

Отзыв официального оппонента

д.м.н., профессора Орловой Рашиды Вахидовны на диссертацию Пипиа Нино Петровны на тему: «Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в опухолевом микроокружении *in vitro*», представляемую к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.01.12 – онкология, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность проблемы

Диссертационная работа Пипиа Н.П. посвящена проблеме изучения опухолевого микроокружения сарком мягких тканей с позиций повышения эффективности лечения метастатической формы этих опухолей путем индивидуализации терапевтических подходов. Саркомы мягких тканей (СМТ) представляют собой агрессивные злокачественные новообразования из внескелетных мягких и соединительных тканей. При наличии большого количества гистологических подтипов эти опухоли объединяет раннее развитие метастазов и склонность к рецидивам после хирургического лечения. У пациентов с рецидивирующими и метастатическими формами сарком мягких тканей стандартная химиотерапия малоэффективна, в связи с чем существует необходимость разработки новых методов лечения. Согласно современным представлениям, важную роль в чувствительности к различным терапевтическим подходам играет опухолевое микроокружение, которое изменяется под действием химиотерапии, таргетной и иммунотерапии. Изучение микроокружения СМТ и эффекторных клеток иммунной системы позволит разработать иммунотерапевтические подходы для лечения больных с метастатическими саркомами мягких тканей, прогрессирующими после стандартной химиотерапии «первой линии».

Актуальность проблемы поиска мишеней для терапии СМТ не только на самих злокачественных клетках, но и в опухолевом микроокружении, а

также необходимость индивидуализации лечения больных этими опухолями для повышения его эффективности определили цели и задачи данного диссертационного исследования.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе Пипиа Н.П. созданы экспериментальные *in vitro* модели опухолевого микроокружения СМТ с использованием систем наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence. Модели позволяют оценить взаимодействие метастатических культур сарком мягких тканей с клетками иммунной системы.

Выявлены взаимосвязи биологических маркеров, которые продуцируются клетками СМТ при их культивировании *in vitro*.

Изучены рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов, выделенных из периферической крови больных метастатическими СМТ, а также цитотоксическая и супрессорная активность лимфоцитов этих пациентов. Показана связь данных показателей с активностью опухолевого процесса и с иммунотерапией противоопухолевой дендритноклеточной вакциной собственного производства «CaTeVac».

Практическая значимость исследования

В рецензируемой работе были определены сложные взаимосвязи клеток иммунного микроокружения сарком мягких тканей и опухолевых клеток, а также продуцируемых ими биологически активных веществ *in vitro*. Данные взаимосвязи получили отражение в формировании иммунного ответа *in vivo*, который напрямую связан с эффективностью иммунотерапии вакциной «CaTeVac» собственного производства.

Также результаты данного диссертационного исследования позволили оптимизировать лечение метастатических форм СМТ, которые прогрессировали после стандартной химиотерапии «первой линии». С

помощью индивидуализации иммунотерапии «второй» и последующих линий терапии удалось увеличить общую выживаемость этих больных.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертация Пипиа Н.П. написана в классическом стиле, изложена на 168 страницах компьютерной верстки машинописного текста. Диссертационная работа включает список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, описание материалов и методов исследования и главу, посвященную результатам исследования), заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. В библиографическом указателе 272 источников, из них 29 отечественных и 243 зарубежных публикаций. Диссертация содержит 17 таблиц и иллюстрирована 62 рисунками.

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 4 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов кандидатских диссертаций.

Во введении отражены актуальность и степень разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, определены научная новизна, научная и практическая значимость, коротко описаны материалы и методы исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, и степень достоверности и апробации результатов.

В первой главе выполнен обзор научной литературы, раскрывающий современное состояние изучаемой проблемы. Обзор литературы написан самостоятельно, в нем приводится всесторонний анализ существующих данных о микроокружении опухолей, в частности, сарком мягких тканей. Особое внимание уделяется иммунному микроокружению и его взаимодействию с опухолевыми клетками, противоопухолевому иммунному ответу и процессу иммуноредактирования опухоли. Подробно рассматриваются клетки и биологически активные молекулы, участвующие в этом взаимодействии. Кроме того, в обзоре приводится общая характеристика сарком мягких тканей, сведения об их эпидемиологии и классификации, а также рассмотрена

эффективность различных методов лечения этого злокачественного новообразования. Рассмотрено место иммунотерапии в лечении СМТ. Глубокий анализ проблемы позволил четко сформулировать цель и задачи исследования. Следует отметить, что обзор написан хорошим литературным языком.

В главе 2 представлены данные 124 пациентов с саркомами мягких тканей, которые были включены в исследование. Приведены сведения о гистологических подтипах опухолей и проведенной терапии. Автор описывает методику приготовления аутологичной дендритноклеточной вакцины и лабораторные методы, применяемые для оценки клеток иммунной системы у больных, включенных в исследование. Также дано описание методики получения клеточных культур СМТ, определения их пролиферативной активности и индивидуальной химиочувствительности, анализа содержания хемокинов и онкомаркеров в супернатантах опухолевых культур. Статистическую обработку данных проводили с использованием SPSS 23, R и Microsoft Excel 2010, применяли адекватные статистические методы.

В главе 3 представлены непосредственно результаты диссертационного исследования Пипиа Н.П. В работе выявлен различный потенциал пролиферативной активности клеточных культур СМТ *in vitro*. Данные, полученные при изучении чувствительности культур опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, позволили выявить химиочувствительные и химиорезистентные культуры СМТ. Результаты, полученные *in vitro*, отражали клиническую картину, в связи с чем данный метод может быть использован для оптимизации лечения больных метастатическими саркомами мягких тканей.

В диссертационном исследовании разработана модель взаимодействия иммунной системы и клеток СМТ *in vitro*, на которой продемонстрированы процессы иммуноредактирования опухоли и поляризации клеток микроокружения в направлении иммуносупрессии, а также усиления

противоопухолевого ответа в присутствии ИЛ-2. Добавление в систему аутологичных дендритных клеток позволяет оценить эффективность этого метода иммунотерапии у конкретного больного.

В клиническую часть исследования были включены пациенты с СМТ, получавшие только стандартную химиотерапию 2-й и последующих линии, и больные, у которых одним из этапов являлась иммунотерапия РГА+ ДК-вакциной «CaTeVac». Выявлены закономерности динамики содержания и активности субпопуляций клеток иммунной системы (В- и Т-лимфоцитов, в том числе, Т-хелперов, ЦТЛ и Т-регуляторных лимфоцитов, а также НК-клеток) при прогрессировании и стабилизации опухолевого процесса на фоне иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac». В результате исследования установлено увеличение общей выживаемости и снижение риска смерти при использовании ДК-вакцины по сравнению со стандартным лечением во 2-й и последующих линиях терапии. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение противоопухолевой вакцины «CaTeVac» может быть рассмотрено в качестве основного вида лечения в 1-й или во 2-й линии терапии у больных метастатическими саркомами мягких тканей с условно индолентным течением заболевания, имеющимися противопоказаниями к проведению полихимиотерапии, или как дополнительная опция в поддерживающем режиме к стандартной или метрономной химиотерапии при быстром прогрессировании заболевания.

Также в третьей главе приведены результаты оценки иммуносупрессивного потенциала Т-регуляторных лимфоцитов и его связи с прогрессированием опухолевого процесса у больных метастатическими СМТ. Показано, что при прогрессировании заболевания наблюдается снижение абсолютного количества НК-клеток, сохраняется количество CD8+ Т-лимфоцитов, а также повышено содержание Treg, экспрессирующих CCR10, CCR4 и нейропипин-1. Кроме того, в работе установлена прямая корреляция высокой силы между экспрессией данных маркеров и секрецией опухолевыми клетками VEGF и CCL2, что указывает на наличие системы

направленной миграции лимфоцитов с иммуносупрессивным потенциалом в опухолевое микроокружение при прогрессировании опухолевого процесса.

В диссертации приводятся результаты изучения секрета клеток сарком мягких тканей. Обнаружена секреция ряда онкомаркеров, которые задействованы в формировании иммунного ответа или иммуносупрессии путем влияния на дендритные клетки, эффекторные лимфоциты и другие компоненты микроокружения опухоли. Выявлена корреляция между секрецией ряда онкомаркеров, а также связь их продукции с эффективностью химиотерапии и иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac».

Диссертация заканчивается 5 выводами, соответствующими задачам исследования. Выводы логичны, математически аргументированы, сформулированы точно и лаконично и полностью следуют из результатов диссертационной работы. На основе полученных результатов сформулированы практические рекомендации, направленные на повышение эффективности лечения больных метастатическими СМТ.

Автореферат отражает и полностью соответствует основным положениям диссертации. Основные результаты неоднократно докладывались на научных конференциях. Принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет.

В качестве дискуссии :

1. В тексте диссертации и автореферате выделены больные в группы по факту использования лекарственных средств – химиотерапия -1 группа, ДК-вакцина – 2 группа. Почему при представлении в таблице 1 в группе 2 есть больные, которые получали химиотерапию?
2. В какой линии терапии (2-ой или 3-ей линии) наиболее эффективна ДК вакцина для больных СМТ с точки зрения частоты объективного ответа и продолжительности жизни без прогрессирования?

3. Какой клинический портрет больного, которому вы рекомендуете ДК вакцину?
4. Для назначения ДК вакцины, целесообразно ли определять чувствительность *in vitro*? Эффект *in vivo* прямо пропорционален эффекту *in vitro*?

Заключение

Диссертационное исследование Пипиа Нино Петровны «Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в опухолевом микроокружении *in vitro*», представляемое на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.12 – онкология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, является законченной научно-квалификационной работой. В данной работе решены актуальные задачи персонализации и повышения эффективности лечения метастатических сарком мягких тканей с помощью моделирования опухолевого микроокружения *in vitro* и применения иммунотерапии аутологичной ДК-вакцины для активации эффекторной функции лимфоцитов. Внедрение результатов диссертационной работы в практику поможет увеличить эффективность лечения больных с саркомами мягких тканей.

Следовательно, представленная работа полностью 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 кандидатским диссертациям, а ее автор Пипиа Нино Петровна безусловно заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук.

Официальный оппонент, заведующая кафедрой онкологии медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор



Орлова Р.В.

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 7-9, тел: 8(812)328-20-00

Подпись д.м.н., профессора Орловой Р.В. «Заверяю»:

Зам. начальника
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
Е. П. КРАСНОВА

26» ноября

2018 г.



Краснова Е.П.
26.11.2018

Документ подготовлен в порядке исполнения трудовых обязанностей