

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО
«Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский
университет имени акад. И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации

академик РАН, д.м.н., профессор

Ю. С. Полушин

« 02 » декабря 2022 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационную работу Ефремовой Натальи Александровны на тему: «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.1.6.Онкология, лучевая терапия и 3.2.7.Аллергология и иммунология.

Актуальность темы выполненной работы

Прогнозирование течения онкологических заболеваний и разработка персонализированных подходов к лечению больных является актуальной научной и клинической проблемой. Для оценки индивидуального прогноза выделяют факторы характеризующие биологические свойства опухоли, связанные с особенностями больного и обусловленные методами лечения. Прорывные открытия, сделанные в последние десятилетия в области генетики и молекулярной онкологии, а также новые возможности иммунологии и клеточных технологий позволили выявить и охарактеризовать новые прогностические и предиктивные факторы для различных опухолей.

Саркомы мягких тканей и остеогенные саркомы (СМТ/ОС) представляют собой гетерогенную группу злокачественных новообразований мезенхимального происхождения, различную по гистологическому строению, склонных к метастазированию, характеризующуюся химиорезистентностью, агрессивным течением, низкой эффективностью лечения, что выражается в низкой общей и бессобытийной выживаемости больных. Гетерогенность этих опухолей связана с их клональной экспансией с последующим отбором, приводящим к селекции наиболее агрессивных клонов и является основной причиной неэффективности противоопухолевой терапии, в том числе иммунотерапии. Понимание механизмов формирования изменений на уровне опухолевой клональности при прогрессировании заболевания может способствовать повышению эффективности терапии. В свою очередь, идентификация биомаркеров периферической крови которые коррелируют с ответом опухоли на иммунотерапию может обеспечить простой малоинвазивный способ отбора пациентов или использоваться для мониторинга лечения.

Исследованию такого сложного и важного в научном и клиническом плане явления как гетерогенность сарком, и посвящена работа Н.А. Ефремовой «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии». На основании вышеизложенных представлений диссертантом сформулирована цель исследования - поиск новых биомаркеров прогноза течения заболевания и эффективности терапии у больных метастатическими саркомами мягких тканей и остеогенными саркомами на основе изучения особенностей селекции опухолевых клеток *ex vivo*.

Научная новизна работы

Новизна диссертационной работы Ефремовой Н.А. не вызывает сомнения. Автором впервые получены и охарактеризованы 56 клеточных линий метастатических сарком 16 гистологических подтипов и 83 дочерних

клона для клеточного моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Наиболее интересные клеточные модели запатентованы (получено 3 патента). Убедительно показано наличие 2-х типов клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком – клоногенные и неклоногенные линии. В ходе селекции, как продемонстрировано соискателем, появляются различия в биологических свойствах клеток СМТ и ОС, выявлены и описаны характерные для возникновения СМТ и ОС HLA-гаплотипы.

Обнаружена связь между экспрессией раково-тестикулярных генов и клоногенностью культивируемых клеток сарком: клетки клоногенных опухолей отличаются выраженной транскрипционной активностью генов *GAGE1* и *SLLP1* ($p < 0,05$). Выявлена экспрессия генов *PASD1* и *SLLP1*, ранее неизвестная в миксофибросаркомах и остеогенных саркомах. Найдена зависимость клоногенного потенциала культивируемых клеток сарком от процентного содержания $ALDH1^+$ стволовых клеток опухоли. Некоторые из выявленных автором факторов могут быть в дальнейшем рассмотрены как перспективные мишени для иммунотерапии.

Показаны различия в динамике иммунологических показателей периферической крови пациентов в зависимости от клоногенности полученных опухолевых клеток. Установлено, что новая характеристика опухолевой клеточной линии СМТ и ОС - клоногенность, оказывает влияние на прогноз заболевания и эффективность иммунотерапии вакциной «СаТеVac». Определена связь клоногенности и иммунологических параметров периферической крови (цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов, НК клеток) у пациентов СМС и ОС.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Полученные результаты, выводы и рекомендации диссертационного исследования Н.А. Ефремовой отвечают критериям достоверности. Достоверность обеспечивается достаточным объемом исследования, репрезентативностью выборки (в исследование скринировано 95 образцов опухоли пациентов, включено 56 клеточных линий и 83 клон), глубоким анализом литературных данных, современными методами статистической обработки результатов, логически выстроенной цепочкой доказательств. Диссертационная работа проведена с соблюдением этических норм научных исследований и одобрена этическим комитетом. Обработка полученных данных проводилась с учетом современных подходов к статистическому анализу. Применены методы описательной статистики. Проведено сравнение средних значений в группах с использованием непараметрического теста U - Манна-Уитни для зависимых и независимых переменных. Непараметрический корреляционный анализ по Спирмену использовали для оценки тесноты связи между количественными признаками. Дополнительно проводили частотный анализ с использованием таблиц сопряженности χ^2 а также дисперсионный анализ при множественной проверке гипотез. Автором смоделирована *in vitro* путем клеточного клонирования эволюция опухолей, которая может наблюдаться в реальной клинической практике, в результате чего удалось показать, что в процессе клонирования происходит увеличение пролиферативной активности и химиорезистентности клеток СМТ/ОС. В результате проведенной работы автором было обнаружено, что клоногенные и неклоногенные клеточные культуры СМТ и ОС имеют статистически значимые различия в миграционной способности, экспрессии ALDH1 (маркера стволовых клеток опухоли), транскрипционной активности раково-тестикулярных генов. У пациентов, из образцов опухоли которых были получены клоногенные клеточные линии, в периферической крови автором было выявлено сниженное количество цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов и высокое содержание НК-клеток, что свидетельствует

об изменении поляризации иммунного ответа в процессе опухолевой селекции. Таким образом, клоногенность культур клеток СМТ и ОС может рассматриваться в качестве прогностического фактора, определяющего течение заболевания. Результаты исследования подкреплены адекватным и разнообразным иллюстративным материалом в виде таблиц, рисунков, микрофотографий, который также подтверждает достоверность и обоснованность научных положений, выводов и заключения диссертации.

Оценка структуры и содержания работы

Рукопись диссертации Ефремовой Н.А. построена по традиционному плану. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и библиографического списка, включающего 166 источников, из них 16 отечественных и 150 иностранных авторов. Диссертацию иллюстрируют 13 таблиц и 38 рисунков. Материал в диссертации структурирован, изложен логично и последовательно, дополнен графическими изображениями, помогающими наглядно представить полученные данные и оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к диссертационным работам, представленным на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Диссертационная работа читается легко, текст не перегружен узкопрофессиональными терминами, предложенные объяснения изменения параметров тестов при различных патологических состояниях логичны, понятны и убедительны. Выводы и практические рекомендации четко сформулированы и обоснованы.

Введение содержит актуальность темы исследования, степень разработанности, формулировки цели и задач. Автор демонстрирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость, степень достоверности и результаты апробации работы, формирует положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор литературы отражающий современное состояние изучаемой проблемы. Автор приводит

разностороннее описание существующих эволюционных теорий опухолегенеза, демонстрирует глубокое понимание проблемы и умение работать с научной литературой.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования. Ефремова Н.А. использовала различные экспериментальные методики, включающие 2D и 3D клеточное моделирование, клонирование, оценку химиорезистентности, пролиферативной активности, способности к миграции и инвазии. Для статистической обработки результатов исследования применены корректные и современные методики, в том числе кластерный анализ.

В третьей главе представлены результаты исследования. Подробно описаны полученные клеточные линии сарком, приведены результаты клонирования методом предельных разведений. Автором установлена новая характеристика клеточных линий сарком – клоногенность. Обнаружена связь клоногенности клеточных линий с экспрессией маркера стволовых клеток опухоли ALDH1 и рядом иммунологических показателей периферической крови пациентов, из опухолевого материала которых они были получены.

В четвертой главе автором представлено детальное обсуждение результатов диссертационного исследования в сравнении с данными, опубликованными в отечественных и зарубежных научных изданиях, что дает основания для формирования полноценных выводов. Выводы статистически достоверны, корректно сформулированы и являются основой для практических рекомендаций.

Публикации автора в отечественных и зарубежных изданиях, включенных в перечень журналов, рекомендованных ВАК, а также автореферат диссертационного исследования полностью отражают основные положения диссертации. Основные результаты работы были представлены на семи отечественных и зарубежных конференциях, по теме диссертации опубликовано 19 печатных работ соискателя (6 статей, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук, 2 статьи в международных журналах и 13 тезисов

докладов). По результатам диссертационного исследования получено три патента на изобретение и одно свидетельство о регистрации базы данных. Подготовлено одно учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования.

Принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет.

Значимость работы для науки и практики

Диссертационная работа Ефремовой Н.А. «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии» имеет большую значимость для современной биологической и медицинской науки, так как расширяет теоретические знания о биологии сарком, что дает предпосылки для создания новых иммунотерапевтических подходов в лечении этого онкологического заболевания.

Созданная коллекция охарактеризованных 56 клеточных линий СМТ/ОС и 83 дочерних клонов может быть использована для дальнейшего моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Клоногенные клеточные линии могут быть использованы как модели резистентности для разработки новых способов лечения сарком. Полученные результаты позволяют использовать фактор клоногенности как неблагоприятный при прогнозе течения заболевания и эффективности иммунотерапии. Кроме того, экспрессия раково-тестикулярных генов *GAGE1* и *SLLP1*, высокая активность фермента *ALDH1*, низкое содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов и высокое содержание НК-клеток в периферической крови пациентов также могут стать предикторами неблагоприятного прогноза при метастатических саркомах. Выявленная высокая транскрипционная активность РТГ в метастатических саркомах позволяет

предложить их в качестве мишени для проведения иммунотерапии, направленной против РТА.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования Ефремовой Н.А. внедрены в научно-практическую деятельность научного отдела онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (акт внедрения результатов от 30.11.2021 г.).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования Ефремовой Н.А. могут быть использованы в практической деятельности специализированных онкологических учреждений, осуществляющих медицинскую помощь больным с метастатическими формами СМТ/ОС. Теоретические знания, полученные в результате проведенной работы, могут дополнить образовательные программы высших учебных заведений биологического и медицинского профиля, а также войти в материалы повышения уровня образования медицинских работников.

Замечания по диссертации

Принципиальных замечаний к диссертационной работе и автореферату нет. К числу замечаний по оформлению следует отнести некоторые стилистические неточности и опечатки в тексте диссертации, что не сказывается на общей положительной оценке диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Натальи Александровны Ефремовой на тему: «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии» представляет собой самостоятельное законченное научно-квалификационное исследование, выполненное по актуальной проблеме современной онкологии и иммунологии. Результаты, полученные

автором, имеют большое значение для науки и практики, их достоверность и обоснованность не вызывают сомнений.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов, а также объему и уровню проведенного исследования диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», от 24.09.2013 г., № 842 (с изменениями от 11.09.2021 г., №1539) утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а её автор Ефремова Наталья Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и 3.2.7. Аллергология и иммунология.

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании кафедры онкологии и кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, протокол № 39 от «22» ноября 2022 года.

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



[Handwritten signature]

В.А. Тришкин

Заведующий кафедрой иммунологии
ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России,
академик РАН, д.м.н., профессор



[Handwritten signature]

А.А. Тотолян

Подпись руки заверяю: *Тришкин В.А.*
Специалист по кадрам, *Тотолян А.А.*
М.А. Пищелёва
«21» декабря 2022

197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8,
тел. 8(812) 338-78-95, e-mail: info@lspbgmu.ru; <https://www.lspbgmu.ru/ru/>