

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе федерального  
государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет им.  
академика И.П. Павлова» Министерства

здравоохранения Российской Федерации,  
академик РАН, д.м.н., профессор

  
Ю.С.Полушин

2018 года



### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Пипиа Нино Петровны на тему: «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 и 14.03.09 клиническая иммунология, аллергология.

### Актуальность темы диссертации

Саркомы мягких тканей (СМТ) – это группа достаточно редких опухолей мезенхимального происхождения, которые отличаются чрезвычайной гистологической гетерогенностью, ассоциированной с множественными генетическими аномалиями. В настоящее время известно более 50 подтипов СМТ, и каждый подтип уникален по своей биологии, клиническому поведению и ответу на терапию. Эти особенности создают трудности в их идентификации, классификации и разработке новых методов

лечения. В тоже время, статистические данные указывают на необходимость повышенного внимания к проблеме заболеваемости СМТ. Согласно публикации А.Д. Каприна и соавт. (2018) в России в 2016 году опухоли соединительной и других мягких тканей вошли в число наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у больных в возрасте до 30 лет, и индекс накопления контингента больных опухолями данной нозологической группы с 2011 по 2017 год увеличился с 8,3 до 9,6.

Значительный прогресс в изучении биологии солидных опухолей способствовал развитию принципиально новых подходов к осмыслению взаимоотношений опухоли, иммунной системы и опухолевого микроокружения, которое представляет собой сложную динамическую среду, где злокачественные и неопухолевые клетки взаимодействуют между собой. В настоящее время сформировалось представление о важной роли этих взаимодействий в опухолевом процессе и в ответе на противоопухолевую терапию. В связи с этим актуальным становится изучение иммунобиологических феноменов, которые наблюдаются у пациентов СМТ в процессе химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии, а также определение значимых мишеней для терапии на молекулярном уровне не только при воздействии на опухолевые клетки, но и на компоненты опухолевого микроокружения. Таким образом, становится понятно, что создание моделей опухолевого микроокружения *in vitro* и их экспериментальное и клиническое обоснование чрезвычайно актуально в контексте разработки способов повышения эффективности и индивидуализации лечения больных метастатическими формами СМТ, что легло в основу данного диссертационного исследования и определило цель работы.

### **Научная новизна**

Выполненная работа является комплексным, многофакторным исследованием, которое позволило создать экспериментальные модели опухолевого микроокружения *in vitro* на основе изучения взаимодействия

метастатических культур СМТ с клетками иммунной системы в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence, определить взаимосвязи биологических маркеров, продуцируемых опухолевыми клетками СМТ при культивировании *in vitro*. Изучена цитотоксическая и супрессорная активность лимфоцитов и рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов периферической крови больных СМТ в зависимости от активности опухолевого процесса, а также в процессе применения противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac».

### **Научно-практическая значимость**

Проведённое исследование позволило научно обосновать и объективно оценить с помощью моделирования *in vitro* сложные взаимосвязи клеток иммунного микроокружения СМТ, опухолевых клеток и продуцируемых ими биологически активных веществ, что получило отражение в формировании иммунного ответа и эффективности иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» *in vivo*. Выявленные функциональные особенности микроокружения СМТ имеют фундаментальное значение для рассмотрения новых аспектов поведения клеток иммунной системы в условиях опухолевого роста и разработки новых терапевтических подходов к лечению СМТ.

Практическое значение полученных в настоящем исследовании результатов заключается в том, что основные итоги работы позволили оптимизировать лечение метастатических форм СМТ, прогрессирующих после стандартной химиотерапии «первой линии», и увеличить общую выживаемость с помощью индивидуализации иммунотерапии «второй» и последующих линий терапии. Проведенная работа позволила сформулировать практические рекомендации, выполнение которых будет способствовать в будущем оптимизации оценки течения опухолевого процесса и определения эффективности проводимой иммунотерапии СМТ.

## **Достоверность и обоснованность**

Цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы ясно и убедительно. Автором было проведено моделирование опухолевого микроокружения СМТ, которое позволило установить, что процессы, наблюдаемые *in vitro*, отражают развитие событий, максимально приближенных к наблюдаемым в клинической практике, и продемонстрировать сложную взаимосвязь клеток иммунного микроокружения СМТ, опухолевых клеток и продуцируемых ими биологически активных веществ, а также экстраполировать противоопухолевую активность дендритно-клеточной вакцины на ситуацию «*in vivo*».

Проведенное исследование позволило выявить увеличение общей выживаемости больных распространенными или метастатическими формами СМТ при использовании противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac» во «второй» и последующих линиях лекарственного лечения.

Представленные в работе теоретические положения, выводы и методические подходы основаны на глубокой и тщательной проработке значительного ретроспективного и проспективного материала с применением комплекса современных статистических методов, адекватных поставленным задачам. Значительный объем данных, полученный при непосредственном участии автора, убеждает в обоснованности и достоверности полученных результатов.

## **Оценка содержания работы**

Диссертация написана согласно современным требованиям и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, раздела, содержащего собственные результаты и обсуждение, заключения, выводов и списка литературы. Данные исследования изложены на 168 страницах текста. Работа содержит 17 таблиц

и 62 рисунка. Список литературы включает 272 источника, в том числе 29 отечественных и 243 иностранных авторов.

**Во введении** автор детально определяет актуальность исследования, степень разработанности темы, формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, представляет степень достоверности и результаты апробации работы, а также положения, выносимые на защиту.

**Литературный обзор** (глава 1), представленный на 24 стр., содержит подробные сведения, касающиеся современных представлений о биологии СМТ и причинах их резистентности к различным видам лечения. Автор рассматривает аспекты существующей на сегодняшний день концепции опухолевого роста и роли микроокружения опухоли, дает представление об эпидемиологии СМТ, их классификации, стадировании, биологических характеристиках, представляет сведения о достижениях и существующих недостатках стандартных методов лечения СМТ, месте иммунотерапии в существующей системе терапевтических подходов.

Обзор литературы имеет скорее тезисный, чем описательный характер, но тем не менее автору удалось кратко и емко представить огромный материал, накопленный в научной литературе, посвященный исследованию опухолевого микроокружения, роли этих данных для клинической практики, и отразить основополагающие моменты, необходимые для понимания этой проблемы. В заключении автор, оперируя представленными сведениями, обосновывает актуальность темы исследования и логически подводит читателя к изложению полученных результатов.

Литературные данные описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений.

**Во второй главе** («Материалы и методы») дана клиническая характеристика больных, включенных в исследование, в том числе тех, чей биологический материал автор использовал в своем диссертационном

исследовании. В исследование было включено 124 пациента с распространенной формой СМТ, соответствующей III-IV стадии заболевания. Автор представил критерии отбора пациентов для исследования и для оценки клинической эффективности иммунотерапии. Подробно описаны методы приготовления аутологичной дендритно-клеточной вакцины, изучения клеток иммунной системы больных СМТ, получения культур клеток СМТ, иммуноферментного и мультиплексного анализа содержания биологически активных веществ в супернатантах клеточных культур, наблюдения за живыми клетками в системах Cell-IQ и xCELLigence. Описаны принципы клеточного моделирования *in vitro*, разработанные автором. Математический анализ полученных результатов был проведен с использованием пакета статистических программ SPSS 23.R for Windows который включал методы описательной статистики, критерий Шапиро-Уилка, хи-квадрат, тест Фишера. Были использованы коэффициент ранговой корреляции Спирмена, критерий Стьюдента, Манна-Уитни Краскела-Уоллиса. Анализ выживаемости был проведен на основе процедуры Каплата-Майера с использованием регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса и критерия Гехана-Бреслоу. Объем изученного материала и избранные методы статистического анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

**Третья глава** посвящена результатам собственных исследований, которые сопровождаются обсуждением в свете существующих научных положений и промежуточными выводами. Такая нестандартная подача материала имеет свои преимущества, так как позволяет сразу оценить важность и значимость полученных результатов. Автором была проведена работа по изучению возможностей прогнозирования реакции метастатических СМТ на химиотерапевтические агенты в аналитической системе долговременной фазово-контрастной микроскопии Cell-IQ и было показано, что изучение пролиферативной активности опухолевых клеток на основе этой технологии повышает информационную объективность анализа

их пролиферативного потенциала, что позволяет достоверно оценить количественные изменения их пролиферативной активности в период экспоненциального роста и при динамическом наблюдении за этими изменениями в присутствии различных концентраций химиопрепаратов. При моделировании автором опухолевого микроокружения путем воздействия зрелых дендритных клеток, мононуклеаров и различных цитокинов на первичные культуры и клеточные линии СМТ в аналитической системе xCELLigence было установлено, что данная модельная система позволяет получить важную информацию о механизмах реализации противоопухолевого эффекта ДК-вакцины при лечении СМТ. Таким образом, автору удалось показать, что оценка эффективности иммунотерапии *in vitro* с использованием культуры опухолевых клеток конкретного больного является мощным инструментом персонализированного подхода к лечению злокачественных новообразований. Проведенный автором математический анализ позволил продемонстрировать сложную взаимосвязь опухолевых клеток, клеток иммунного микроокружения СМТ и продуцируемых ими биологически активных веществ, что получило отражение в формировании иммунного ответа, эффективности химиотерапии и иммунотерапии дендритно-клеточной вакциной «CaTeVac» собственного производства.

Автором выявлена корреляция между продукцией опухолевыми клетками метастатических СМТ сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, С-С хемокинового лиганда CCL2 и экспрессией на регуляторных Т-лимфоцитах периферической крови нейропиллина-1 ( $r=0,93$ ,  $p=0,001$ ), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста VEGFR-2 ( $r=0,88$ ,  $p=0,007$ ), С-С хемокинового рецептора CCR4 ( $r=0,81$ ,  $p=0,024$ ). Было установлено, что при прогрессировании опухолевого процесса у больных СМТ статистически значимо снижается абсолютное содержание натуральных киллеров, увеличивается относительное число регуляторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR10,

CCR4, нейропилин-1, и отсутствуют статистически значимые изменения в абсолютном содержании цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Анализ клинической эффективности иммунотерапии дендритно-клеточной вакциной собственного производства «CaTeVac» показал, что активация эффекторной функции лимфоцитов на фоне ДК-вакцинации подтверждается снижением риска смерти в 2 раза у больных СМТ и увеличением общей выживаемости (34,5 мес.) по сравнению с контрольной группой пациентов, которые не получали «CaTeVac» в качестве системного лечения (25,7 мес.).

В обсуждении представлен подробный сравнительный анализ всей совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и детальное обсуждение результатов, что дает основания для формирования полноценных выводов.

**Выводы** диссертации объективны, достоверны и полностью соответствуют главным итогам проведенного исследования. Опубликованные научные работы и автореферат достаточно полно отражают содержание диссертации.

**Вопросы и замечания.** Замечаний принципиального характера по работе нет.

Вопрос. Можно ли использовать материал, полученный при трепан-биопсии сарком мягких тканей, для создания клеточных культур с целью оценки чувствительности к системной лекарственной терапии?

### **Внедрение результатов исследования**

По результатам представленного диссертационного исследования автором сформулированы практические рекомендации, которые используются в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России.

### **Рекомендации по внедрению результатов исследования**

Теоретические данные о биологической роли микроокружения СМТ в процессе прогрессирования опухоли могут быть включены в



образовательные программы высших медицинских учебных учреждений. Практические рекомендации по результатам исследования могут служить основой для внедрения данных технологий в клиническую практику медицинских учреждений онкологической направленности. Результаты работы могут служить основанием для планирования рандомизированных проспективных клинических исследований с целью подтверждения эквивалентности или превосходства иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» над другими вариантами системного лечения метастатических СМТ и изучения эффективности «CaTeVac» в адъювантном лечении больных СМТ в группах высокого риска прогрессирования.

### **Заключение**

Диссертация Пипиа Нино Петровны на тему: «Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в опухолевом микроокружении *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение важной и актуальной задачи – экспериментального и клинического обоснования создания моделей опухолевого микроокружения *in vitro* для разработки способов повышения эффективности и индивидуализации лечения больных метастатическими формами сарком мягких тканей.

По своей актуальности, объему проведенного исследования, научной новизне, практической значимости и представленным результатам диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842, с изменениями и дополнениями от 21 апреля 2016 г. №335, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Пипиа Нино Петровна,

заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 14.01.12 – онкология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на совместном заседании кафедр онкологии и иммунологии ФГБОУ ВО Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова Минздрава России 01.11.2018 г. (протокол № 3).

Заведующий кафедрой онкологии  
ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ  
им. акад. И.П. Павлова» Минздрава  
России, доктор медицинских наук



*[Handwritten signature]*  
В.В. Семиглазов

Подпись руки заверяю: *[Handwritten signature]*  
Спец. по кадрам *[Handwritten signature]*  
«15» ноября 2018г.

Заведующий кафедрой иммунологии  
ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ  
им. акад. И.П. Павлова» Минздрава  
России, академик РАН, доктор  
медицинских наук, профессор



*[Handwritten signature]*  
А.А. Тотолян

Подпись руки заверяю: *[Handwritten signature]*  
Спец. по кадрам *[Handwritten signature]*  
«15» ноября 2018г.

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации  
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8  
Телефон: 8(812)338-78-95, E-mail: [info@1spbgmu.ru](mailto:info@1spbgmu.ru),  
Сайт: [www.1spbgmu.ru](http://www.1spbgmu.ru)