,7 ± 2,1		7,0 ± 3,4	
Пол:								
мужской	21,1 ± 11,2	0,086	5,3 ± 3,2	0,059	4,1 ± 2,2	0,991	7,6 ± 4,1	0,274
женский	14,1 ± 13,5		3,1 ± 3,5		4,1 ± 2,7		6,1 ± 3,5	
Гистологический тип дедифференцированного компонента:								
недифференцированная саркома	18,9 ± 13,2	0,411	4,1 ± 3,4	0,893	3,87 ± 2,2		6,8 ± 4,0	0,643
остеосаркома	11,0 ± 8,9		3,0 ± 4,4		3,75 ± 2,5		7,5 ± 2,8	
рабдомиосаркома	5*		5,0 ± 7,1		10*		7,5 ± 3,5	
ангиосаркома	10*		5*		–		2*	
Дифференцировка опухоли:								
G1	15,0 ± 12,7	0,451	3,7 ± 3,4	0,740	3,3 ± 2,1	0,110	6,5 ± 4,2	0,877
G1–2	20,7 ± 13,1		4,2 ± 3,8		5,3 ± 2,4		7,3 ± 3,7	
G3	18,0 ± 13,0		5,0 ± 3,5		3,3 ± 2,8		6,6 ± 2,8	
Стадия:								
II	18,4 ± 12,1	0,603	4,9 ± 3,4	0,138	3,7 ± 2,7	0,443	8,0 ± 4,2	0,045
III–IV	16,2 ± 13,6		3,2 ± 3,6		4,4 ± 2,1		5,3 ± 2,7	
Дедифференцированный компонент при установлении диагноза:								
да	24,6 ± 9,9	0,003	5,3 ± 3,4	0,069	4,1 ± 2,2	0,852	9,0 ± 4,4	0,017
нет	12,7 ± 12,4		3,2 ± 3,5		4,0 ± 2,6		5,7 ± 3,1	

Данные представлены в виде среднего процентного содержания клеток и стандартного отклонения (M ± SD, %)

* Абсолютные значения

Корреляционный анализ между экспрессией PD-L1 и инфильтрацией стромы опухоли иммунными клетками показал, что количество PU.1⁺-клеток в строме опухоли прямо положительно коррелирует с экспрессией PD-L1 как в хондроидном, так и в дедифференцированном компонентах опухоли ($r = 0,357$, $p = 0,028$; $r = 0,343$, $p = 0,033$ соответственно), а также с содержанием Т-клеток ($r = 0,402$, $p = 0,014$).

Обсуждение

Настоящее исследование посвящено изучению опухолевого микроокружения дедифференцированной хондросаркомы – редкой мезенхимальной

опухоли с неблагоприятным прогнозом и ограниченными возможностями терапии. С учетом активного внедрения иммунотерапии в лечение солидных опухолей исследователи уделяют особое внимание анализу клеточного состава иммунного инфильтрата, поскольку он во многом определяет эффективность терапии [14]. Мы выявили экспрессию PD-L1 в дедифференцированном компоненте хондросаркомы в 40% наблюдений, а в хондроидном компоненте – в 26%, что соответствует данным литературы. Так, в исследовании M. Kostine и соавт. экспрессия PD-L1 наблюдалась в 52% образцов дедифференцированной хондросаркомы и коррелировала с инфильтрацией опухоли

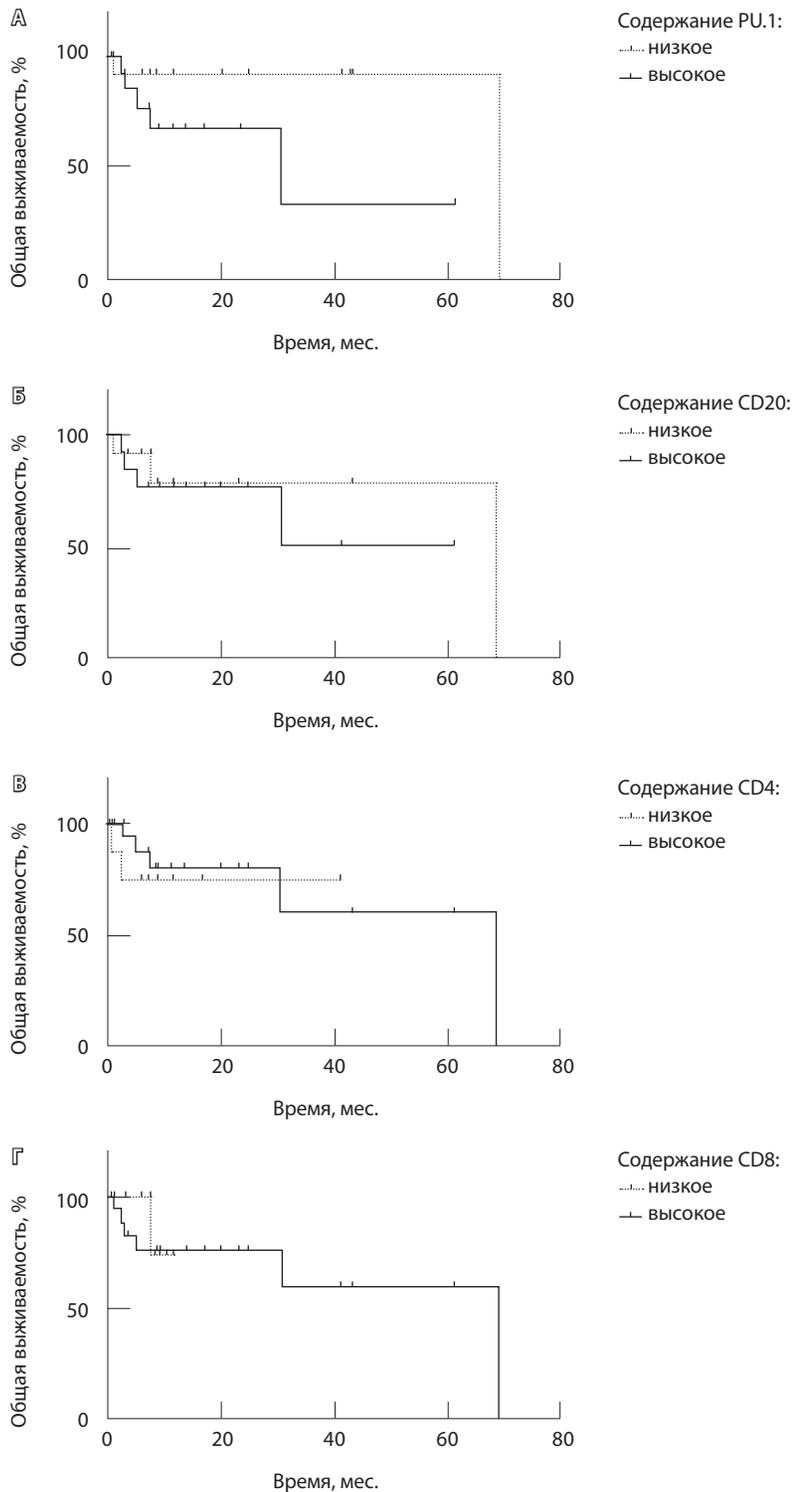


Рис. 4. Общая выживаемость пациентов с дедифференцированной хондросаркомой в зависимости от содержания макрофагов (А – PU.1), В-клеток (Б – CD20) и Т-клеток различных фенотипов (В – CD4, Г – CD8) в строме дедифференцированного компонента опухолей. Для анализа выживаемости группы сравнения были сформированы в зависимости от содержания иммунных клеток микроокружения выше или ниже среднего

Т-клетками [7]. R. Iseulys и соавт. проанализировали выборку из 49 пациентов с дедифференцированной хондросаркомой и обнаружили экспрессию PD-L1 в 43% опухолевых клеток [10].

Нами установлено отсутствие ассоциации между экспрессией PD-L1 в различных компонентах дедифференцированной хондросаркомы и основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Анализ прогностической значимости PD-L1 показал, что экспрессия данного белка в опухолевых клетках в дедифференцированном компоненте опухоли имеет тенденцию к неблагоприятному прогнозу заболевания. Полученные нами результаты согласуются с данными исследования Y. Zhang и соавт., в котором экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках хондросаркомы была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [11]. Вместе с тем аналогичные исследования, проведенные R. Iseulys и соавт., свидетельствуют о том, что экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках не всегда может служить надежным предиктором течения заболевания [10].

R. Iseulys и соавт. выдвинули гипотезу о возможной роли экспрессии PD-L1 в стромальных клетках дедифференцированной хондросаркомы как потенциального благоприятного прогностического маркера. Авторы выявили 3 образца, в которых отмечалась экспрессия PD-L1 в лимфоцитах стромы. Все пациенты с такими опухолевыми характеристиками оставались живы на момент проведения исследования. Однако, учитывая малое число наблюдений, данное предположение должно быть проверено на более объемной выборке [10]. В целом опубликованы единичные исследования, посвященные клинической значимости иммунных клеток в развитии дедифференцированной хондросаркомы [15]. Мы подтвердили данные литературы, согласно которым доминирующая популяция иммунных клеток опухолевой стромы – макрофаги [10]. Наибольшее число макрофагов в дедифференцированном компоненте опухоли выявлено в том случае, когда дедифференцированный компонент представлен недифференцированной саркомой. Отметим также, что высокая макрофагальная инфильтрация дедифференцированной хондросаркомы имела тенденцию к неблагоприятному течению заболевания, что характерно для большинства солидных опухолей [16]. В нашем исследовании содержание макрофагов в строме опухоли прямо положительно коррелировало с экспрессией PD-L1 как в хондроидном, так и в дедифференцированном компонентах опухоли, а также с содержанием Т-клеток, что может указывать на иммуногенность данных



опухолей и их потенциальную чувствительность к ингибиторам контрольных точек.

К ограничениям нашего исследования следует отнести небольшой размер выборки, ретроспективный характер работы и отсутствие информации о проводимой в дальнейшем терапии и ее эффективности.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках дедифференцированной хондросаркомы, особенно в дедифференцированном компоненте, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и снижением

выживаемости пациентов. Анализ иммунного микроокружения выявил различное содержание макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, при этом высокая инфильтрация макрофагами может указывать на агрессивное течение опухоли. Корреляция между уровнем PU.1⁺-клеток, экспрессией PD-L1 и инфильтрацией Т-клетками свидетельствует о сложных механизмах взаимодействия опухоли с иммунной системой. Полученные данные подчеркивают значимость экспрессии PD-L1 и макрофагальной инфильтрации в развитии дедифференцированной хондросаркомы и необходимость дальнейших исследований их роли в прогнозе и терапии заболевания. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Н.Е. Кушлинский – концепция исследования, утверждение итогового варианта рукописи; О.В. Ковалева, А.Н. Грачев – анализ полученных данных, написание текста; И.В. Булычева, Д.В. Рогожин – сбор клинического материала, гистологическое исследование опухолей, редактирование рукописи; П.Л. Прищеп – анализ историй болезни и данных литературы. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Список литературы / References

- Zajac W, Drózdź J, Kisielewska W, Karwowska W, Dudzisz-Śledź M, Zajac AE, Borkowska A, Szumera-Ciećkiewicz A, Szostakowski B, Rutkowski P, Czarnecka AM. Dedifferentiated chondrosarcoma from molecular pathology to current treatment and clinical trials. *Cancers (Basel)*. 2023;15(15):3924. doi: 10.3390/cancers15153924.
- Dehner CA, Maloney N, Amini B, Jennings JW, McDonald DJ, Wang WL, Chrisinger JSA. Dedifferentiated chondrosarcoma with minimal or small dedifferentiated component. *Mod Pathol*. 2022;35(7):922–928. doi: 10.1038/s41379-022-01008-8.
- Liu C, Xi Y, Li M, Jiao Q, Zhang H, Yang Q, Yao W. Dedifferentiated chondrosarcoma: Radiological features, prognostic factors and survival statistics in 23 patients. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173665. doi: 10.1371/journal.pone.0173665.
- Tsukamoto S, Mavrogenis AF, Nitta Y, Righi A, Masunaga T, Honoki K, Fujii H, Kido A, Tanaka Y, Tanaka Y, Errani C. A Systematic review of adjuvant chemotherapy in localized dedifferentiated chondrosarcoma. *Curr Oncol*. 2024;31(1):566–578. doi: 10.3390/curroncol31010040.
- Sakamoto A. The molecular pathogenesis of dedifferentiated chondrosarcoma. *Indian J Orthop*. 2014;48(3):262–265. doi: 10.4103/0019-5413.132506.
- Walter SG, Knöll P, Eysel P, Quaas A, Gaisendrees C, Nißler R, Hieggelke L. Molecular in-depth characterization of chondrosarcoma for current and future targeted therapies. *Cancers (Basel)*. 2023;15(9):2556. doi: 10.3390/cancers15092556.
- Kostine M, Cleven AH, de Miranda NF, Italiano A, Cleton-Jansen AM, Bovée JV. Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Mod Pathol*. 2016;29(9):1028–1037. doi: 10.1038/modpathol.2016.108.
- Zajac AE, Czarnecka AM, Rutkowski P. The Role of macrophages in sarcoma tumor microenvironment and treatment. *Cancers (Basel)*. 2023;15(21):5294. doi: 10.3390/cancers15215294.
- Saleh R, Elkord E. FoxP3⁺ T regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Cancer Lett*. 2020;490:174–185. doi: 10.1016/j.canlet.2020.07.022.
- Iseulys R, Anne GB, Corinne B, Gonzague DBP, Marie K, Jean-Yves B, Aurélie D. The immune landscape of chondrosarcoma reveals an immunosuppressive environment in the dedifferentiated subtypes and exposes CSFR1+ macrophages as a promising therapeutic target. *J Bone Oncol*. 2019;20:100271. doi: 10.1016/j.jbo.2019.100271.
- Zhang Y, Chen Y, Papakonstantinou A, Tsagkosis P, Linder-Stragliotto C, Haglund F. Evaluation of PD-L1 expression in undifferentiated pleomorphic sarcomas, liposarcomas and chondrosarcomas. *Biomolecules*. 2022;12(2):292. doi: 10.3390/biom12020292.
- Nathenson MJ, Conley AP, Sausville E. Immunotherapy: A new (and old) approach to treatment of soft tissue and bone sarcomas. *Oncologist*. 2018;23(1):71–83. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0025.
- Cohen-Nowak AJ, Dressler DB, Rock A, Mojica K, Woo D, Zuckerman LM, Chow W, Agulnik M. Role of immunotherapy in chondrosarcoma: A case report and review of the literature. *Ther Adv Med Oncol*. 2023;15:17588359231199877. doi: 10.1177/17588359231199877.
- Panagi M, Pilavaki P, Constantinidou A, Stylianopoulos T. Immunotherapy in soft tissue and bone sarcoma: Unraveling the barriers to effectiveness. *Theranostics*. 2022;12(14):6106–6129. doi: 10.7150/thno.72800.
- Nota SPFT, Al-Sukaini A, Patel SS, Sabbatino F, Nielsen GP, Deshpande V, Yearley JH, Ferrone S, Wang X, Schwab JH. High TIL, HLA, and immune checkpoint expression in conventional high-grade and dedifferentiated chondrosarcoma and poor clinical course of the disease. *Front Oncol*. 2021;11:598001. doi: 10.3389/fonc.2021.598001.
- Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):78. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z.



Immunohistochemical analysis of PD-L1, CD4, CD8, CD20, and PU.1 expression in a dedifferentiated chondrosarcoma: the clinical and prognostic value

O.V. Kovaleva¹ • I.V. Boulytcheva¹ • D.V. Rogozhin¹ •
A.N. Gratchev¹ • P.L. Prishchep¹ • N.E. Kushlinskii¹

Background: Dedifferentiated chondrosarcoma (DDCS) is a rare and extremely aggressive variant of mesenchymal bone tumors, with a biphasic structure represented by the classical chondrosarcoma elements, usually of low or intermediate grade, combined with a sharp transition to a highly malignant (high grade) non-cartilaginous sarcoma. The DDCS is associated with a poor outcome, low effectiveness of medical therapy and high mortality rates. One of promising areas of treatment for these tumors is immunotherapy, which requires a more profound understanding of the immunological status of the tumor and composition of its microenvironment.

Aim: To analyze the expression of PD-L1, CD4, CD8, CD20 and PU.1 markers in the inflammatory infiltrate of the tumor stroma in the samples of primary DDCS to search for new treatment and prognostic targets, as well as potential predictors of treatment efficacy.

Methods: We retrospectively analyzed the results of the immunohistochemical (IHC) studies of the tumor samples obtained from 42 patients with DDCS (18 men and 24 women aged 24 to 94 years; median age 65 years). The study samples of DDCS demonstrated two components, namely, well-differentiated chondrosarcoma and poorly differentiated non-cartilaginous sarcoma represented by pleomorphic undifferentiated sarcoma (n = 33), osteosarcoma (n = 6), rhabdomyosarcoma (n = 2) and angiosarcoma (n = 1). The IHC analysis was performed in the automated mode with a Ventana Bench Mark ULTRA IHC stainer (Ventana Medical Systems, USA) using an optimized protocol and anti-PD-L1 antibodies (clone SP142) and in the manual mode for staining with anti-PU.1, CD4, CD8 and CD20 antibodies. The PD-L1 expression was assessed separately in the dedifferentiated and chondroid components of the tumor. Samples containing PD-L1 expressing lymphocytes were counted separately.

Results: PD-L1 was expressed in the dedifferentiated component of 40% of the cases (17/42), in the chondroid component of 26% of the cases (11/42), and in both components in 17% of the cases (7/42). There was no association between PD-L1 expression in different tumor components and clinical

and morphological characteristics of the disease. Median survival of the PD-L1 non-expressing patients was 68.6 months, while of those with the expression 7.7 months (p = 0.096). The mean macrophage count in the dedifferentiated tumor component was $17.3 \pm 12.8\%$, that of CD4⁺ T-cells $4 \pm 3.5\%$, CD8⁺ T-cells $4 \pm 2.4\%$, and B cells $6.7 \pm 3.8\%$. The analysis of an association between immune cell counts and clinical and morphological characteristics showed that higher tumor infiltration with B-cells was typical for an earlier stage of the disease (p = 0.045). The stromal markers studied did not have any prognostic significance, however there was a trend towards an unfavorable course of the disease (p = 0.112) for those with high macrophagal infiltration of the DDCS samples. The PU.1⁺ cell counts in the tumor stroma positively correlated with PD-L1 expression both in the chondroid (r = 0.357, p = 0.028) and in the dedifferentiated tumor components (r = 0.343, p = 0.033), as well as with the T cell numbers (r = 0.365, p = 0.026).

Conclusion: The results of our IHC studies on the expression of PD-L1, CD4, CD8, CD20, and PU.1 indicate the clinical and prognostic significance of the immune microenvironment of DDCS, opening additional prospects for predicting the disease outcomes and development of immune therapies. Nevertheless, a more precise delineation of the clinical value of the identified markers requires that studies on larger patient samples should be continued.

Key words: dedifferentiated chondrosarcoma, PD-L1, CD4, CD8, CD20, PU.1 expression, prognosis, immune therapy

For citation: Kovaleva OV, Boulytcheva IV, Rogozhin DV, Gratchev AN, Prishchep PL, Kushlinskii NE. Immunohistochemical analysis of PD-L1, CD4, CD8, CD20, and PU.1 expression in a dedifferentiated chondrosarcoma: the clinical and prognostic value. *Almanac of Clinical Medicine*. 2025;53(2). doi: 10.18786/2072-0505-2024-53-006

Received 26 September 2024; revised 20 March 2025; accepted 27 March 2025; published online 9 April 2025

Olga V. Kovaleva – Doctor of Biol. Sci., Senior Research Fellow, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>. E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Irena V. Boulytcheva – MD, PhD, Pathologist, Pathological Anatomy Department¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7592-4249> ✉ Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115522, Russian Federation. E-mail: irena@boulytcheva.com

Dmitrii V. Rogozhin – MD, PhD, Head of Department of Morphological and Molecular Genetic Diagnostics of Tumors¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>. E-mail: pathol.777@mail.ru

Alexei N. Gratchev – Doctor of Biol. Sci., Head of Laboratory of Tumor Stromal Cell Biology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>. E-mail: alexei.gratchev@gmail.com

Polina L. Prishchep – Postgraduate Student, Pediatric Oncologist, Pediatric Oncology Department No. 2 (Chemotherapy of Tumors of the Musculoskeletal System), Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology named after Academician of Russ. Acad. Med. Sci. L.A. Durnov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0810-8238>. E-mail: paulig92@mail.ru

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Scientific Director of the Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

N.E. Kushlinskii, the research concept, approval of the final version of the manuscript; O.V. Kovaleva, A.N. Gratchev, data analysis, text writing; I.V. Boulytcheva, D.V. Rogozhin, clinical data collection, histological studies, text editing; P.L. Prishchep, analysis of the patients' medical files and literature data. All the authors have read and approved the final version of the article prior to publication, agree to be accountable for all aspects of the work, and warrant that questions related to the accuracy and integrity of all parts of the work have been appropriately reviewed and resolved by them.

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation