

На правах рукописи

ПИПИА

Нино Петровна

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОРНОЙ ФУНКЦИИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С
САРКОМАМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В ОПУХЛЕВОМ МИКРООКРУЖЕНИИ
*IN VITRO***

**специальность – 14.01.12 – онкология
– 14.03.09 – клиническая иммунология,
аллергология**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Санкт-Петербург - 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент

Балдуева Ирина Александровна

Официальные оппоненты:

Орлова Рашида Вахидовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Назаров Петр Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отдела иммунологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «_____» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Петрова» Минздрава России и на сайте <https://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Саркомы мягких тканей (СМТ) представляют собой редкие гетерогенные опухоли мезенхимального происхождения, в начале заболевания часто локализованные, для которых хирургическая резекция является основным методом лечения. Однако, несмотря на оптимальное хирургическое лечение, у значительной части пациентов развиваются рецидивирующие и метастатические формы заболевания. Для этих пациентов имеющиеся варианты лечения ограничены (Tseng W.W. et al., 2014), это связано с гистологической гетерогенностью, генетическими aberrациями, которые запускают опухолевый процесс, локализацией СМТ в организме человека, что создает трудности в классификации и разработке новых методов лечения.

Стандартная терапия метастатических СМТ основана на химиотерапии (доксорубицин, ифосфамид, дакарбазин, гемцитабин/доцетаксел), которая сопровождается нежелательными явлениями (токсичностью), угнетает иммунную систему и редко приводит к излечению. При стандартной химиотерапии медиана общей выживаемости у этой категории больных составляет от 1,5 до 2 лет.

В США FDA (Food and drug administration) зарегистрировали новые препараты пазопаниб (Kawai A. et al. 2016), трабектидин (Demetri G.D. et al., 2016) и эрибулин (Schöffski P. et al., 2016; Kawai A. et al., 2017) для лечения метастатической формы СМТ. Эти лекарственные препараты увеличивают время до прогрессирования и общую выживаемость больных метастатическими СМТ, но не приводят к длительным ремиссиям и излечению.

Значительный прогресс в изучении биологии солидных опухолей (меланома кожи, рак почки, рак предстательной железы, рак легкого и др.) распространяется и на СМТ, однако до настоящего времени прогноз при этом заболевании остается неблагоприятным. В связи с этим, становится актуальным изучение иммунобиологических феноменов, которые наблюдаются у пациентов СМТ в процессе стандартной химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии, а также определение значимых мишеней для лечения на молекулярном уровне не только

при воздействии на опухолевые клетки, но и на компоненты опухолевого микроокружения (Nathenson M.J. et al., 2018).

Таким образом, мировые достижения в области лекарственного лечения СМТ в настоящее время оставляют широкую нишу для изучения взаимоотношений опухоли, иммунной системы, опухолевого микроокружения и разработки обоснованных иммунотерапевтических подходов с целью элиминации выживших клонов опухолевых клеток после стандартного лечения метастатических СМТ.

Разработанность темы исследования

Впервые взаимоотношения между опухолью и микроокружением были описаны S. Paget (1889). Далее, роль противоопухолевого иммунного ответа определил G. Klein (1960), положив начало изучению иммунного микроокружения опухоли. В настоящее время интерес вызывает определение субпопуляций эффекторных и супрессорных иммунокомпетентных клеток, их значение в элиминации опухоли, а также в ее «ускользании» от иммунного надзора. Существенный вклад в развитие этой темы внесли T. Boon (1991), O.J. Finn (2003), S.A. Rosenberg (2005), R.D. Schreiber (2011) и другие.

С момента первых попыток вакцинотерапии сарком, предпринятых Вильямом Коли (William B. Coley) в 1891 году, в этой области накоплен значительный практический опыт. Разработкой противоопухолевых вакцин для лечения сарком занимались R.C. Marcove (1970), J.D. Geiger (2001), R. Dagher (2004), C.L. Mackall (2008), S.E. Finkelstein (2012), S. Xie (2014) и др. В Научном отделе онкоиммунологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова под руководством д.м.н. И.А. Балдуевой уже более 20 лет активно изучается применение дендритноклеточных вакцин (ДК-вакцин) для лечения солидных опухолей, в том числе СМТ.

Цель исследования

Экспериментальное и клиническое обоснование создания моделей опухолевого микроокружения *in vitro* для разработки способов повышения эффективности и индивидуализации лечения больных метастатическими формами СМТ.

Задачи исследования

1. Изучить взаимодействие лимфоцитов, цитокинов, аутологичных дендритноклеточных вакцин (ДК-вакцин), цитостатиков в моделируемом микроокружении опухолевых клеток больных СМТ в экспериментальных аналитических системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence.
2. Произвести поиск взаимосвязи биологических маркеров, продуцируемых опухолевыми клетками СМТ при культивировании *in vitro* в системе мультиплексного анализа Bioplex Pro 200.
3. Изучить рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) в зависимости от продукции опухолевыми клетками метастатических СМТ ростовых факторов и хемокинов в условиях *in vitro*.
4. Изучить цитотоксическую и супрессорную активность основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных СМТ в зависимости от активности опухолевого процесса.
5. Изучить влияние противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac» на эффекторную функцию лимфоцитов у больных метастатическими формами СМТ.

Научная новизна исследования

- Созданы 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.

- Определены взаимосвязи биологических маркеров, продуцируемых опухолевыми клетками СМТ при культивировании *in vitro*.
- Изучена цитотоксическая и супрессорная активность лимфоцитов, рецепторный статус Т-регуляторных лимфоцитов периферической крови больных СМТ в зависимости от активности опухолевого процесса и применения противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac».

Научная и практическая значимость работы

1. Выявлены сложные взаимосвязи клеток иммунного микроокружения СМТ, опухолевых клеток, продуцируемых ими биологически активных веществ *in vitro*, что получило отражение в формировании иммунного ответа и эффективности иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» собственного производства *in vivo*.
2. Результаты 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.

Степень достоверности и апробации результатов:

Основные положения диссертации представлены на II Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи—2016» (Санкт-Петербург, 20-24 июня 2016 г.), VI Всероссийском конкурсе научных работ молодых ученых (Санкт-Петербург, 23 марта 2016 года), VII Всероссийском конкурсе научных работ молодых ученых (Санкт-Петербург, 22 марта 2017 г.), International Scientific and Practical Conference “Innovative technologies in traumatology and orthopedics. New opportunities in oncoorthopedics and oncology” II EAFO Musculoskeletal & Secondary Tumors Forum/XXIX EAFO Oncopathology Seminar “Bone, Soft Tissue & Metastatic Tumors” In Collaboration with Skolkovo Foundation (Moscow Region, 26-28 may, 2017), III Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи—2017» (Санкт-

Петербург, 23-25 июня 2017 г.), XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (29-30 марта 2018 г.), The Second International Conference “Cell Technologies At The Edge: Research & Practice” (CTERP) Translational Research In Cell Therapy (Moscow, April 11-13, 2018), “Annual Congress of The European Society for Medical Oncology” ESMO 2018 (Munich, Germany 19-23 October 2018).

По теме диссертации опубликованы 17 работ в научных журналах, из которых 4 – в рецензируемых научных журналах и изданиях ВАК.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Моделирование опухолевого микроокружения *in vitro* в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence отражает развитие событий максимально приближенных к событиям *in vivo*.
2. Посредством описательных статистик и корреляционного анализа продемонстрирована сложная взаимосвязь клеток иммунного микроокружения СМТ, опухолевых клеток, продуцируемых ими биологически активных веществ.
3. Изучение дендритноклеточной вакцины «CaTeVac» в экспериментальных моделях опухолевого микроокружения СМТ позволило экстраполировать противоопухолевую активность ДК-вакцины *in vivo* и усилить цитотоксический эффект лимфоцитов в присутствии IL-2 *in vitro*.
4. Увеличение общей выживаемости больных распространенными или метастатическими формами СМТ с 25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес) до 34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес) в группе «CaTeVac» (Log-Rank p=0,036, Breslow p=0,006) зарегистрировано при использовании противоопухолевой вакцины собственного производства «CaTeVac» во «второй» и последующих линиях лекарственного лечения.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст изложен на 168 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц и 62 рисунка. Список литературы включает 29 источников отечественных и 243 источника зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование после подписания информированного согласия включено 124 больных с распространенной формой СМТ и III-IV стадией заболевания, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2008 по 2018 гг.

В соответствии с задачами исследования работа была разделена на 2 части: лабораторная и клиническая.

В клиническую часть работы включено 69 пациентов, которые были разделены на 2 группы (30 пациентов, получавших стандартное лекарственное лечение; 39 больных, получавших ДК-вакцину «CaTeVac»). Характеристика больных, включенных в клиническую часть исследования, приведена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Линии ЛТ*	Характеристика	Группа №1	Группа №2	Уровень значимости (p)
	N	30	39	
	Пол (м/ж)	11/19	10/29	p=0,43
	СВ** (диапазон)	45(26-79)	43(13-76)	p=0,48
	Стадия	IIIВ, n = 4 IV, n = 26	IIIВ, n = 4 IV, n = 35	p=0,72
1 линия	ХТ «А»***(+) ХТ CaTeVac	25 5 0	34 5 0	p=74
2 линия	ХТ «А»(+) ХТ CaTeVac	10 20 0	8 17 14	p=1
3+ линии	ХТ «А»(+) ХТ CaTeVac	0 14 0	2 11 25	p=0,22

ЛТ* – лекарственная терапия, СВ** – средний возраст, ХТ «А»*** (+) антрациклинсодержащие схемы химиотерапии

По ранее оптимизированной технологии приготовления ДК-вакцины проводили дифференцировку незрелых дендритных клеток (ДК) из моноцитов периферической крови в условиях 37°C, 5% CO₂ и 98% влажности. Ростовые факторы и факторы дифференцировки: GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) вносили на 1-й, 3-й и 5-й день культивирования. На 7-й день культивирования для созревания ДК вносили коктейль лизированных опухолевых клеток, экспрессирующих иммуногенные раково-тестикулярные антигены (РТА⁺) в соотношении 1 ДК: 3 лизированные опухолевые клетки и TNF-α 20 нг/мл. Через 48 ч ДК собирали, осаждали центрифугированием, отмывали в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%) и доставляли в процедурный кабинет для введения больному.

ДК-вакцину вводили внутривенно паравертебрально в 3 точки на расстоянии 3 см друг от друга, в 4-ю контрольную точку вводили антигенный опухолевый материал РТА⁺ (опухолевый лизат), с интервалом 2 недели в течение 2 мес. и далее с интервалом 28 дней до прогрессирования заболевания. Перед каждой вакцинацией за 3 дня до введения ДК-вакцины пациент получал циклофосфамид (ЦФ) в дозе 300 мг внутривенно капельно для элиминации регуляторных Т-лимфоцитов (Treg).

Методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США) осуществляли мониторинг состояния клеточного и гуморального иммунитета больных. До начала лечения и далее каждые 2 мес. оценивали количественное содержание основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных: Т-лимфоцитов CD3⁺CD19⁻, В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺, Т-хелперов CD3⁺CD4⁺, активированных Т-хелперов CD3⁺CD4⁺HLADR⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) CD3⁺CD8⁺, активированных ЦТЛ CD3⁺CD8⁺HLADR⁺, двойных положительных Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD8⁺, НК-клеток CD3⁻CD16⁺CD56⁺, НКТ-клеток CD3⁺CD16⁺CD56⁺, регуляторных Т-лимфоцитов CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}. Для анализа супрессирующей функции Treg клеток у больных СМТ изучали

экспрессию этими клетками белков CCR10, CCR4 (CD194), VEGFR-2 (CD309) и нейропилина-1 (CD304). Для оценки клинической эффективности терапии использовали критерии RECIST v1.1, оценку нежелательных явлений проводили по шкале токсичности CTCAE v.5.0.

В лабораторной части работы из образцов операционного материала пациентов, включенных в исследование, были получены клеточные культуры СМТ. Изучена пролиферативная активность и чувствительность клеток СМТ к химиотерапевтическим агентам в аналитической системе наблюдения за живыми клетками с применением технологий машинного зрения (распознавания образов) Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия). Разработана модель иммунного микроокружения опухоли с использованием культуры клеток СМТ и мононуклеаров тех же больных, где была проведена оценка активности эффекторных и супрессорных клеток, а также эффективность аутологичной ДК-вакцины с помощью аналитической системы xCELLigence® RTCA DP. Для клеточных культур СМТ (n=17) изучена экспрессия хемокина CCL2 и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) методом ИФА с использованием наборов DCP00 Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D, США) и Human VEGF-A ELISA (Bender MedSystems, Австрия). Анализ продукции растворимых биологических маркеров клетками культур СМТ (n=23), влияющих на опухолевое микроокружение проводили с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex Pro 200 (BioRad, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием SPSS 23, R и Microsoft Excel 2010. Использовали методы описательной статистики, критерий Шапиро—Уилка, критерий хи-квадрат и точный тест Фишера, коэффициент ранговой корреляции rho Спирмена, t-критерий, U-критерий Манна—Уитни, критерий Краскела—Уоллиса, апостериорный тест Данна, регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса. Анализ выживаемости проводили на основе процедуры Каплана—Мейера, применяли логранговый критерий и критерий Гехана—Бреслоу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Прогнозирование реакции метастатических СМТ на химиотерапевтические агенты в аналитической системе CELL-IQ

Для изучения пролиферативной активности клеточных культур метастатической СМТ (n=5) и их чувствительности к воздействию химиотерапии использовали препараты эпирубицина и ифосфамида в трех различных концентрациях, составляющих 10, 100 и 200% от пика концентрации в плазме крови. Было установлено, что опухолевые клетки метастатической СМТ в фазе экспотенциального роста обладают различным потенциалом пролиферативной активности, который целесообразно учитывать при оценке гетерогенности клеточных популяций, характеристике их метаболизма, определения спектра чувствительности к химиотерапевтическим агентам *in vitro* (рис. 1, 2).

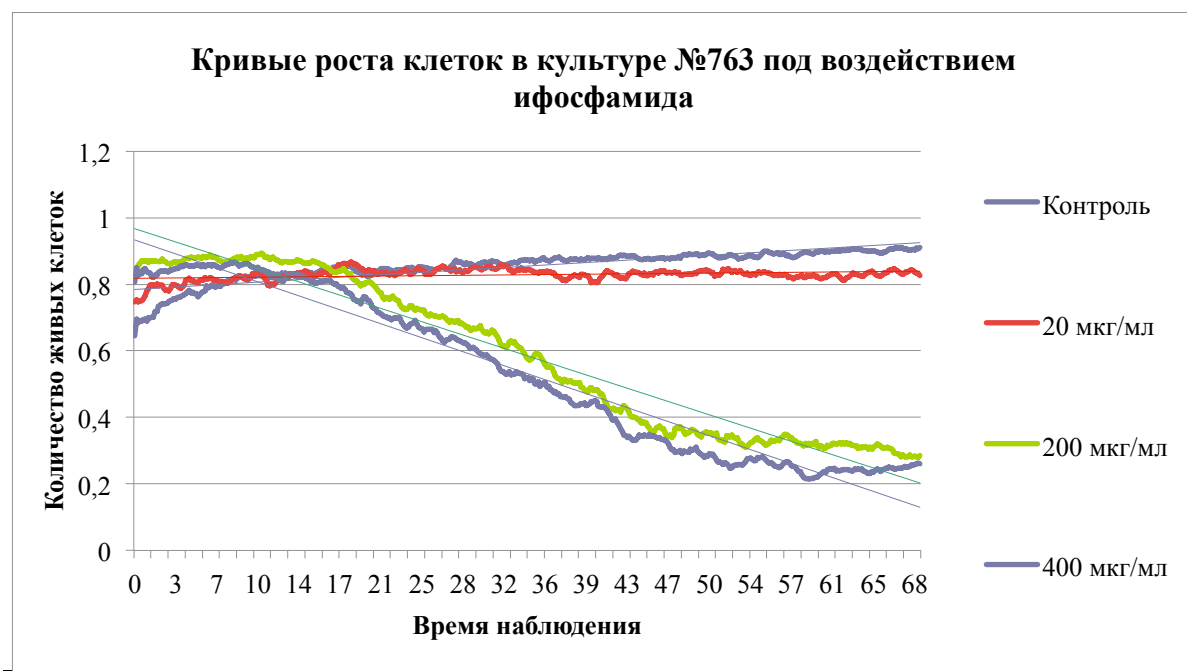


Рисунок 1. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культуре синовиальной саркомы №763 от концентрации ифосфамида.

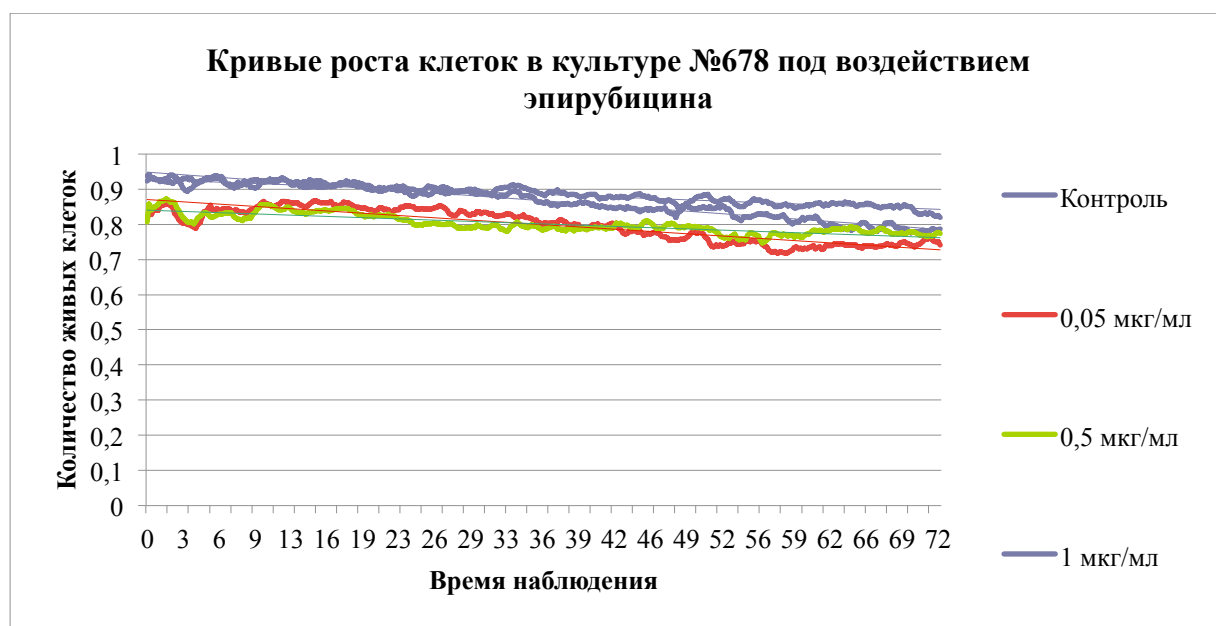


Рисунок 2. Графическое изображение зависимости количества живых клеток в культуре миксофибросаркомы №678 от концентрации эпирубина.

Наблюдаемые статистически значимые количественные изменения пролиферативной активности клеток СМТ в присутствии различных концентраций эпирубина и ифосфамида указывают на чувствительность к этим химиотерапевтическим агентам. Клеточные культуры, сохраняющие способность пролиферировать даже при использовании высоких доз химиопрепаратов, расцениваются как химиорезистентные.

Полученные *in vitro* данные отражают клиническую картину у соответствующих больных. Отсутствие снижения пролиферативной активности в культуре под действием эпирубина и ифосфамида соотносится с резистентностью к данным лекарственным средствам, применяемым в качестве стандартного лечения пациентов с СМТ.

Метод оценки чувствительности индивидуальных культур клеток метастатической СМТ к химиотерапевтическим препаратам в аналитической системе CELL-IQ может быть использован в клинической практике для оптимизации лекарственного лечения этой категории больных.

2. Моделирование опухолевого микроокружения *in vitro* путем воздействия зрелых ДК, мононуклеаров и различных цитокинов на первичные культуры и клеточные линии СМТ в аналитической системе xCELLigence® RTCA DP

Аналитическая система xCELLigence позволяет моделировать естественный процесс опухоль-опосредованной иммуносупрессии и реализации эффекторной функции иммунной системы с целью изучения этих явлений в контролируемых условиях. В данной модели использованы аутологичные мононуклеарные клетки крови. Эта фракция включает различные популяции клеток иммунной системы, такие как Т- и В-лимфоциты, НК- и NKT-клетки, моноциты, MDSC, что позволяет учитывать как противоопухолевую активность эффекторных клеток, так и иммуносупрессирующее действие других компонентов иммунного микроокружения. Использование в модели аутологичной ДК-вакцины дает возможность персонализированной оценки эффективности данного метода.

В нашем исследовании показано повышение пролиферативной активности опухолевых клеток в присутствии клеток иммунной системы, что подтверждает теорию иммуноредактирования опухоли и поляризацию клеток микроокружения в направлении иммуносупрессии. Добавление в систему GM-CSF в качестве единственного цитокина не приводит к подавлению опухолевого роста. При использовании IL-2 в разных дозах в присутствии аутологичной зрелой ДК-вакцины наблюдался выраженный противоопухолевый эффект, что свидетельствует о роли этого цитокина в активации ЦТЛ и противоопухоловом иммунном ответе *in vitro* (рис. 3А и 3В). В одном случае рост злокачественных клеток СМТ сохраняется даже в присутствии высоких доз IL-2, что может быть признаком истощения эффекторных клеток иммунной системы или ускользания опухоли от иммунного надзора.

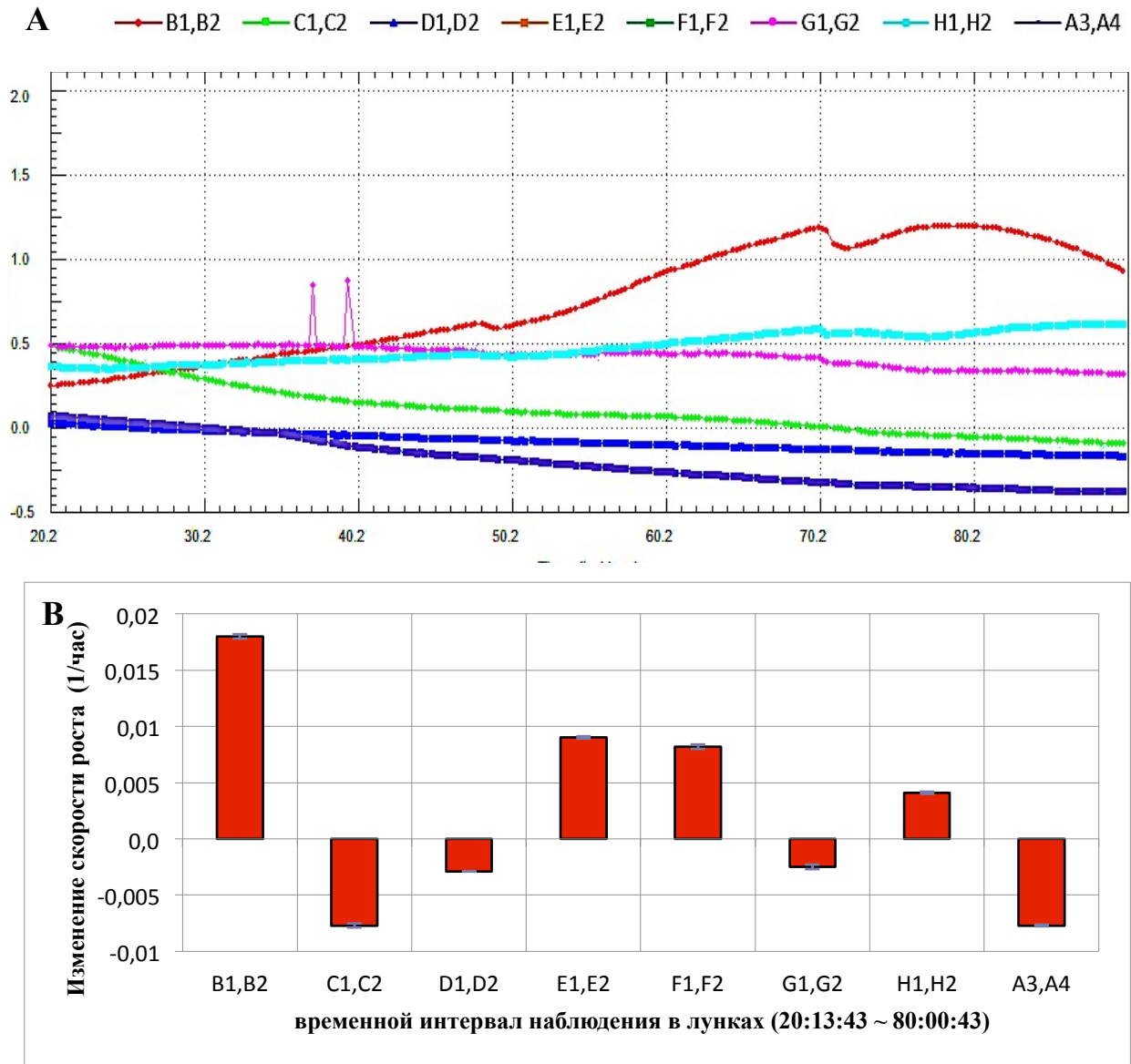


Рисунок 3 А, В. Графическое изображение динамики пролиферативной активности клеток культуры миксофибросаркомы №933 в присутствии аутологичных зрелых РТА⁺ ДК и МНК при добавлении различных доз цитокинов GM-CSF и IL-2 с 20-го по 80-й часы наблюдения. В1, В2 – опухолевые клетки (интактный контроль); С1, С2 – ДК (контроль); D1, D2 – МНК (контроль); E1, E2 – опухолевые клетки + ДК + МНК; F1, F2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF; G1, G2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + GM-CSF + IL-2 (125 МЕ/мл); H1, H2 – опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (50 МЕ/мл); A3, A4 - опухолевые клетки + ДК + МНК + IL-2 (1000 МЕ/мл).

Таким образом, моделирование иммунного опухолевого микроокружения в аналитической системе xCELLigence® позволяет получить важную информацию о механизмах реализации противоопухолевого эффекта ДК-вакцины при лечении СМТ. Оценка эффективности иммунотерапии *in vitro* с использованием культуры

опухолевых клеток конкретного больного является мощным инструментом персонализированного подхода к лечению злокачественных новообразований.

3. Аутологичная ДК- вакцина «CaTeVac» на основе РТА⁺ для лечения больных СМТ

За время проведения исследования для сравнительного анализа эффективности иммунотерапии на основе аутологичных ДК, активированных аллогенными РТА⁺ («CaTeVac») были сформированы 2 группы пациентов: группа контроля (группа 1) - пациенты, получавшие только стандартную химиотерапию 2-й и последующих линии (n=30); группа «CaTeVac» (группа 2) - пациенты, получавшие 2 и более линии системного лекарственного лечения, где одним из этапов являлась иммунотерапия аутологичной ДК-вакциной (n=39). Дизайн клинической части исследования представлен на рис. 4. Все больные, включенные в исследование, были с установленным диагнозом СМТ, не включая ГИСО, и на разных этапах лечения. Самыми часто встречаемыми подтипами являлись синовиальная саркома, липосаркома и лейомиосаркома.

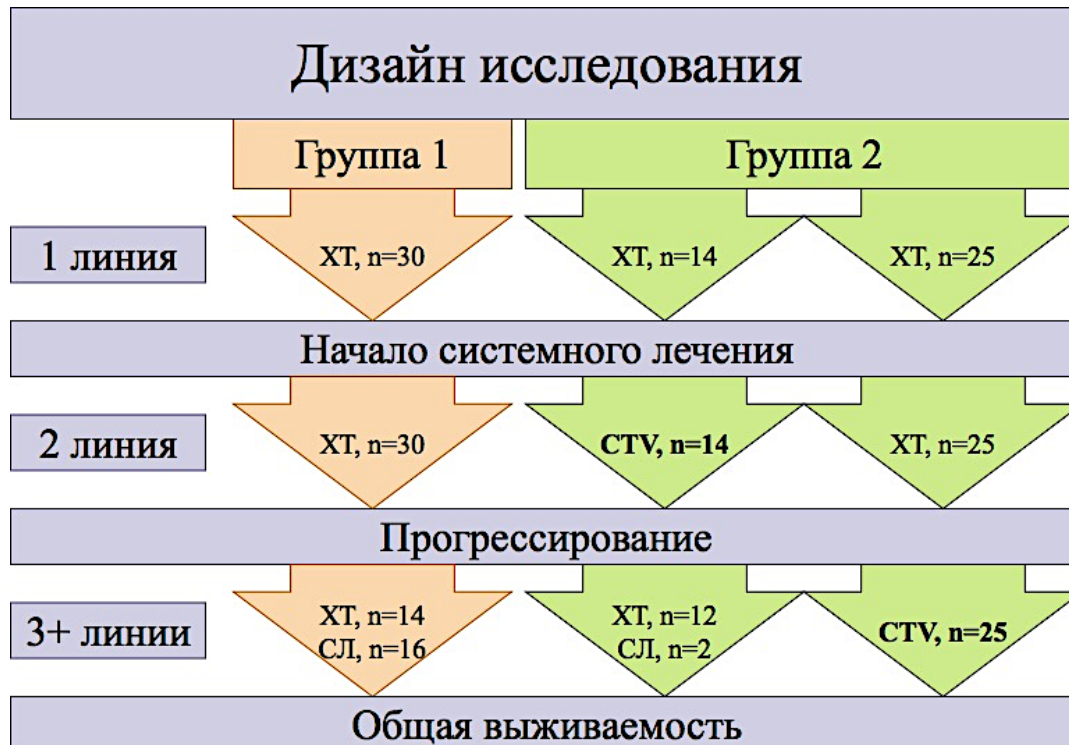


Рисунок 4. Характеристики лечения больных СМТ и распределение между группами пациентов: ХТ-химиотерапия, СЛ-симптоматическое лечение, СТV-противоопухолевая ДК-вакцина «CaTeVac».

ДК-вакцина «СаТеVac» не вызывает нежелательных явлений (НЯ) 3 и 4 ст. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) зарегистрирована у 86,3% больных через 24 ч уже после первого введения ДК-вакцины.

Введение изучаемой дозы ЦФ было достаточным для поддержания малой численности Treg (CD4+CD25^{bright}CD127^{low}), не превышающей референсных значений у больных со стабилизацией заболевания (СЗ), в то время как у пациентов с прогрессированием заболевания (ПЗ) количество этих лимфоцитов увеличивалось в процессе лечения. Кроме того, больных с СЗ характеризовала тенденция к увеличению в периферической крови абсолютного содержания Т-лимфоцитов и NK-клеток, сохранению количества В-лимфоцитов в пределах нормы, в то время как у больных с ПЗ наблюдали снижение количества Т- и В-лимфоцитов в эти сроки наблюдения. Обращает на себя внимание, что пациенты с СЗ демонстрируют волнообразную динамику содержания Т-хелперов и ЦТЛ в процессе ДК-вакцинотерапии, и при уменьшении количества этих клеток в периферической крови нарастает их активность, о чем можно судить по увеличению абсолютного содержания лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности антигены HLA-DR.

Был проведен сравнительный анализ общей выживаемости (ОВ) и оценка отношения рисков смерти больных в изучаемых группах. На рис. 5 представлены больные, включенные в исследование в основном для проведения «второй» и «третьей» линии терапии. Обоснованием для планирования дизайна исследования и его анализа стали полученные промежуточные данные и наши предположения о влиянии ДК-вакцинотерапии на общую продолжительность жизни больных.

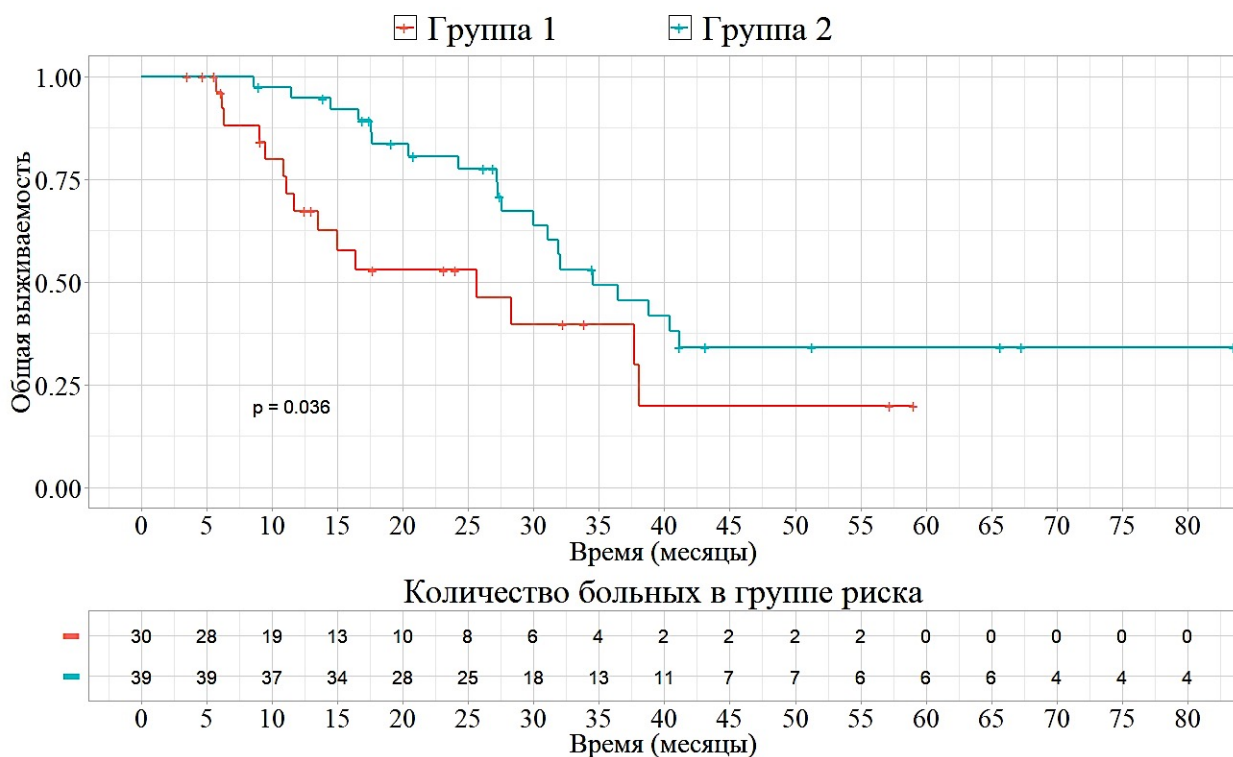


Рисунок 5. Графическое изображение сравнительного анализа общей выживаемости в соответствии Каплана – Мейера между 1-й группой (без «CaTeVac») и 2-й группой (с применением «CaTeVac») у больных метастатическими СМТ.

Установлено, что иммунотерапия ДК-вакциной «CaTeVac» увеличивает общую выживаемость до 34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес.) по сравнению с контрольной группой пациентов, получавших только стандартное лечение во 2-й и последующих линиях терапии, где ОВ составила 25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес., Log-Rank $p = 0,036$, Breslow $p = 0,006$).

Выявлено снижение риска смерти в 2 раза у больных СМТ, получавших «CaTeVac», по сравнению с контрольной группой [ОР=0,492 (95% ДИ 0,250-0,969)]. Показано отсутствие влияния пола и возраста на ОВ ($p > 0,05$).

Исходя из вышеизложенного, можно рассматривать применение РТА⁺ ДК-вакцины «CaTeVac» в качестве основного вида лечения в «первой» или во «второй» линии терапии у больных метастатическими СМТ с условно индолентным течением заболевания и/или имеющимися противопоказаниями к проведению полихимиотерапии, или как дополнительную опцию в

поддерживающем режиме к стандартной или метрономной химиотерапии у пациентов с быстро прогрессирующими СМТ.

Таким образом, полученные результаты позволяют перейти к рандомизированным клиническим исследованиям с целью подтверждения эквивалентности или превосходства иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» над другими вариантами системного лечения метастатических СМТ, так как разрабатываемый подход обладает лучшими показателями соотношения риска и пользы из существующих на сегодняшний день подходов во «второй» линии химиотерапевтического лечения этой нозологической формы злокачественного новообразования, и в будущем может быть рассмотрен в качестве адъювантной терапии у больных СМТ с высоким риском прогрессирования заболевания.

5. Изучение иммуносупрессивного потенциала Т-регуляторных лимфоцитов в процессе опухолевой прогрессии у больных СМТ

В микроокружении опухоли малигнизированные клетки находятся в тесном реципрокном взаимодействии с клетками иммунной системы, стромы и кровеносных сосудов. В экспериментальных исследованиях *in vivo* было показано, что опухоль экспрессирует ряд факторов, воздействующих на поверхностные рецепторы Treg и влияющих на их направленную миграцию и накопление в опухолевой ткани. При изучении содержания различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток у больных СМТ с прогрессированием заболевания или стабилизацией заболевания установлено достоверное снижение абсолютного числа NK-клеток при прогрессировании опухолевого процесса ($p=0,031$), при этом статистически значимых различий в абсолютном количестве цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов выявлено не было ($p=0,511$) (табл. 2). Показано увеличение относительного содержания Treg, экспрессирующих CCR10 ($p=0,001$), CCR4 ($p=0,001$), и нейропилин-1 ($p=0,021$), у больных с ПЗ (табл. 3). У пациентов с липосаркомой и синовиальной саркомой продемонстрированы статистически значимые различия содержания CCR4⁺Treg ($p=0,012$) и CCR10⁺Treg ($p=0,007$).

Таблица 2. Количественное содержание NK клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови больных СМТ и их иммунофенотип в зависимости от течения заболевания

Характер течения заболевания	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺		Цитотоксические Т лимфоциты	
	NK (%)	NK×10 ⁹ /л	CD3 ⁺ CD8 ⁺ ×10 ⁹ /л	CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ ×10 ⁹ /л
ПЗ, медиана ИКР	9,2 6,95–13,75	0,11 0,08–0,15	0,32 0,19 - 0,46	0,39 0,018 - 0,11
СЗ, медиана ИКР	13 7,5 – 16	0,17 0,09-0,26	0,36 0,23 – 0,47	0,031 0,02 – 0,05
р	0,241	0,031	0,511	0,619

Таблица 3. Количественное содержание Treg в периферической крови больных СМТ и их иммунофенотип в зависимости от течения заболевания

Характер течения заболевания	Treg (%)					
	CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low}	CCR10 ⁺	CD304 ⁺	VEGFR-2 ⁺	CCR4 ⁺	
ПЗ, медиана ИКР	8,90 7,05-10,20	9,10 5,80-19,35	6,00 2,55-9,75	0,80 0,0-1,35	10,00 4,00-51,25	
СЗ, медиана ИКР	8,75 6,80-9,37	4,50 2,60-6,20	2,50 1,80-4,40	0,20 0,00-1,30	3,30 1,95-4,50	
р	0,776	0,001	0,021	0,435	0,001	

ПЗ – прогрессирование заболевания, СЗ – стабилизация заболевания, ИКР – интерквартильный размах.

Экспрессия на поверхности Treg нейропилина-1 и VEGFR-2 коррелировала с продукцией опухолевыми клетками VEGF ($r=0,93$, $p=0,001$ и $r=0,88$, $p=0,007$ соответственно). Более того, выявлена прямая корреляция высокой силы между экспрессией регуляторными Т-лимфоцитами CCR4 и секрецией CCL2 клетками метастатической СМТ ($r=0,81$, $p=0,024$). Эти данные указывают на наличие системы направленной миграции Treg в опухолевое микроокружение, где эти клетки способствуют иммуносупрессии и опухолеиндуцированной толерантности, ассоциированной с ПЗ.

Изучение содержания субпопуляций иммунокомпетентных клеток периферической крови и рецепторного статуса Treg, связанного с их супрессивным потенциалом, у больных метастатической СМТ, а также выявление зависимости этих показателей от активности опухолевого процесса может быть использовано для прогнозирования эффективности иммунотерапии противоопухолевой вакциной «CaTeVac».

5. Мультиплексный анализ панели онкомаркеров в супернатантах клеточных культур больных СМТ

Цитокины, ростовые факторы и гормоны в микроокружении опухоли играют важную роль в модуляции иммунного ответа. Изучение секретомы опухолевых клеток необходимо для выявления прогностических и предиктивных маркеров в иммунотерапии и химиотерапии злокачественных новообразований, а также для прогнозирования эффективности методов иммунотерапии. Некоторые продуцируемые опухолью факторы могут влиять на активность ДК и цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, а также участвовать в иммуносупрессии, опосредованной клетками микроокружения. В связи с этим с помощью системы мультиплексного анализа BioPlex Pro 200 нами произведен поиск взаимосвязи биологических маркеров, которые секретируются клеточными культурами СМТ.

Некоторые культуры СМТ секретировали высокие уровни HGF, VEGF-A, ангиопоэтина-2, IL-6 и IL-8, фоллистатина, PAI-1, G-CSF. Выявлена умеренная продукция опухолевыми клетками sFASL, sCD40L, sVEGFR-1, sTIE-2, лептина. Некоторые биологические маркеры, такие как PLGF, PDGF-AB/BB, TNF- α , sIL-6Ra, IL-18, SCF, секретировались большинством культур СМТ в незначительных количествах. С помощью корреляционного анализа была показана связь между продукцией ряда биологически активных молекул (рис. 6, 7), также установлено соответствие между секреторными характеристиками клеток СМТ *in vitro* и формированием иммунного ответа *in vivo*, а также эффективностью химиотерапии и применения ДК-вакцины «CaTeVac».

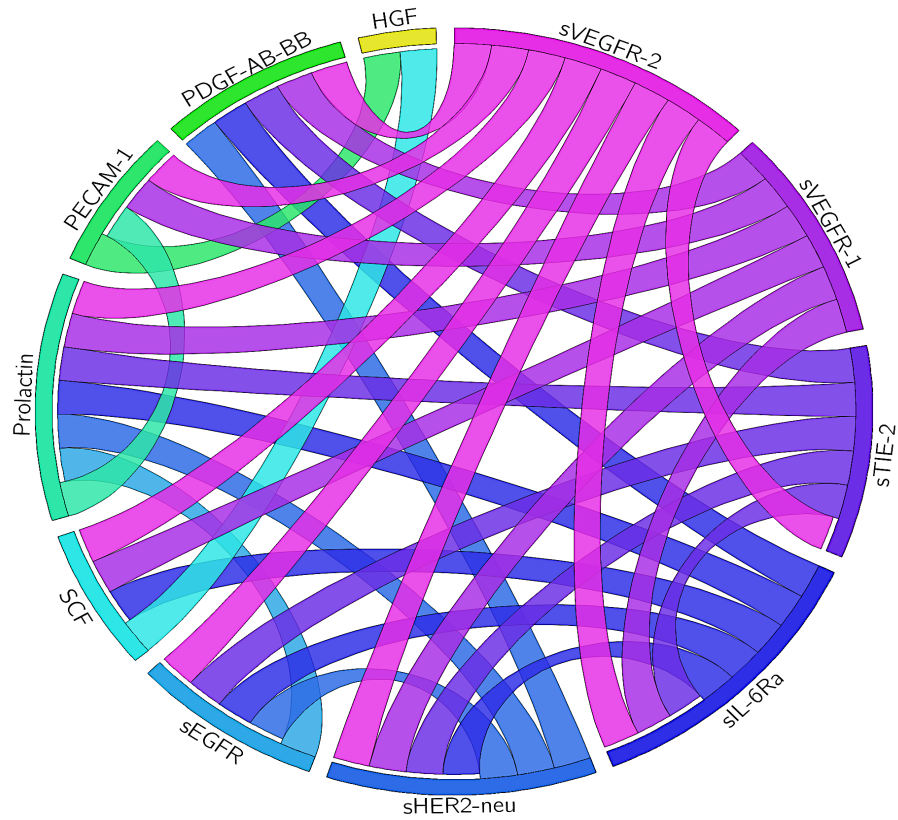


Рисунок 6. Корреляция между концентрациями онкомаркеров, входящих в панель 1, в супернатантах клеточных культур больных СМТ ($\rho > 0,7$, $p < 0,05$).

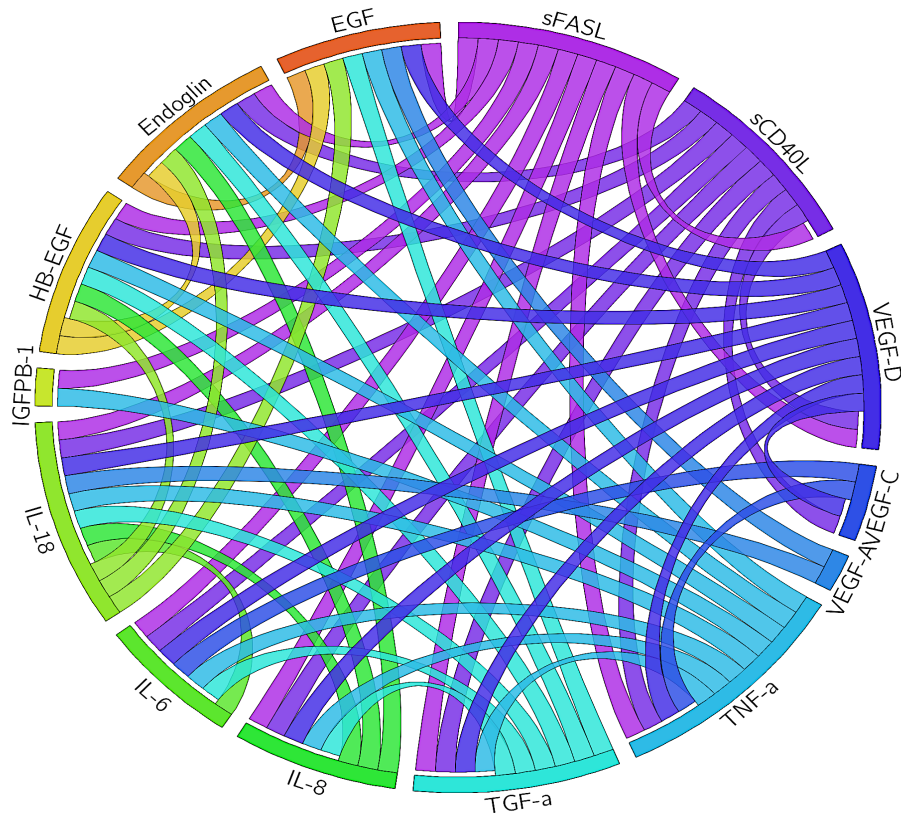


Рисунок 7. Корреляция между концентрациями онкомаркеров, входящих в панель 2, в супернатантах клеточных культур больных СМТ ($\rho > 0,7$, $p < 0,05$).

Таким образом, в данной работе нами продемонстрировано комплексное многоуровневое взаимодействие опухолевых клеток, компонентов иммунного микроокружения и секретируемых ими цитокинов, ростовых факторов, гормонов и других соединений, а также роль этого взаимодействия в реализации противоопухолевого эффекта ДК-вакцины «CaTeVac».

Выводы

1. Моделирование индивидуального опухолевого микроокружения у больных СМТ в системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence *in vitro* становится высокотехнологичным методом лабораторной диагностики определения резистентности к химиотерапии и чувствительности к иммунотерапии.
2. Посредством описательных статистик и корреляционного анализа продемонстрирована сложная взаимосвязь опухолевых клеток, клеток иммунного микроокружения СМТ, продуцируемых ими биологически активных веществ, что получило отражение в формировании иммунного ответа, эффективности химиотерапии и иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac» собственного производства.
3. Выявлена прямая корреляция высокой силы между продукцией опухолевыми клетками метастатических СМТ *in vitro* сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, С-С хемокинового лиганда CCL2 и экспрессией на Т-регуляторных лимфоцитах периферической крови нейропилина-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 ($r=0,81$, $p=0,024$).
4. При прогрессировании опухолевого процесса у больных СМТ статистически значимо снижается абсолютное содержание натуральных киллеров ($p=0,031$), увеличивается относительное число Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR10 ($p=0,001$), CCR4 ($p=0,001$), нейропилин-1 ($p=0,021$) и отсутствуют

статистически значимые изменения в абсолютном содержании цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов ($p=0,511$).

5. Активация эффекторной функции лимфоцитов на фоне иммунотерапии дендритноклеточной вакциной собственного производства «CaTeVac» подтверждается снижением риска смерти в 2 раза у больных СМТ [ОР=0,492 (95% ДИ 0,250-0,969)] и увеличением общей выживаемости [34,5 мес. (95% ДИ 26,3-42,8 мес)] по сравнению с контрольной группой пациентов, которые не получали «CaTeVac» в качестве системного лечения [25,7 мес. (95% ДИ 9,7-41,6 мес)], log rank $p=0,036$.

Практические рекомендации

1. Разработанная высокотехнологичная лабораторная методика оценки резистентности и чувствительности к химиотерапии и/или иммунотерапии в экспериментальной модели опухолевого микроокружения *in vitro* в системах наблюдения за живыми клетками Cell-IQ и xCELLigence может использоваться для определения подходов индивидуализации лечения больных СМТ.
2. Анализ рецепторного статуса Treg лимфоцитов и цитотоксических эффекторных клеток периферической крови больных СМТ, определяемых с помощью проточной цитофлуориметрии, целесообразно проводить для оценки течения опухолевого процесса и определения эффективности проводимой иммунотерапии.
3. 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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Новик А.В., Комаров Ю.И., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Семенова А.И., Пипия Н.П., Воробейчиков Е.В., Карицкий А.П., Климашевский В.Ф., Имянитов Е.Н., Беляев А.М. Дендритные клетки, активированные раково-тестикулярными антигенами (РТА⁺), в лечении метастатических сарком мягких тканей // *Вопр.онкол.* – 2014. – Т.60. - №6. – С.700-706.
2. Балдуева И.А., Новик А.В., Карицкий А.П., Кулева С.А., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Проценко С.А., Семёнова А.И., Комаров Ю.И., Пипия Н.П., Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В., Сепиашвили Р.А., Беляев А.М. Иммуноterapia рака: современное состояние проблемы // *Аллергология и иммунология.* — 2015. — Т16. — №4. — С.354-357.
3. Балдуева И.А., Новик А.В., Гафтон Г.И., Данилова А.Б., Нехаева Т.Л., Пипия Н.П., Комаров Ю.И., Евдокимова Т.А. Моделирование воздействия химиотерапевтических агентов на первичные культуры метастатических сарком мягких тканей в автоматизированной аналитической системе CELL-IQ // *Вопросы онкологии* — 2016. — Т62. — №2. — С. 340-350.
4. Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Новик А.В., Гафтон Г.И., Левченко И.В., Анисимов В.В., Семилетова Ю.В., Носов А.К., Евдокимова Т.А., Комарова Ю.А., Пипия Н.П., Артемьева А.С., Кулева С.А., Беляев А.М. Создание коллекции биологических образцов однотипно пролеченных онкологических больных // II Российский онкологический форум с международным участием «Белые Ночи — 2016». Сборник тезисов. М., 2016. — С.233-234.
5. Балдуева И.А., Гафтон Г.И., Данилова А.Б., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Евдокимова Т.А., Комарова Ю.А., Семенова А.И., Комаров Ю.И., Пипия Н.П. Персонализированное лечение больных саркомами мягких тканей путем определения индивидуальной химиочувствительности опухолевых клеток к различным цитостатикам *in vitro*: анализ взаимосвязи ретроспективных и экспериментальных исследований// II Российский онкологический форум с международным участием «Белые Ночи — 2016». Сборник тезисов. М., 2016. — С.236-237.
6. Евдокимова Т.А., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Пипия Н.П., Авдонкина Н.А., Гафтон Г.И. Получение клеточных линий сарком мягких тканей (СМТ) для создания противоопухолевых вакцин // II Российский онкологический форум с международным участием «Белые Ночи — 2016». Сборник тезисов. М., 2016. — С.234-235.

7. Балдуева И.А., Пи́пия Н.П. Изучение мишеней опухолевого микроокружения сарком мягких тканей – путь к персонализированной терапии // II Российский онкологический форум с международным участием «Белые Ночи — 2016». Сборник тезисов. М., 2016. — С. 237.
8. Балдуева И.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Пи́пия Н.П., Проценко С.А., Беляев А.М. Клеточные технологии в онкологии: прошлое, настоящее и будущее // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению», 26-27 октября 2016 г., Екатеринбург, 2016. — С.94—97.
9. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Пи́пия Н.П., Данилова Т.А., Проценко С.А. Перспективные направления использования Банка биологических образцов однотипно пролеченных онкологических больных для фундаментальных и прикладных исследований // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению», 26-27 октября 2016 г., Екатеринбург, 2016. — С.98—100.
10. Пи́пия Н.П. Прогнозирование реакции метастатических сарком мягких тканей на химиотерапевтические агенты в аналитической системе долговременной фазово-контрастной микроскопии CELL-IQ // Сборник научных трудов молодых ученых —2016. — С. 51-54.
11. Пи́пия Н.П. Аутологичная дендритно-клеточная вакцина на основе раково-тестикулярных антигенов для лечения сарком мягких тканей (CaTeVac). // Сборник научных трудов молодых ученых —2017. — С. 123-127.
12. Данилова А.Б., Балдуева И.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Кузнецова А.И., Пи́пия Н.П., Емельянова Н.В., Галиуллина О.А. Предиктивное значение экспрессии опухолеассоциированных антигенов и иммуносупрессивных факторов клетками солидных опухолей при проведении противоопухолевой вакцинотерапии. // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». Санкт-Петербург, АННМО «Вопросы онкологии». — С.194.
13. Пи́пия Н.П., Данилова А.Б., Балдуева И.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Галиуллина О.А., Данилова Т.А. Т-регуляторные лимфоциты как элемент иммуносупрессии в процессе опухолевой прогрессии у больных метастатическими саркомами мягких тканей. // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». Санкт-Петербург, АННМО «Вопросы онкологии». — С.199-200.
14. **Пи́пия Н.П., И.А. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Гафтон Г.И., Авдонкина Н.А., Емельянова Н.В. Иммуносупрессивный потенциал периферических регуляторных Т-лимфоцитов в процессе**

опухолевой прогрессии у больных метастатическими саркомами мягких тканей // Вопросы онкологии — 2018. — Т.64. — №3. — С.400-407.

15. Pipia N.P., Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Novik A.V., Danilova A.B., Avdonkina N.A., Emelyanova N.V. /Immunosuppressive potential of peripheral regulatory T-lymphocytes in the process of tumor progression in patients with metastatic soft tissue sarcomas //Abstract —Hematopoiesis Immunology — 2018. —Vol.16. — №1. — P.195-197.
16. Baldueva I.A., Pipia N.P., Nekhaeva T.L., Novik A.V., Danilova A.B., Avdonkina N.A., Emelyanova N.V. / Immunosuppressive potential of peripheral regulatory T-lymphocytes in the process of tumor progression in patients with metastatic soft tissue sarcomas // poster session — CTERP 2018. — p. 65-66. [the second international conference «Cell technologies at the edge: from research to practice» (cterp) «Translational research in cell therapy», Moscow, April 11-13, 2018].
17. Komarov Y., Barchuk A., Semenova A., Semiglazova T., Imianitov E., Iyevleva A., Baldueva I., Novik A., Nehaeva T., Pipia N., Huhtala H., Ivantsov A., Artemyeva A., Moore M., Protsenko S. NY-ESO-1 antigen expression as a prognostic factor for soft tissue sarcomas // Abstract — Journal of Clinical Oncology 35, no. 15_suppl (May 20 2017) 11075-11075. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.11075.