

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Назарова Петра Григорьевича на диссертацию Пипиа Нино Петровны «Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в опухолевом микроокружении *in vitro*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.12 – онкология, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность проблемы

Саркомы мягких тканей (СМТ) – гетерогенная группа злокачественных новообразований с быстрым прогрессирующим, ранним метастазированием и развитием рецидивов после хирургической резекции. Эффективность стандартной химиотерапии невысока, применение новых лекарственных препаратов не позволяет достичь длительной ремиссии и излечения. Это диктует необходимость разработки новых подходов к лечению сарком мягких тканей. В настоящее время активно изучается взаимодействие опухоли с иммунной системой, которое происходит в опухолевом микроокружении. Воздействие на иммунокомпетентные клетки, находящиеся в микроокружении СМТ, в том числе, на эффекторные Т-лимфоциты, может стать эффективной стратегией для элиминации клонов злокачественных клеток, которые выжили после стандартного химиотерапевтического лечения. Показано, что введение аутологичных дендритных клеток (ДК), которые презентуют опухолеассоциированные антигены, усиливает противоопухолевый иммунный ответ. Однако эффективность иммунотерапии дендритноклеточными вакцинами всецело зависит от состояния клеток иммунной системы, поэтому создание моделей опухолевого микроокружения СМТ *in vitro* позволяет повысить эффективность лечения больных этими злокачественными новообразованиями. Таким образом, актуальность изучения опухолевого микроокружения и его моделирования *in vitro* для

улучшения терапевтических подходов лечения больных метастатическими СМТ определила цель и задачи данного диссертационного исследования.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые разработаны экспериментальные модели опухолевого микроокружения *in vitro*, основанные на взаимодействии клеточных культур сарком мягких тканей (СМТ) с клетками иммунной системы, для чего были использованы современные технологии наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence. В исследовании определяли большое число цитокинов и других продуктов опухолевых клеток при культивировании *in vitro* и исследовали взаимосвязи между этими биологическими маркерами. Кроме того, показана зависимость цитотоксической и супрессорной активности лимфоцитов, а также рецепторного статуса регуляторных Т-лимфоцитов больных саркома мягких тканей в зависимости от активности опухолевого процесса и применения противоопухолевой ДК-вакцины «CaTeVac».

Практическая значимость исследования

Результатом данного диссертационного исследования стало выявление сложных взаимосвязей клеток иммунного микроокружения, опухолевых клеток сарком мягких тканей и биологически активных веществ, продуцируемых ими *in vitro*. Показана роль взаимодействия этих компонентов опухолевого микроокружения в противоопухолевом ответе *in vivo* и связь с эффективностью иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» собственного производства. Полученные результаты позволили оптимизировать лечение метастатических форм СМТ, прогрессирующих после стандартной химиотерапии «первой линии», и за счет этого, путем индивидуализации иммунотерапии «второй» и последующих линий терапии, увеличить общую выживаемость данной категории больных.

Оценка структуры и содержания работы

Работа построена по традиционному плану и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы»,

главы, посвященной результатам проведенного исследования, заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель включает 272 публикаций отечественных и зарубежных авторов. Объем диссертации составляет 168 страниц, текст проиллюстрирован 17 таблицами и 62 рисунками.

Введение включает актуальность темы исследования, степень разработанности темы, цель и задачи работы, научную новизну, научную и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, а также степень достоверности и апробации результатов.

В **главе 1** (обзор литературы) отражены современные представления о биологии сарком мягких тканей, а также причины резистентности к различным видам лечения. Приводятся современные сведения о составе опухолевого микроокружения с акцентом на клетки иммунной системы, а также о значении этих клеток в элиминации или выживании и росте злокачественной опухоли. Дана общая характеристика СМТ, рассматриваются методы лечения данного заболевания, в том числе, иммунотерапевтические. Обзор литературы исчерпывающий, написан литературным языком и демонстрирует глубокое понимание автором исследуемого вопроса. Глубокий анализ проблемы обосновывает формулировку цели и задач исследования, а также подходов к их решению.

В **главе 2** приводится характеристика 124 больных с СМТ, включенных в исследование. Описана методика приготовления аутологичной ДК-вакцины и лабораторные методы, используемые для изучения клеток иммунной системы у больных с саркомами мягких тканей. Описаны методики получения клеточных культур СМТ, определения пролиферативной активности и индивидуальной химиочувствительности этих культур, а также анализа содержания хемокинов и онкомаркеров в их супернатантах. Приведено описание методики моделирования опухолевого микроокружения *in vitro*. Детально описаны многие методы статистической обработки данных, использованные для анализа полученного материала.

В главе 3 приводятся результаты диссертационного исследования. Изучение чувствительности индивидуальных культур клеток метастатических сарком мягких тканей к эпирубицину и ифосфамиду в различных концентрациях в аналитической системе CELL-IQ выявило статистически значимые количественные изменения пролиферативной активности клеток СМТ в присутствии исследуемых препаратов. Полученные данные указывают на чувствительность некоторых клеточных культур СМТ к химиотерапевтическим препаратам, в то время другие культуры демонстрировали химиорезистентность, что нашло отражение в клиническом ответе на проводимое лечение. Этот подход является прообразом исследования, которое может быть рекомендовано для рутинной оценки индивидуальной химиочувствительности опухолевых клеток при персональном подборе препаратов конкретным больным.

В результате исследования создана *in vitro* модель процесса реализации эффекторной функции иммунной системы и опухоль-опосредованной иммуносупрессии в аналитической системе xCELLigence. Показано увеличение пролиферативной активности злокачественных клеток в присутствии клеток иммунной системы, что подтверждает теорию иммуноредактирования опухоли и свидетельствует о поляризации клеток микроокружения в направлении иммуносупрессии. Подтверждена способность интерлейкина-2 усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Результаты работы свидетельствуют о том, что моделирование иммунного опухолевого микроокружения *in vitro* может стать частью персонализированного подхода к иммунотерапии злокачественных новообразований.

В клинической части исследования было показано, что у пациентов с прогрессированием заболевания наблюдалось повышение числа регуляторных Т-лимфоцитов в крови в процессе лечения. Выявлена тенденция к увеличению абсолютного содержания Т-лимфоцитов и НК-клеток в циркуляции, а также к сохранению нормального количества В-

лимфоцитов у больных со стабилизацией опухолевого процесса и снижение количества Т- и В-лимфоцитов при прогрессировании. Установлена волнообразная динамика содержания Т-хелперов и ЦТЛ в процессе ДК-вакцинотерапии у больных со стабилизацией заболевания. Показано повышение активности этих клеток при уменьшении их количества. Установлено, что иммунотерапия ДК-вакциной «CaTeVac» увеличивает общую выживаемость пациентов по сравнению со стандартной химиотерапией во второй и последующих линиях при саркомах мягких тканей. Также выявлено снижение риска смерти у больных СМТ, получавших «CaTeVac», по сравнению с контрольной группой. Эффект иммунотерапии связывается с активацией эффекторной функции лимфоцитов и противоопухолевым иммунным ответом. Благодаря полученным результатам возможно проведение рандомизированных клинических исследований для подтверждения эквивалентности или превосходства изученного метода иммунотерапии над другими вариантами системного лечения метастатических СМТ.

При анализе иммуносупрессивного потенциала регуляторных Т-лимфоцитов установлено увеличение относительного содержания этих клеток, экспрессирующих CCR10, CCR4 и нейропилин-1, у больных с прогрессированием заболевания. Выявлена корреляция экспрессии этих молекул с продукцией VEGF и CCL2 опухолевыми клетками метастатической СМТ. Полученные данные свидетельствуют о наличии системы направленной миграции регуляторных Т-лимфоцитов в микроокружение опухоли, а также о связи этой системы с прогрессированием опухолевого процесса.

Кроме того, результаты мультиплексного анализа онкомаркеров в супернатантах клеточных культур СМТ позволили обнаружить высокий уровень секреции HGF, VEGF-A, ангиопоэтина-2, IL-6 и IL-8, фоллистатина, PAI-1 и G-CSF этими клетками. В главе рассмотрено влияние данных молекул на активность ДК и ЦТЛ, а также на формирование

иммуносупрессивного микроокружения опухоли. Выявлена корреляция между продукцией некоторых онкомаркеров, также показана связь между секреторным профилем *in vitro* и формированием иммунного ответа *in vivo*.

Таким образом, результаты данного диссертационного исследования свидетельствуют о наличии многоуровневого взаимодействия опухолевых клеток, клеточных компонентов иммунного микроокружения и секретируемых ими биологически активных молекул, которое находит отражение в формировании противоопухолевого иммунного ответа и в реализации клинического эффекта ДК-вакцины «CaTeVac».

Исходя из полученных результатов, в диссертации сформулированы **5 выводов**, соответствующих задачам исследования. Выводы данной работы объективны, корректны и целиком вытекают из ее содержания. Диссертация заканчивается **практическими рекомендациями**, в которых на основании результатов работы сформулированы способы увеличения эффективности лечения больных с саркомами мягких тканей.

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и в 17 опубликованных работах, 4 из которых опубликованы в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК. Основные результаты неоднократно докладывались на научных конференциях. Принципиальных замечаний по существу и оформлению работы нет.

Заключение

Диссертационная работа Пипиа Нино Петровны «Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в опухолевом микроокружении *in vitro*», предоставленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для теоретической и клинической онкологии и иммунологии. Современный дизайн исследования, адекватные методы его исполнения, использование соответствующих методов статической обработки, а также новизна полученных результатов и их

научная трактовка позволяют заключить, что диссертационная работа Пипиа Н.П. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 №335), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор данной диссертационной работы, Пипиа Нино Петровна, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

заведующий отделом иммунологии

ФГБУ «Институт экспериментальной медицины»,

доктор медицинских наук, профессор

П.Г. Назаров

«22» ноября 2018 г.

Адрес организации: ФГБУ «НИИЭМ», 197376, Санкт-Петербург, ул.

Академика Павлова, д. 12, тел.: +7-812-234-68-68, факс: +7-812-234-94-89, e-

mail: iem@iemrams.ru

Подпись Назарова П.Г.
Удостоверяется
Нач. отдела УП и Д ФГБНУ «ИЭМ»



Назарова О.В.