

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Директор Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
д.м.н., проф. Я.Г. Бучинська



«20» жовтня 2021 р.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації Чумак Аліни Вікторівни на тему «Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis*. IMB B-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження)», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія»

Комісія у складі д.б.н. І.І. Ганусевич та к.б.н. О.О. Лихової проаналізувала результати виконання здобувачем ступеня доктора філософії, аспірантом Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України А.В. Чумак освітньо-наукової програми, ознайомила з дисертацією, науковими працями за темою дисертації, заслухала доповідь здобувача та відповіді на запитання на фаховому семінарі і зазначає, що представлена дисертація, яка подана у вигляді спеціально підготовленої кваліфікаційної праці на правах рукопису, є закінченою самостійною роботою, виконаною на сучасному науковому-методичному рівні.

Актуальність теми. Сьогодні з'являється велика кількість робіт, присвячених дослідженню біологічних властивостей лектинів (клас білків або глікопротеїнів неімунної природи), здатних вибірково зв'язувати вуглеводи та глікополімери без порушення їх ковалентної структури.

Відомо, що лектини присутні в будь-якій живій системі і, завдяки своїй високій вуглеводній специфічності, відіграють провідну роль у процесах вуглеводно-білкового розпізнавання та мають поліфункціональні властивості. Зокрема, лектини володіють цитотоксичними, імуномодуючими і протипухлинними властивостями, а також здатні впливати на різноманітні біологічні процеси в клітині.

Перспективними новими протипухлинними засобами є бактеріальні лектини, їх продукують сапрофітні бактерії родини *Bacillus*, оскільки відомо, що подібні засоби імунотерапії сприяють підтриманню на належному рівні функціональної активності ефекторів протипухлинного імунітету, формуванню повноцінної імунної відповіді на дисеміновані пухлинні клітини, що зменшує ризик метастазування.

Макрофаги - ефектори природного імунітету, які, завдяки їх пластичності, здатності до швидкої зміни функціонального стану в залежності від стимулів, які вони отримують з локального мікрооточення, є найбільш адекватним об'єктом для оцінки терапевтичної ефективності лектинів,.

Саме тому поставлена дисертантом мета – визначити вплив лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 на функціональну поляризацію макрофагів в процесі росту пухлин різного гістогенезу та обґрунтувати доцільність його використання для розробки підходів протипухлинної імунотерапії – є цілком коректною та аргументованою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційна робота виконана у лабораторії онкоімунології та конструювання протипухлинних вакцин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами науково-дослідних робіт: 2.2.5.417 «Дослідження функціональної пластичності макрофагів за

умов застосування засобів хіміо- та біотерапії раку» (номер державної реєстрації №0118U005470, 2019 – 2023pp.); 2.2.5.434 «Лектин *B. subtilis* IMB 7724 як фактор макрофаг-спрямованої модуляції в оптимізації імунотерапії» (номер державної реєстрації 0120U102955, 2020 – 2025pp.); № 2.2.5.411 «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 pp., номер державної реєстрації 0117U002034) та стипендії НАН України для молодих вчених «Розробка нового методу імунотерапії раку за допомогою лектину *B. subtilis* IMB B-7724» (2020-2022 pp.).

Достовірність та обґрунтованість отриманих результатів та висновків: Представлена робота є результатом досліджень, виконаних на інтактних мишах та мишах з перещепленими модельними пухлинами – аденокарциномою Ерліха (АКЕ) або карциномою легені Льюїс (КЛЛ). Всього було використано 234 миші лінії Balb/c та 168 мишей лінії C57Bl/6J. Загальний дизайн експерименту повною мірою відповідає заявленій меті дисертаційної роботи.

Для досягнення поставлених задач здобувач застосувала широкий комплекс сучасних методів дослідження. Поляризаційний тип M1, M2 макрофагів, виділених з черевної порожнини, селезінки, легенів та пухлинної тканини методом центрифугування на градієнті щільності (фікол-урографін) з наступною адгезією на пластику, аналізували із використанням біохімічних методів (вимірювання продукції NO, активності аргінази), ЕПР-спектроскопії (оцінка швидкості продукції супероксидних радикалів (СР)); методом МТТ тесту (цитотоксична активність). Використано імунологічні методи: визначення абсолютної маси тимусу, селезінки, периферичних лімфатичних вузлів та показників їх клітинності (кількість життєздатних лімфоцитів за суправітального забарвлення трипановим синім). Вплив лектину на активність лімфоцитів периферичних лімфатичних вузлів оцінювали *in vitro* за допомогою стандартної реакції бласттрансформації на Т-клітинний (конканавалін А, ConA) та В-клітинний (ліпополісахарид (Lipopolysaccharide,

LPS) мітогени. Рівень експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1, STAT6, IRF4, IRF5 в макрофагах оцінювали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, підбираючи праймери з використанням ресурсів Primer Design and Search Tool та NCBI (розділ BLAST). Статистичний аналіз отриманих результатів включав оцінку достовірності розбіжностей (непараметричний U-критерій Mann-Whitney) та визначення кореляційних зв'язків (критерію Спірмена) за допомогою програмного забезпечення Prism Версії 8.0.

Застосування здобувачем широкого спектру методів повністю відповідає поставленим завданням. При вивченні сучасного стану проблеми за темою дисертації було опрацьовано 229 літературних джерел. Аналіз результатів досліджень знайшов своє відображення у науково обґрунтованих висновках, які належно аргументовані і свідчать про завершеність здійсненого здобувачем дослідження. Тож отримані автором результати не викликають сумнівів у достовірності та є повною мірою обґрунтованими.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше в експериментальних системах *in vitro* та *in vivo* доведена доцільність використання лектину *B. subtilis* IMB B-7724 для модуляції функціональної поляризації макрофагів в нормі та за умов пухлинного процесу і обґрунтовано його ефективність для протипухлинної імунотерапії.

Вперше ідентифіковано функціональну поляризацію макрофагів в динаміці росту експериментальних пухлин різного гістогенезу. Найбільш суттєві ознаки зміни поляризації макрофагів (в напрямку M1→M2) встановлено в термінальній фазі росту карциноми легені Льюїс та аденокарциноми Ерліха.

Встановлено, що бактеріальний лектин *B. subtilis* IMB B-7724 проявляє імуномодулюючу (щодо клітин лімфоцитарного та макрофагального ряду) та протипухлинну (по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу) дію, що обґрунтовує доцільність використання цього лектину як перспективного засобу протипухлинної імунотерапії.

Вперше визначено, що імуномодуюча активність лектину *B. subtilis* IMB B-7724 асоційована зі станом функціональної поляризації макрофагів. Встановлено, що обумовлена *B. subtilis* IMB B-7724 поляризація макрофагів за M1 станом є IRF-залежною та опосередкована JAK-STAT – сигнальним шляхом, про що свідчить підвищення співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 та IRF5/IRF4.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про механізми змін функціональної активності клітин макрофагального ряду в процесі росту пухлин різного гістогенезу та свідчать про перспективу використання лектину *B. subtilis* IMB B-7724 для модуляції стану їх функціональної поляризації.

Вперше встановлено, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 володіє протипухлинною та імуномодуючою активністю, що обґрунтовує доцільність його використання для медикаментозної терапії злоякісних новоутворень.

Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність використання показників поляризаційного стану макрофагів для прогнозування ефективності терапевтичного застосування продуктів природнього походження з імуномодуючою дією при лікуванні хворих на рак.

Запропоновано комплекс молекулярно-біологічних маркерів (співвідношення рівнів NO/Arg та експресії мРНК STAT1/STAT6 і IRF5/IRF4), що можуть бути використані для оцінки функціональної поляризації макрофагів в динаміці росту пухлин та при використанні імунотерапії.

Результати проведеного дослідження можуть бути впроваджені в навчальний процес ВНЗ України у лекціях студентам та аспірантам, присвячених сучасним досягненням біотехнологій у лікуванні злоякісних новоутворень.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на науково-практичних форумах різного рівня: конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 4-5 лютого 2019); XVI Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (Львів, 27–29 квітня 2020 р); XVIII Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки /BioScience Advances» (Київ, травень 2020 р); науково-практичній конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)» (Харків, 16-17 вересня 2020 року); XIV з'їзд онкологів та радіологів України (Київ, 30.09– 02.10.2021); Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів. (Київ, 12-13 жовтня 2021).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є закінченим, самостійно виконаним дослідженням автора, має фундаментальне наукове та практичне значення. Спільно з науковим керівником попередньо було визначено мету та завдання роботи, а на основі отриманих в ході роботи результатів проведено їх аналіз та узагальнення і сформульовано висновки. Дисертантом особисто проаналізовано наукові публікації за темою дисертації; досліджені в експерименті функціональні властивості макрофагів тварин з модельними пухлинами, а також протипухлинні та імуномодулюючі ефекти застосування оригінального лектину *B. subtilis* IMB B-7724; проведені аналіз та статистична обробка результатів.

Повнота опублікування результатів дисертації та особистий внесок здобувача до всіх наукових публікацій, опублікованих із співавторами та зарахованих за темою дисертації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт, зокрема 10 статей, з яких 9, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та 1 в науковому виданні держави, що входить до Європейського Союзу; отримано 1 патент на корисну модель; 5

праць опубліковано в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій.

1. Караман ОМ, Федосова НІ, Воєйкова ІМ, Черемшенко НЛ, Іванченко АВ, Савцова ЗД. Перспективи використання лектинів для діагностики і лікування злоякісних новоутворень. Онкологія 2018; 1(72): 10-16. *(Дисертантом проаналізовано вітчизняну та закордонну літературу для написання статті).*

2. Федосова НІ, Караман ОМ, Воєйкова ІМ, Іванченко АВ, Черемшенко НЛ, Круць ОО, Діденко ГВ. Оцінка цитотоксичної активності лектинподібної речовини *B. subtilis* 7724 в системі *in vitro*. Онкологія 2018; 20 №3(74): 218-224. *(Дисертантом проаналізовано вітчизняну та закордонну літературу для написання статті).*

3. Karaman OM, Ivanchenko AV, Chekhun VF. Macrophages — a perspective target for antineoplastic Immunotherapy. Exp Oncol 2019; 4 (41): 282–290. *(Дисертантом проведено аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

4. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Getman KI, Karaman OM, Symchych TV, Ivanchenko AV, Danyliuk OI, Voeykova IM, Didenko GV. Bioactivity of the *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. Mikrobiol. Z 2019; 81(4):107-117. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

5. Symchych TV, Fedosova NI, Chumak AV, Cheremshenko NL, Karaman OM, Burlaka AP, Voyeykova IM. Functions of tumor-associated macrophages and macrophages residing in remote anatomical niches in Ehrlich carcinoma bearing mice. Exp Oncol 2020; 42, 3, 197-203. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-3.14928. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

6. Chumak AV, Fedosova NI, Shcherbina VM, Cheremshenko NL, Karaman OM, Chekhun VF. Influence of bacterial lectin on key regulatory links of functional activity of macrophages of mice with ehrlich carcinoma. *Exp Oncol* 2021; 43(3): 197-203. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

7. Chumak A, Shcherbina V, Fedosova N, Chekhun V. Polarization of macrophages of mice under the influence of lectin from *Bacillus subtilis* IMB B-7724. *EUREKA: Life Sciences* 2021; 3: 3–10. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

8. Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, Symchych TV, Voyeykova IM, Chekhun VF. Macrophage polarization in dynamics of lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Exp Oncol* 2021; 43(1), 15–20. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

9. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, Symchych TV, Chumak AV, Shliahovenko VO, Voyeykova IM, Didenko HV. Physicochemical and cytotoxicity properties of *Bacillus subtilis* IMB B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol. Z* 2021; 83(1): 39-48. *(Дисертантом виконано частину експериментальної роботи, підбірано та проаналізовано літературу).*

10. Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Чумак АВ, Воєйкова ІМ. Оцінка гострої токсичності лектину *B. subtilis*. IMB B-7724. *Фармакологія та лікарська токсикологія* 2021; 15(2): 110-116. *(Дисертантом виконано частину експериментальної роботи, підбірано та проаналізовано літературу).*

11. Черемшенко НЛ, Федосова НІ, Гетьман КІ, Караман ОМ, Симчич ТВ, Іванченко АВ, Воєйкова ІМ, Чехун ВФ. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю. Патент на корисну модель №141944 UA. Опубл. 12.05.2020, бюл. № 9/2020.

12. Іванченко АВ, Симчич ТВ, Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Караман ОМ. Особливості поляризації макрофагів різних органів і тканин мишей з карциномою легені Льюїс. Тези науково-практичної конференції молодих вчених: «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, 4-5 лютого 2019. Онкологія 2019; 21, 1: 63-64.

13. Чумак А, Федосова Н, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Діденко Г. Дослідження функціонального стану макрофагів у мишей з експериментальними модельними пухлинами. XVI Міжнародна наукова конференція "Молодь і поступ біології", Львів, 27–29 квітня 2020 р.

14. Чумак А, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Федосова Н, Чехун ВФ. Функціональний стан резидентних макрофагів у мишей з модельним пухлинним процесом. XVIII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScience Advances», Київ, травень 2020 р.

15. Чумак А, Симчич Т, Черемшенко Н, Федосова Н. Розробка нового методу імунотерапії раку за допомогою лектину *B. subtilis* IMB 7724. Матеріали науково-практичної конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)». Харків, 16-17 вересня 2020 року.

16. Чумак АВ, Федосова НІ, Караман ОМ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Воейкова ІМ. Протипухлинна активність лектину *B.subtilis* IMB B-7724 у мишей з аденокарциномою Ерліха. XIV з'їзд онкологів та радіологів України. Київ, 30.09– 02.10.2021.

Відомості щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень. Матеріали дисертаційних досліджень відповідають нормам біоетики, що засвідчено висновком комісії з біоетики Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (протокол № 2 від 22.03.2021 року).

Відповідність дисертації вимогам, що пред'являються до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії. За своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням, змістом та оформленням, повнотою висвітлення результатів досліджень у наукових працях дисертаційна робота А.В. Чумак на тему: «Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження)» повністю відповідає вимогам Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167.

ВВАЖАТИ, що дисертаційна робота Чумак А.В. на тему «Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження)» відповідає спеціальності 091 – Біологія та вимогам Порядку підготовки здобувача вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року №261 (зі змінами і доповненнями від 03 квітня 2018 року №283), Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167 та може бути рекомендована до офіційного захисту на здобуття ступеня доктора філософії у разовій спеціалізованій вченій раді зі спеціальності «Біологія».

Рецензенти:

Доктор біологічних наук,

завідувачка лабораторії

проблем метастатичного мікрооточення

ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України

 І.І. Ганусевич

Кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник

відділу моніторингу пухлинного процесу

та дизайну терапії ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького

НАН України



О.О. Лихова