

Голові спеціалізованої вченої ради
ДФ 26.155.004 в Інституті експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
доктору біологічних наук,
старшому досліднику,
зав. лабораторії механізмів медикаментозної резистентності
Лук'яновій Наталії Юрївні

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора, завідувача
кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Сківки Лариси Михайлівни

на дисертацію Чумак Аліни Вікторівни на тему: «Функціональна
поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 в
процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження)»,
подану до захисту на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю
091-Біологія

Актуальність обраної теми дисертації

Пухлино-асоційовані макрофаги (ПАМ) є найбільшою популяцією клітин імунної системи, що інфільтрують злویзне новоутворення, і можуть складати до 50% від загальної маси солідної пухлини. Пухлинне мікрооточення, котре включає продуковані пухлинними клітинами біологічно активні медіатори, а також фізико-хімічні чинники, характерні для пухлинної тканини, такі, як пухлино-асоційована гіпоксія, є визначальним фактором, що формує метаболічний профіль рекрутованих у зону росту пухлини циркулюючих мононуклеарних фагоцитів. На різних етапах росту злویсного новоутворення поляризовані до пропухлинного фенотипу ПАМ стають потужними союзниками пухлини: сприяють проліферації пухлинних клітин, активують процеси пухлинного неоангіогенезу, сприяють локальній інвазії і формуванню віддалених метастазів, опосередковують супресію реакцій адаптивного протипухлинного імунітету. Для багатьох видів пухлин інтенсивна інфільтрація ПАМ, особливо на

периферії злоякісного новоутворення, є негативним прогностичним фактором. З огляду на зазначені обставини ПАМ розглядаються як перспективна мішень для розробки засобів і методів імунотерапії раку. На сьогоднішній день існує три основних підходи у лікуванні раку, спрямовані на ПАМ: запобігання рекрутингу циркулюючих моноклеарних фагоцитів у зону росту пухлини, селективне видалення ПАМ і їх функціональне перепрограмування з відновленням потужного протипухлинного метаболічного потенціалу цих клітин. Останній підхід на думку фахівців є найбільш перспективним, оскільки відновлення протипухлинного функціонального профілю ПАМ не лише повертає їм статус ефекторів протипухлинного вродженого імунітету, а й створює передумови для активації реакцій адаптивного протипухлинного імунного захисту. Саме цим важливим питанням присвячена дисертаційна робота Аліни Вікторівни Чумак і саме вони визначають високий рівень її актуальності за фундаментальними і прикладними аспектами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана на базі лабораторії онкоімунології та конструювання протипухлинних вакцин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, який впродовж багатьох років є провідною академічною установою з розробки методів імунотерапії раку, фахівцями якого закладено основи вакцинотерапії та вакцинопрофілактики онкологічної патології в Україні. Дисертаційне дослідження виконане в рамках науково-дослідних робіт за темами: 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* ІМВ В-7724» (2020-2022 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність

Результати дисертаційного дослідження А.В. Чумак є достовірними та об'єктивними. На основі ґрунтовного аналізу літературних даних за обраною проблематикою дисертанткою логічно визначено основні етапи роботи, котрі включали: аналіз функціональної поляризації резидентних макрофагів різної локалізації в динаміці росту експериментальних пухлин з різними біологічними властивостями; виділення, дослідження структурних характеристик, фізико-хімічних та біологічних властивостей бактеріального лектину *in vitro*, у т.ч. його впливу на метаболічну поляризацію моноклеарних фагоцитів; вивчення впливу досліджуваного бактеріального лектину на ріст і метастазування експериментальних пухлин, тривалість життя тварин з пухлинами, а також на функціональну поляризацію перитонеальних макрофагів *in vivo*. Комплексні методологічні підходи дозволили авторці вичерпно реалізувати поставлені мету та завдання дисертаційного дослідження: дослідити спрямованість функціональної поляризації макрофагів на різних етапах росту експериментальних пухлин за загально визнаними метаболічними маркерами; охарактеризувати ключові структурні і функціональні властивості досліджуваного лектину з використанням фізико-хімічних, молекулярно-біологічних методів та функціональних імунологічних тестів; переконливо продемонструвати протипухлинні властивості досліджуваної сполуки та її здатність до перепрограмування альтернативно поляризованих в умовах росту пухлини макрофагів. Висновки, сформульовані в дисертації, ґрунтуються на аналізі та узагальненні великого об'єму фактичного матеріалу. Статистична обробка та математичний аналіз отриманих результатів проведені з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням.

Слід зазначити, що результати дисертаційного дослідження Аліни Вікторівни Чумак цілком узгоджуються з даними зарубіжних дослідницьких

груп, які працюють у тому ж науковому напрямку. Глікобіологія злоякісної трансформації і пухлинний гліком, як мішень для розробки специфічної протипухлинної терапії – нові напрямки експериментальної онкології і біотехнології, зважаючи на виключну роль процесів глікозилювання у структурі механізмів канцерогенезу та уникнення пухлиною імунного нагляду. У роботі Hu & Tateno, 2018 (Біотехнологічний науково-дослідний інститут з розробки лікарських препаратів, м. Цукуба, Японія) лектини, у контексті цих наукових напрямків, розглядаються як «розшифровувачі гліканів» і перспективні засоби для таргетної терапії раку. У публікаціях наукової групи з Ірландського Національного університету, очолюваної S.V. Glavey, за період 2015-2019 рр. підкреслюється виключна роль пухлинного глікому у процесах метастазування, а сіаловмісні глікани позиціонуються як мішені для профілактики системного поширення пухлинного процесу. У роботі 2020 року N. Mantuano et al. – наукової групи з департаменту Біомедицини Університетської клініки м. Базеля, Швейцарія доведено здатність пухлинних сіаловмісних гліканів чинити імуносупресивний вплив, а також показано, що нейтралізація цих сполук антитілами сприяє відновленню реакцій протипухлинної резистентності тощо.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи

Наукова новизна дисертаційного дослідження А.В. Чумак чітко представлена як на рівні визначення мети і завдань роботи, так і при формулюванні висновків. При постановці мети для дослідження обрано виявлений вперше лектин сапрофітних бактерій, структурно-функціональні характеристики та біологічні ефекти якого досліджені авторкою вперше.

У дисертаційній роботі дістав подальшого розвитку науковий напрямок, присвячений вивченню метаболічного профілю резидентних тканинних макрофагів у динаміці росту пухлин з різними біологічними властивостями. Розширено існуючі уявлення стосовно фенотипово-функціональної гетерогенності моноклеарних фагоцитів, у т.ч. макрофагів різної тканинної локалізації – показано відмінності їх реакції на взаємодію з мало дослідженим

молекулярним патерном бактерій – сіалоспецифічним лектином. Виявлено відмінності у метаболічному профілі резидентних макрофагів окремих анатомічних ніш у мишей різних ліній.

Важливим аспектом новизни дисертаційного дослідження А.В.Чумак, котрий заслуговує гідної оцінки, є виявлені відмінності у протипухлинному та імуномодуляторному ефектах досліджуваного бактеріального лектину в умовах росту пухлин з різними біологічними властивостями, а також у цитотоксичній дії по відношенню до пухлинних клітин різного походження і ступеня злоякісності.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів дисертаційної роботи

Результати дисертаційного дослідження переконливо обґрунтовують перспективність сіалоспецифічного лектину, виділеного із культуральної рідини мікроорганізмів *B. subtilis* IMB B-7724, для створення на його основі біопрепарату з протипухлинною та імуномодуляторною активністю.

Аналіз результатів вивчення зміни функціональної поляризації резидентних моноклеарних фагоцитів на різних етапах росту пухлин з різними біологічними властивостями в умовах дії бактеріального лектину доводить інформативність метаболічних маркерів функціонального профілю цих клітин для оцінки терапевтичної ефективності засобів імунотерапії раку, мішенню яких є мієлоїдні клітини, і окреслює перспективність розробки тест-системи на основі оцінки метаболізму фагоцитів *in vitro* для прогнозування ефективності дії імуномодуляторів.

Виділений та охарактеризований авторкою бактеріальний лектин може бути використаний як зонд для дослідження глікому пухлинних клітин різного гістогенезу і ступеню злоякісності, що демонструють відмінності у чутливості до цієї сполуки *in vitro*.

Матеріали дисертаційної роботи можуть бути використані у навчальному процесі здобувачів освіти освітнього ступеня магістр та доктор філософії у структурі дисциплін з онкології, онкоімунології та біотехнології.

Практичну цінність дисертаційного дослідження засвідчує також охоронний документ, отриманий авторкою за результатами характеристики структури і біологічних властивостей нововиявленого бактеріального лектину.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях

Основні положення та висновки дисертації А.В. Чумак оприлюднені на всеукраїнських і міжнародних фахових наукових та науково-практичних форумах загальною кількістю п'ять, а також опубліковані у десяти фахових періодичних виданнях онкологічного та фармацевтичного профілю, у тому числі у двох часописах, що індексуються міжнародною наукометричною базою даних SCOPUS, а також у фаховому періодичному виданні країни, що входить до Європейського Союзу.

Оцінка змісту дисертації

Дисертація Аліни Вікторівни Чумак побудована за загальноприйнятою схемою. Робота викладена на 162 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, чотирьох розділів результатів власних досліджень, їх аналізу та узагальнення, висновків та списку цитованої літератури, що налічує 229 посилань, більшість яких датовані останніми п'ятьма роками. Робота добре проілюстрована - містить 17 рисунків та 20 таблиць – що значно полегшує сприйняття матеріалу. Структура дисертації повністю відповідає окресленим меті і завданням дослідження та дозволила здобувачці найбільш повно охопити предмет дослідження. Аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушення авторкою вимог академічної доброчесності.

Анотація не містить інформації, яка була б відсутньою у рукописі дисертації. Анотацію та текст рукопису дисертації оформлено відповідно до вимог діючого Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167. Дисертаційне дослідження А.В. Чумак містить посилання на згадані авторкою у тексті джерела інформації у разі цитування ідей, розробок,

тверджень, відомостей. Авторкою дотримано вимоги норм законодавства про авторське право: надано повну і достовірну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методики досліджень.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації

У процесі ознайомлення з дисертацією у порядку дискусії до авторки виникли деякі зауваження і запитання:

1. В оформленні окремих таблиць і рисунків (Рис.4.1.2; Рис.5.1; Рис.6.2.1; Табл.5.1; Табл.6.1.1) не вистачає важливих приміток, а також у підписах частини з них не зазначено кількість тварин у групах. Таблиці 4.1.2 і 4.1.3 варто було об'єднати в одну таблицю і сформулювати перелік застосованих клітинних ліній більш систематизовано.
2. В описі деяких методів використовуються стилістично невдалі формулювання. Наприклад, зазначення дозування лектину у деяких описах схеми експерименту *in vivo* в об'ємі розчину на тварину є недостатнім, оскільки, незалежно від рандомізації, тварини у групі мають різну вагу. В описі методу оцінки цитотоксичної дії лектину *in vitro* відсутній перелік клітинних ліній. В описі методу виділення легеневих макрофагів відсутнє посилання на першоджерело або вказівка на те, що метод є авторським. У тексті рукопису трапляються також деякі термінологічні неточності.
3. Показники співвідношення NO/Arg фагоцитів інтактних тварин лінії C57Bl/6J майже втричі більші за аналогічні показники у тварин лінії Balb/c? Чим автори пояснюють це явище?
4. Як можна охарактеризувати поляризаційний стан легеневих, селезінкових та перитонеальних макрофагів у інтактних тварин?
5. У висновках зазначено, що результати дисертації експериментально обґрунтовують доцільність використання досліджуваного бактеріального лектину для підвищення ефективності протипухлинної імунотерапії. Якою, на думку авторів, може бути схема застосування такого препарату у комплексному лікуванні онкологічної патології?

Усі висловлені зауваження не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Чумак Аліни Вікторівни на тему: «Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження)» є самостійним, завершеним науковим дослідженням, результати якого забезпечують розв'язання актуального наукового завдання в галузі науки 09 Біологія: експериментально обґрунтовують можливість і перспективність застосування сіалоспецифічного лектину сапрофітних бактерій *B. subtilis* IMB B-7724 для розробки на його основі препарату для біотерапії раку зі здатністю гальмувати ріст пухлини і відновлювати протипухлинну активність резидентних макрофагів.

Дисертаційна робота А.В.Чумак відповідає спеціальності 091-Біологія та вимогам Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167, а її авторка Чумак Аліна Вікторівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, професор



Підпис
Вчена рада
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
04.10.2021р.

Лариса СКІВКА