

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 Юріївні

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, професора, професора кафедри онкології
Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця

ЧЕШУКА ВАЛЕРІЯ ЄВГЕНОВИЧА

на дисертаційну роботу аспірантки

Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології
імені Р.Є Кавецького НАН України

ЧУМАК АЛІНИ ВІКТОРІВНИ

**«Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину
B. subtilis. IMB B-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу
(експериментальне дослідження)»**

представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26.155.004 в
Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, утворену відповідно до наказу
Міністерства освіти і науки України від 02.12.2021 № 1296 для розгляду та
проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми. Як завжди, актуальним залишається пошук нових методів та засобів підвищення ефективності лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями. Перелік речовин з протипухлинною дією розширюється за рахунок лікарських засобів, що мають імунотерапевтичну дію (блокатори різних ключових точок імунної відповіді) і здатні оптимізувати імунну відповідь пацієнта. Відомо, що реакції протипухлинного імунітету відіграють значну роль в контролюванні розвитку рецидивів та метастазів первинної пухлини. Тому застосування засобів, які запобігають зниженню ефективності імунної відповіді внаслідок імуносупресорного впливу як самої пухлини, так і агресивного впливу хіміо- та променевої терапії може виявитись ефективним при лікуванні таких пацієнтів.

Новим напрямком в імунотерапії пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями є використання засобів, які впливають на ключові точки імунної відповіді – PD-1, PD-L1, CTLA-4, ICOS, LILRB2,4, CCR8 ефекторів протипухлинного імунітету, змінюючи їх функціональну активність. Перспективними ефекторами природного імунітету видаються макрофаги, завдяки їх здатності до швидкої зміни функціонального стану в залежності від стимулів, які вони отримують з локального мікрооточення. Розрізняють макрофаги, що були активовані класичним (M1) або альтернативним (M2) шляхами, протипухлинні та пропухлинні. Макрофаги відрізняються особливою пластичністю, що дозволяє припустити можливість їх реполяризації з M2 в M1 за допомогою засобів біотерапії. Враховуючи вищезазначене, дослідження механізмів функціональної активності макрофагів при виникненні та прогресії пухлинного процесу, розробка M1-спрямованої поляризації цих клітин, є одним із сучасних підходів протипухлинної імунотерапії, який підсилить ефективність уже впроваджених лікарських засобів для імунотерапії.

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.).

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 наявності 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 його використання як перспективного засобу протипухлинної імунотерапії.

Вперше визначено, що імуномодулююча 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.

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. За темою 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.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам. Дисертація Чумак Аліни Вікторівни побудована за загальноприйнятою формою, що відповідає вимогам МОН України. Робота викладена на 162 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, 4 розділів результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури, що налічує 229 посилань, більшість яких датовані в останні 5 років. Робота містить 17 рисунків та 20 таблиць.

У **вступі** обґрунтована актуальність теми дослідження, чітко сформульовані мета та 7 завдань досліджень, викладені наукова новизна і практична значимість отриманих результатів, відомості про особистий внесок здобувача, апробацію та публікацію результатів виконаної дисертаційної роботи, що дає цілісне уявлення про суть і зміст роботи. Слід зазначити, що робота була успішно виконана згідно поставлених завдань, що відображено у висновках роботи.

В розділі **Огляд літератури** Аліна Вікторівна висвітила сучасний стан проблеми, детально охарактеризувала фенотипово/функціональні характеристики макрофагів. При цьому авторкою було детально проаналізовано досить велику кількість нових, переважно закордонних, публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Із джерел літератури лише 25% мають давність більше 5 років. Даний розділ доречно структурований, містить сучасні дані світової літератури щодо молекулярних механізмів, що задіяні в поляризації макрофагів, розглянуто сучасні підходи до перепрограмування пухлино-асоційованих макрофагів. Наведено інформацію щодо лектинів як потенційних агентів зміни функціонального стану макрофагів. Узагальнений аналіз сучасних даних наукової літератури переконливо свідчить про наявність феномену пластичності макрофагів в процесі пухлинного росту і перспективність розробки стратегії протипухлинної імунотерапії, яка була б спрямована на перепрограмування цих клітин в напрямку формування фенотипу M1 (з прозапальними та

протипухлинними властивостями). Потенційними агентами такої спрямованої зміни функціонального стану макрофагів можуть слугувати лектини, зокрема одержаний в ІЕПОР НАНУ ім. Р.Є. Кавецького оригінальний лектин з *B.subtilis* IMB B-7724.

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудований за традиційною схемою і включає широкий комплекс сучасних методів дослідження (імунологічні, біохімічні, біофізичні, молекулярно-біологічні, методи культур клітин і методи експериментальної онкології), використання яких дозволило адекватно вирішити всі завдання роботи. Детально описані методичні прийоми та підходи, методи ПЛР-діагностики; наведено послідовності праймерів досліджуваних генів; вказані методи статистичного аналізу.

Результати власних досліджень викладені у 4 розділах. Розділ 3 дисертаційної роботи містить результати оцінки функціонального стану макрофагів в процесі росту експериментальних пухлин різного гістогенезу. Автор вказує, що аналіз функціонального стану макрофагів, виділених з низьки анатомічних ніш (перитонеальної порожнини, селезінки, пухлинної тканини та легень) в динаміці росту пухлин (аденокарцинома Ерліха (АКЕ) та карцинома легені Льюїс (КЛЛ)), свідчить про поступову зміну поляризації макрофагів від фенотипу M1 (латентна стадія росту) до фенотипу M2 (термінальна стадія).

У розділі 4 «Фізико-хімічні та біологічні властивості лектину *B. subtilis* IMB B-7724» вперше представлені дані щодо хімічного та амінокислотного складу лектину *B. subtilis* IMB B-7724, а також вуглеводної специфічності цього лектину. В цьому розділі представлені результати визначення цитотоксичної активності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 *in vitro* по відношенню до пухлинних клітин різного походження (клітин асцитної і солідних пухлин мишей: L1210, АКЕ та КЛЛ; клітин солідних пухлин щурів: карциносаркома Уокера 256 та карцинома Герена; ряду клітинних ліній: K-562, MCF-7, MDA-MB-231, J-774, A-549). Окрім того, в розділі 4 досліджено, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 володіє *in vitro* дозозалежною

імуномодулюючою дією, щодо клітин лімфоцитарного та макрофагального ряду.

Результати, представлені у розділі 5 «Оцінка поляризації макрофагів інтактних мишей за умови застосування *in vitro* лектину *B. subtilis* IMB B-7724» показують, що при дії низьких концентрацій бактеріального лектину відбувається суттєве збільшення співвідношення NO/Arg в бік зростання продукції NO, що є характерним для макрофагів з фенотипом M1. Лектин *B. subtilis* IMB B-7724 призводить до зростання співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 – компонентів JAK-STAT сигнального шляху, в макрофагах, яке достовірно не відрізняється від відповідних показників за сумісної дії LPS та IFN- γ .

У 6 розділі власних досліджень «Вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на функціональну поляризацію макрофагів в процесі росту АКЕ», здобувач зазначає, що застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 у мишей з АКЕ гальмувало ріст прищепленої пухлини (АКЕ) та сприяло збереженню M1 стану перитоніальних макрофагів протягом всього періоду спостереження, про що свідчить достовірне збільшення порівняно з показниками нелікованих тварин рівнів співвідношення NO/Arg, а також збільшення співвідношень рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1/STAT6 (на 21-у добу) та IRF5/IRF4 (на 28-у добу) порівняно з показниками інтактних тварин.

Обговорення та узагальнення отриманих результатів проведено в достатньому об'ємі. Надані пояснення щодо виявлених нових фактів з урахуванням результатів вже відомих досліджень (власних та інших авторів).

Висновки повною мірою відображають отримані результати.

Оцінка змісту дисертації. Дисертація є комплексним повноцінним дослідженням, якому притаманні: аргументованість обраної теми; вдале планування експерименту та формулювання задач дослідження, що повністю відповідають 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, які не були отримані дисертанткою безпосередньо 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.

До дисертаційної роботи є деякі **зауваження та запитання**, які не зменшують загальну позитивну оцінку роботи.

1. В огляді літератури було б доречно навести більше інформації стосовно лектинів мікробного походження.

2. Дисертаційна робота містить деякі стилістичні та граматичні помилки, наприклад відсутні у списку скорочень аббревіатури НМЛР та ММТ-тест які зустрічаються в тексті.

Запитання

1. Чому при дослідженні протипухлинної ефективності лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 в експериментальній моделі пухлинного росту КЛЛ було виявлено зменшення розміру (мм³) первинного пухлинного вузла на 35-ту добу на 22% в порівнянні з контролем, а середня тривалість життя з моменту перещеплення пухлинних клітин була меншою на 12% ніж в групі контролю?
2. Чим обумовлена протипухлинна дія лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 в експериментальній моделі пухлинного росту АКЕ: прямою токсичною чи опосередкованою через збереження протипухлинної активності макрофагів і чому не було виявлено протипухлинної дії на моделі КЛЛ?
3. В попередні роки в інституті ім. Р.Є. Кавецького була розроблена і клінічно апробована протипухлинна аутовакцина, яку виготовляли, використовуючи культуральну рідину, тобто суміш продуктів мікробного синтезу (включаючи лектин) мікроорганізму родини *B. subtilis*, а також досліджено деякі імунологічні механізми дії такої вакцини. В чому полягає новизна вашої роботи порівняно зі згаданими дослідженнями?

Висновок. Дисертаційна робота Чумак Аліни Вікторівни «Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження)» є завершеною науковою працею, яка розширює 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. Актуальність теми, новизна дослідження, його сучасний методичний рівень, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, свідчать про високий науково-професійний рівень здобувачки, а дисертаційна робота Чумак Аліни Вікторівни «Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* IMB B-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. Тому вважаю, що здобувачка заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

д.м.н., професор,
професор кафедри онкології
Національного медичного університету
Ім. О.О. Богомольця



В.С. Чешук

