

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора медичних наук, головного наукового співробітника лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології ДУ «ННЦРМ НАМН України»,

Абраменко Ірини Вікторівни

на дисертацію Щербіни Валерії Михайлівни на тему: «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків», подану до захисту на здобуття ступеня доктора філософії зі спеціальності

091 – Біологія

Актуальність обраної теми дисертації.

Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) відноситься до групи найпоширеніших у світі онкогематологічних захворювань серед дорослого населення, характер перебігу якого характеризується значною гетерогенністю серед пацієнтів. Здебільшого дане захворювання протікає індолентно протягом тривалого часу і тому для більшості хворих на ХЛЛ застосовується тактика постійного моніторингу. Однак, в частині випадків ХЛЛ, відбувається стрімкий перехід індолентної форми перебігу захворювання в агресивну, що супроводжується маніфестацією симптомів, за якого обов'язковим є негайне призначення хіміотерапії (ХТ).

Імунофенотипова та молекулярна гетерогенність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ є ключовою причиною значних коливань в клінічній картині перебігу ХЛЛ загалом, в тому числі обумовлює характер відповіді хворих на ХТ. Незважаючи на кращу ефективність комбінованої дії цитостатиків для лікування хворих на ХЛЛ порівняно із їх використанням у монорежимі, ефективність дії окремих препаратів все ж характеризується значною варіабельністю серед пацієнтів. Саме тому пошук можливих маркерів, аналіз експресії яких дозволить виокремити групи хворих

на ХЛЛ з прогнозовано вищою ефективністю до певних компонентів схем ХТ потенційно дозволить покращити результати терапії.

Враховуючи вищезазначене, можна констатувати, що дисертаційна робота В.М. Щербіни присвячена вирішенню актуальної задачі у галузі онкогематології, а саме пошуку можливих предиктивних маркерів злویкісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, асоційованих із кращою чутливістю клітин до дії цитостатиків, результати якої потенційно можуть бути використані для прогноза ефективності лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у межах виконання науково-дослідної роботи «Рецептор-опосередковані сигнальні каскади у патобіології злویкісно трансформованих клітин при хронічному лімфолейкозі» (2017-2019 рр.), яка є логічним продовженням серії досліджень, які були розпочаті чл.-кор. НАН України, д.б.н., проф. С.П.Сидоренко. Крім того, дослідження виконанні у рамках гранту НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих учених «Пошук нових підходів до регуляції патобіології хронічного лімфолейкозу» (2018-2019 рр.) та стипендії Президента України для молодих вчених «Пошук шляхів підвищення чутливості клітин хворих на В-ХЛЛ до дії хіміопрепаратів (експериментальні дослідження)» (2020-2021 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційна робота В.М. Щербіни є логічно спланованим, повноцінним науковим дослідженням, результати якого всебічно характеризують досліджувану проблему щодо пошуку можливих шляхів оптимізації алгоритму вибору серед спектра хіміопрепаратів, що застосовують для лікування хворих на ХЛЛ, таких, ефективність застосування яких, порівняно з іншими, є вища і базується на врахуванні молекулярно-біологічних характеристик клона

патологічних клітин, а саме імунофенотипових та цитокінових маркерів злоякісно трансформованих В-лімфоцитів.

Робота В.М. Щербіни викладена на 160 сторінках із дотриманням існуючих вимог, затверджених до оформлення дисертації. Структурно дисертаційна робота складається із анотації, вступу, аналітичного огляду літературних джерел, детального опису методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу і обговорення результатів, висновків та додатку.

У вступі до дисертаційної роботи влучно обґрунтована актуальність обраної тематики досліджень, чітко сформульована мета та шість завдань досліджень, описана наукова новизна роботи та охарактеризовано практичне значення отриманих результатів. Апробація та публікація результатів, отриманих в ході виконання дисертаційної роботи, відповідає вимогам, які висуваються до рівня наукової кваліфікації здобувача наукового ступеня. Загалом форма написання та стиль викладеної у вступі інформації дає повне уявлення про мету та зміст дисертаційної роботи.

В огляді літератури, що налічує чотири підрозділи, дисертантка дає ретельний аналіз літературних джерел, що стосуються загальної характеристики ХЛЛ; перелічує відомі на сьогодні прогностичні та предиктивні маркери даної нозології; аналізує вплив факторів локального мікрооточення на формування біологічних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів та, зрештою, хронологічно представляє розвиток підходів до лікування хворих на ХЛЛ та підводить до проблематики роботи. Список використаної літератури охоплює 207 посилань, більша частина яких опублікована за останні 5 років.

У другому розділі дисертаційної роботи наведено перелік використаних методик, який вражає кількістю різнопланових підходів, що було застосовано для вирішення завдань дослідження. Зокрема, у роботі використанні сучасні методи досліджень, які стосуються імунофенотипування клітин з використанням проточної цитометрії, оцінки життєздатності злоякісно трансформованих В-лімфоцитів за допомогою резазуринового тесту,

визначення рівня експресії мРНК методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та рівня експресії білків з використанням вестерн блот аналізу, аналіз вмісту цитокінів в біологічних рідинах твердофазним імуносорбентним сендвіч-методом ELISA. Застосовані методи є адекватними, опис яких є досить детальним, що вказує на досконале володіння дисертанткою ними.

Результати власних досліджень викладено у трьох розділах, які налічують 20 рисунків та 20 таблиць. У першому розділі власних досліджень дисертантка детально вивчає особливості експресії досліджуваних антигенів, а саме CD5, CD20, CD22, CD37, CD38 та CD40 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів методом проточної цитометрії. За результатами імунофенотипування дослідженні випадки ХЛЛ було розподілено на групи негативних (якщо показник GeoMean ratio для цільового антигена був <1.3) та позитивних випадків, що надалі було враховано при аналізі показників чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів з метою виявлення їх можливої предиктивної складової. Зокрема, вперше встановлено, що чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії бендамустину (БН) асоційована із статусом експресії CD5, CD37, CD38 та CD40, тоді як чутливість клітин до циклофосфаміду (ЦФ) - із статусом експресії CD5 та CD20.

Другий розділ власних досліджень присвячений пошуку асоціативних зв'язків між ступенем чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів та характером експресії CD150 та CD180. Згідно отриманих даних, краща чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії флударабіну (ФЛ) спостерігається у випадку виключно одночасної експресії CD150 та CD180. Крім того, за наявності CD150⁺ фенотипу та незалежно від статусу експресії CD180 спостерігається підсилення цитотоксичного ефекту за умов одночасної дії ФЛ та ЦФ на В-лімфоцити хворих. Важливо також зазначити, що дисертанткою показано безпосередній вплив CD180-опосередкованих сигнальних шляхів у регуляції чутливості В-лімфоцитів до дії

БН, так як наслідком лігації CD180 є зростання чутливості клітин до БН у 9,8 разів. Важливим фрагментом роботи, результати якого висвітлені в цьому розділі, був підтверджений факт позитивного CD150 та CD180-опосередкованого впливу на рівень експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, що є мішенню дії ключового компонента сучасних хіміотерапевтичних схем – препарату ритуксимаб.

У третьому розділі власних досліджень дисертанткою висвітлено ряд даних, що стосувались аналізу зв'язку між характером експресії цитокінів у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, їх рецепторним статусом та чутливістю до цитостатиків. Слід наголосити, що в дисертаційній роботі вперше встановлено, що CD150 та CD180 є негативними регуляторами експресії та секреції цитокіну IL-10, який сприяє розвитку стану загальної імуносупресії при ХЛЛ та в цілому є фактором несприятливого прогнозу перебігу захворювання.

В заключному розділі «Узагальнення та обговорення результатів» автор резюмує отримані експериментальні дані в контексті сучасних знань щодо можливого зв'язку між статусом експресії рецепторів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та чутливістю клітин до цитотоксичної дії хіміопрепаратів, а також пошуку можливих механізмів регуляції рівня секреції таких цитокінів як CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10, які на сьогодні є факторами, що визначають прогноз перебігу ХЛЛ, а дисертант представив дослідження щодо їх предиктивної значимості відносно дії деяких складових схем терапевтичного лікування. Аналіз отриманих результатів дозволив запропонувати можливий алгоритм оцінки прогнозованої чутливості хворих на ХЛЛ до цитостатиків з урахуванням імунофенотипових та молекулярних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів.

Все вищевикладене свідчить про достатній рівень обґрунтованості і вірогідності наукових положень, висновків та рекомендацій дисертаційного дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів.

На основі отриманих результатів, які висвітлені у висновках до дисертаційної роботи та повністю відповідають її меті, сформульовано ключові положення, що виносяться на захист та містять елементи наукової новизни.

Вперше на підставі комплексного дослідження серед імунофенотипових маркерів злякисно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ виокремлено такі, рівень експресії яких асоційований із високою чутливістю клітин до дії цитостатиків. Також було розширено відомості про значимість статусу експресії антигенів CD150 і CD180 при ХЛЛ: виявлене раніше прогностичне значення цих маркерів доповнено відомостями про їх предиктивну складову до дії ФЛ і ЦФ. Окрім того, вперше доведено можливість значного (у 9,8 разів) підвищення чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН за рахунок активації CD180-опосередкованих сигнальних шляхів. Важливим науковим доробком роботи є встановлений факт позитивного CD150 та CD180-опосередкованого впливу на рівень експресії CD20, що є предиктом чутливості до дії ритуксимабу.

Результати дисертаційного дослідження доповнюють наукові дані щодо зв'язку між експресією цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 і IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та статусом експресії деяких поверхневих антигенів цих клітин. Зокрема, вперше виявлено факт достовірно вищого рівня експресії мРНК CCL3 і CCL4 та нижчого рівня експресії мРНК IL-6 та IL-10 у злякисно трансформованих В-лімфоцитах із CD150⁺CD180⁺ фенотипом, ніж у CD150⁻CD180⁻ В-лімфоцитах. Крім того, вперше продемонстровано предиктивну значимість рівня експресії мРНК досліджуваних цитокінів до цитотоксичної дії цитостатиків на В-лімфоцити хворих на ХЛЛ.

Практичне значення одержаних результатів.

Практичне значення дисертаційної роботи В.М. Щербіни не викликає сумніву, а отримані дані можуть потенційно бути враховані як елемент оптимізації алгоритму підбору схем лікування хворих на ХЛЛ, яким рекомендований FCR або BR варіант терапії. Додатковою перевагою з

економічної та часової точки зору є те, що вперше встановлено предиктивну значимість саме тих імунотипових маркерів, які включені до діагностичної панелі лімфопроліферативних захворювань і тому індивідуалізація тактики подальшого лікування хворих на ХЛЛ теоретично можлива вже на етапі діагностики.

Отримані відомості щодо безпосереднього залучення CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів до підвищення рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ мають не тільки фундаментальний характер, але і вагому практичну значимість, так як вони є підґрунтям для розробки нових підходів до підвищення ефективності анти-CD20 таргетної терапії хворих на ХЛЛ, ефективність якої порівняно із іншими нозологіями, є значно нижчою через низький рівень експресії CD20 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ.

Апробація результатів дисертації.

Ключові положення дисертаційної роботи були представлені та обговоренні переважно в усних доповідях на: конференції молодих вчених «Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy» (Київ, 2019 р.), XV міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2019 р.), 6-му Українському конгресі клітинних біології з міжнародних представництвом (Яремче, Україна, 2019 р.), II міжнародній конференції «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem» (Київ, 2019 р.), а також на XVI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2020 р.).

Повнота викладу результатів в опублікованих працях.

За темою дисертації опубліковано 10 наукових робіт, зокрема 4 статті, 2 з яких надруковані у фахових виданнях, що рекомендовані МОН України та 2 статті в наукових виданнях держав, що входить до Організації економічного співробітництва та розвитку. Окрім статей, результати дисертаційної роботи були представлені на 5 конференціях із міжнародним представництвом та видано інформаційний лист МОЗ України.

Оцінка змісту дисертації.

Дисертація є комплексним повноцінним дослідженням, що об'єднує: аргументованість обраної теми; вдале планування експерименту та формулювання задач дослідження, що повністю відповідає меті; грамотний статистичний обрахунок та логічне представлення даних, а також обґрунтоване обговорення отриманих результатів та висновків. Анотація до дисертаційної роботи не містить даних, які не були представлені в розділах власних досліджень. Всі представлені в роботі дані, що не були отримані дисертанткою безпосередньо в ході проведення дослідження, містять посилання на відповідні літературні джерела, що свідчить про відсутність порушень автором вимог академічної доброчесності і дотримання норм законодавства про авторське право в повному обсязі.

Анотація та текст дисертації оформлено відповідно до вимог Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567 «Про затвердження порядку присудження наукових ступенів».

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.

До дисертаційної роботи є декілька зауважень та запитань, які не зменшують загальну позитивну оцінку роботи, а лише сприятимуть глибшому розумінню отриманих автором даних:

Зауваження:

1. Доречно, окрім мінімальних та максимальних значень відсотка клітин, що експресують той чи інший антиген, представити його середнє значення.

2. Доцільно у розділі «Огляд літератури» в першій частині більш детально охарактеризувати етіологічні чинники, які сприяють розвитку ХЛЛ.

Запитання:

1. Який відсоток складали Т-лімфоцити за показником експресії CD3 серед загальної популяції досліджуваних клітин периферичної крові?

2. Чи може змінюватись характер експресії антигенів CD150 та CD180 в динаміці захворювання? Чи достатньо визначати рівень їх експресії на етапі діагностики?

Загальний висновок та оцінка дисертації.

Враховуючи актуальність обраної проблематики, новизну отриманих результатів та їх практичне значення, за об'ємом проведених досліджень, що відповідають високому методичному рівню, вважаю, що дисертаційна робота Щербіни Валерії Михайлівни «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків» є самостійним, завершеним дослідженням.

Отримані автором результати забезпечують розв'язання наукового завдання в галузі науки 09 Біологія.

Дисертаційна робота Щербіни В.М. на тему «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків» відповідає вимогам пп. 10, 11 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 №167 (у редакції постанови КМУ від 09.06.2021 № 608), а її автор Щербіна Валерія Михайлівна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

головний науковий співробітник
лабораторії молекулярної біології відділу
клінічної імунології Інституту клінічної
радіології ДУ «ННЦРМ НАМН України»,
доктор медичних наук, професор



І.В.Абраменко

