

Голові спеціалізованої вченої ради ДФ 26.155.003
в Інституті експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
доктору біологічних наук,
старшому науковому співробітнику
зав. відділу біохімії пухлин та онкофармакології
Залеток Софії Петрівні

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора, професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу аспіранта
Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології
імені Р.Є Кавецького НАН України

ЩЕРБІНИ ВАЛЕРІЇ МИХАЙЛІВНИ

**«Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із
чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків»**

представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26.155.003 в Інституті
експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН
України, утворену наказом МОН від 11.08.2021 № 903 для розгляду та проведення
разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертації. Ефективність лікування хворих на
хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) має значні коливання серед пацієнтів і тому постає
потреба пошуку нових підходів до удосконалення схем терапії, зокрема за
рахунок оцінки предиктивної значимості профілю експресії молекулярних
мішеней в тому числі серед тих, які використовуються для прогнозування та
діагностики даного захворювання. Тому, важливим є визначення ряду

молекулярних маркерів, оцінка характеру експресії яких дозволить більш персоналізовано спрогнозувати та підібрати адекватну схему хіміотерапії для лікування хворих на ХЛЛ. В цьому зв'язку найбільш вагомими та потенційно значимими маркерами є диференційно експресовані поверхневі рецептори, що регулюють стан сигнальних шляхів в клітинах і можуть бути залучені до формування біологічних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, у тому числі їх чутливості до хіміотерапії.

Дисертаційна робота Щербіни Валерії Михайлівни «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків» присвячена пошуку та характеристиці предиктивних факторів, що потенційно можуть бути маркерами ефективності відповіді хворих на ХЛЛ на застосування хіміотерапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України в рамках виконання науково-дослідних робіт «Рецептор-опосередковані сигнальні каскади у патобіології злоякісно трансформованих клітин при хронічному лімфолейкозі» (2017-2019 рр., № державної реєстрації 0116U007817), гранту НАН України дослідницьким лабораторія/групам молодих учених «Пошук нових підходів до регуляції патобіології хронічного лімфолейкозу» (2018-2019 рр., № державної реєстрації 0118U002325) та стипендії Президента України для молодих вчених «Пошук шляхів підвищення чутливості клітин хворих на В-ХЛЛ до дії хіміопрепаратів (експериментальні дослідження)» (2020-2022 рр.).

Наукова новизна одержаних результатів. В дисертаційній роботі Щербіни Валерії Михайлівни визначено спектр ключових маркерів імунофенотипового та цитокінового профілю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів при ХЛЛ, які потенційно можуть бути використані у якості предиктивних факторів чутливості до дії цитостатиків.

Вперше серед імунофенотипових маркерів, які включені до діагностичної панелі ХЛЛ, виявлені такі, що асоційовані із високою чутливістю В-лімфоцитів до дії цитостатиків: до бендамустина (БН) при фенотипі CD5^{M>}, CD37^{M<}, CD38⁻ та

CD40^{M<}, до циклофосфаміду (ЦФ) за умов експресії CD5 та CD20. Вперше з'ясовано предиктивну значимість CD150 та CD180 при ХЛЛ: наявність експресії CD150 та/або CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ асоційована із низькими показниками життєздатності цих клітин за умов дії флударабіну (ФЛ) у монорежимі, а також у комбінації із ЦФ.

Вперше доведено можливість підвищення чутливості В-лімфоцитів до БН *ex vivo* за рахунок активації CD180-опосередкованого сигнального шляху, що призводить до зменшення кількості життєздатних клітин майже в 10 разів.

Доповнені наукові відомості щодо експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4 та IL-6, IL-10 у В-лімфоцитах при ХЛЛ з урахуванням їх імунофенотипу. Вперше встановлено, що для CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів властивий достовірно вищий рівень експресії мРНК CCL3 і CCL4, а також низька експресія IL-6 та IL-10 як на рівні мРНК, так і білка, порівняно із відповідними показниками у CD150⁻CD180⁻ клітинах ($p < 0,05$). Виявлено, що активація CD150 та/або CD180 обумовлює достовірне зниження рівня експресії мРНК IL-6 і IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та зменшує секрецію ними імуносупресорного IL-10 *ex vivo*. Вперше встановлено предиктивну значимість показників високого рівня (M[>]) експресії мРНК CCL3 і CCL4 до цитотоксичної дії ФЛ і БН та низького рівня експресії (M[<]) мРНК IL-10 і IL-6 - до ФЛ і ЦФ, а також до БН відносно IL-10 *ex vivo*.

Практичне значення дисертаційної роботи Отримані в ході виконання дисертаційного дослідження результати доводять необхідність комплексного підходу при виборі схеми лікування хворих на ХЛЛ із урахуванням анамнезу пацієнтів та предиктивних маркерів молекулярного профілю В-лімфоцитів, асоційованих із чутливістю до дії цитостатиків, що забезпечить індивідуальний підбір оптимальної схеми лікування. При імунофенотипуванні злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ виявлено значну гетерогенність у рівнях експресії CD22, CD38, CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин, тоді як експресія CD5, CD20, CD37 та CD40 є стовідсотковою у всіх досліджених випадках. Враховуючи вперше встановлену предиктивну значимість імунофенотипових маркерів, включених до діагностичної панелі

лімфопроліферативних захворювань, індивідуалізація лікувальної тактики хворих на ХЛЛ можлива вже на етапі встановлення діагнозу.

Зважаючи, що В-лімфоцити хворих на ХЛЛ характеризуються низьким рівнем експресії CD20 на плазматичній мембрані порівняно із нормальними В-лімфоцитами, отримані дисертантом фундаментальні дані щодо підвищення рівня експресії даного антигена шляхом активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних каскадів є підґрунтям для розробки нових підходів до підвищення ефективності анти-CD20 таргетної терапії. Крім того, виявлена можливість регулювати чутливість В-лімфоцитів до дії БН через лігацію CD180 дозволяє наблизитись до розробки стратегії підвищення ефективності хіміотерапії через активацію поверхневих рецепторів у тих хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких мають низьку чутливість до зазначеного хіміопрепарату.

Безпосереднє залучення CD150 та CD180 до негативної регуляції рівня експресії та секреції злоякісно трансформованими В-лімфоцитами імуносупресорного IL-10, який є фактором несприятливого прогнозу перебігу ХЛЛ, вказує на необхідність подальших досліджень, спрямованих на зниження рівня секреції IL-10 та інгібування IL-10-залежного стану загальної імуносупресії при ХЛЛ.

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. Представлені у дисертаційній роботі дані опубліковано у 10 наукових працях, із них 4 статті, 2 з яких у журналах, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та 2 статті в наукових виданнях держав, що входить до Організації економічного співробітництва та розвитку, 1 інформаційний лист МОЗ України та 5 тез у збірках наукових конференцій.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертація Щербіни Валерії Михайлівни побудована за загальноприйнятою формою, що відповідає вимогам МОН України. Робота викладена на 160 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, 3 розділів результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури, що налічує 207 посилань, більшість яких датовані в останні 5 років. Робота містить 20 рисунків та 20 таблиць.

В розділі **Огляд літератури** Валерія Михайлівна висвітила сучасний стан проблеми, детально охарактеризувала гени, що кодують ключові фактори та ензими, які залучені у контроль процесів прогресування ХЛЛ. При цьому авторкою було детально проаналізовано досить велику кількість нових, переважно закордонних, публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Даний розділ доречно структурований, містить сучасні дані світової літератури щодо існуючих маркерних молекул, характерних для патофізіології даного захворювання, розглянуто ключові таргетні мішені, що використовуються в лікуванні ХЛЛ, вказано найбільш значимі діагностичні та прогностичні маркери ХЛЛ. Наведено сучасні схеми терапії ХЛЛ. У підсумку до даного розділу зазначається, що незважаючи на певні успіхи в лікуванні даного захворювання, особливо з використанням таргетної терапії, існує необхідність пошуку нових молекулярно-біологічних маркерів В-лімфоцитів при ХЛЛ, які можна було б використовувати у якості предиктивних факторів, як значимих показників оцінки характеру відповіді на певну схему лікування.

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудовано за традиційною схемою і налічує імунологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні методи, а також аналіз клініко-лабораторних показників хворих на ХЛЛ. Методичні прийоми та підходи детально описані, наведено послідовності праймерів досліджуваних генів, детально описані методи ПЛР-діагностики, вказані методи статистичного аналізу. Імунофенотипування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ проведено із використанням достатньо широкого спектру маркерів. Однак існують деякі зауваження та неточності в описі методів дослідження:

1. Перший підрозділ «Клінічна характеристика хворих на хронічний лімфолейкоз, які були включені в дослідження» звучить некоректно – в даному підрозділі йде мова про лабораторно-діагностичний матеріал від хворих, можливо так і потрібно було б це назвати.

2. Коли йде мова про використання методу центрифугування для отримання певних популяцій клітин, або ж сироватки чи плазми крові варто вказувати не кількість обертів, а більш уніфікований показник - коефіцієнт седиментації (g), або ж марку центрифуги.

3. Підрозділ 2.5.Індукція сигналу (якого?) через поверхневі рецептори у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз – не вдала назва.

Результати власних досліджень викладені у 3 розділах. Розділ 3 Чутливість в-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків *ex vivo* з урахуванням їх імунофенотипу складається із 2 підрозділів. В одному із підрозділів наведені дані щодо підбору оптимальних концентрацій хіміопрепаратів для подальшого використання в експериментальних дослідженнях. Зокрема зазначено, що для хіміопрепаратів ЦФ та ФЛ їх оптимальні концентрації при використанні в монорежимі та за умов комбінованого впливу є різними. Зважаючи на це виникає запитання:

Скажіть, будь ласка, в яких дозах використовують зазначені хіміопрепарати для лікування хворих на ХЛЛ в клініці та чи змінюються ці дози залежно від обраної схеми комбінованої хіміотерапії?

Крім того в даному розділі ідентифіковано зв'язок між рівнем експресії імунофенотипових маркерів В-лімфоцитів та чутливістю клітин до хіміопрепаратів. Зокрема, визначено, що високий рівень чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до БН асоціюється з наявністю CD37^{M[<]}, CD38⁻ та CD40^{M[<]} фенотипу, в той час як низький рівень експресії CD5, навпаки, свідчить про низьку чутливість В-лімфоцитів до БН *ex vivo*.

В Розділі 4 охарактеризовано чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитостатиків *ex vivo* з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180. Попередньо відомо, що дані фенотипові маркери за їх одночасної активації призводять до пригнічення Akt та MAPK сигнальних шляхів, які координують

проліферацію злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Було виявлено, що чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії БН, ФЛ і ЦФ у монорежимах *ex vivo* з різним статусом експресії CD150 або CD180 не була достовірно значущою. За комбінації ФЛ і ЦФ було встановлено достовірну різницю у показниках чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ залежно від статусу експресії CD180. Також зафіксовано підсилення цитотоксичного ефекту при комбінованому впливі ФЛ і ЦФ на CD150⁺ В-лімфоцити порівняно із таким, що спостерігається за умов дії ФЛ та ЦФ у монорежимах. Проте виникло запитання до даного підрозділу:

Доцільно було б порівняти отримані результати із чутливістю В-лімфоцитів до вищезазначених схем хіміотерапії, отриманих від умовно здорових донорів. Чи були проведені такі експерименти? Чи можливо є відомості щодо токсичної дії циклофосфаміду, флударабіну та бендамустину на нормальні лімфоцити?

Методичний підхід, пов'язаний із лігацією CD150 та CD180 специфічними антитілами на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ не впливав на ступінь їх чутливості до дії ФЛ, БН *ex vivo*, однак активація CD180 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах обумовлює зростання ступеня їх чутливості до цитотоксичного впливу БН *ex vivo*. При цьому важливо відмітити, що наслідком культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із одночасним внесенням анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ до середовища культивування клітин, чутливість В-лімфоцитів до дії БН залишається на рівні такої, що спостерігається при активації лише CD180, однак при цьому знижується чутливість В-лімфоцитів до дії ФЛ *ex vivo*. Автором зазначається, що стан активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів не визначає ступінь чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичного впливу ЦФ *ex vivo*.

Щодо даного блоку експериментальних досліджень, виникає запитання, а яким чином такий підхід можливо екстраполювати щодо клінічного застосування в хворих на ХЛЛ, чи це лише теоретичні, експериментальні спроби розібратись із сигнальними каскадами, пов'язаними із експресією терапевтично

потенційно значимих фенотипових маркерів CD150 та CD180 за даної патології?
Яка роль CD150 та CD180 в прогресії/регресії ХЛЛ?

Розділ 5 присвячено характеристиці цитокінового профілю хворих на ХЛЛ та залежності чутливості їх В-лімфоцитів до хіміопрепаратів від наявності/відсутності певних цитокінів в плазмі крові хворих та ХЛЛ.

В ході аналізу автором встановлено різницю в показниках базального рівня експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 залежно від статусу експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Зокрема було показано, що для CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ характерними є високі рівні експресії мРНК CCL3 та CCL4 та низькі – IL-6 та IL-10 порівняно із CD150⁻CD180⁻ клітинами. Згідно проведених експериментальних досліджень даного розділу було вперше встановлено, що лігація CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ призводить до достовірного зниження рівня експресії мРНК як IL-6, так і IL-10. Отримані дані дозволяють припустити, що сигнальні каскади, опосередковані через CD150 та CD180 можуть брати участь у негативній регуляції експресії мРНК зазначених цитокінів. Слід відмітити, що найбільший інгібуючий ефект на показники експресії мРНК IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах досягається за умов лігації лише CD150 порівняно із таким, який спостерігається у разі лігації лише CD180 або при одночасній активації обох рецепторів. Рівень експресії білка IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ також асоціювався зі статусом експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин і був вищим у В-лімфоцитах, негативних за експресією обох досліджених рецепторів.

Оцінка чутливості В-лімфоцитів до ФЛ, ЦФ та БН в залежності від показників експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 та вмісту даних цитокінів в плазмі крові хворих на ХЛЛ було встановлено, що високий (М[>]) рівень експресії мРНК CCL3/CCL4 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ вказує на їх високий ступінь чутливості до цитотоксичної дії ФЛ та БН *ex vivo* та не асоціюється із чутливістю до ЦФ. Низький рівень експресії мРНК IL-6 також асоціюється із високою чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ або ЦФ. Вміст цитокінів IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ не корелює зі ступенем

чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії ФЛ, ЦФ та БН.

В розділі **Аналіз та обговорення результатів** Валерією Михайлівною наголошується про роль персоналізованої терапії ХЛЛ, що вимагає розширення і вдосконалення підходів до лікування з урахуванням молекулярного профілю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів кожного конкретного пацієнта і має на меті оптимізацію алгоритму вибору найбільш ефективної схеми терапії з одночасною мінімізацією її побічних проявів. Дослідження останніх років, спрямовані на аналіз молекулярно-генетичних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, виявили низку маркерів, що диференційно експресовані серед випадків ХЛЛ та мають зв'язок із прогнозом перебігу даного захворювання, а тому можуть претендувати на роль предиктивних маркерів даної нозології. Закономірним продовженням відкриття нових прогностичних маркерів перебігу ХЛЛ став стрімкий розвиток ланки таргетної терапії. В розділі наведено авторські узагальнюючі схеми щодо експресії досліджених маркерів В-лімфоцитів при ХЛЛ та їх чутливості *ex vivo* до різних схем хіміотерапії. При аналізі даного розділу виникає ряд коротких запитань:

1. Скажіть, будь ласка, чи Вам відомо, які протоколи на сьогодні переважно використовуються при лікуванні ХЛЛ у світі?

2. Які перспективи щодо ефективності лікування ХЛЛ при впровадженні результатів Ваших досліджень в клінічну практику?

Висновки, які логічно випливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Наукові положення, наведені в дисертації Щербіни Валерії Михайлівни, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики (протокол №01 від 16.03.2021 року).

Дисертаційна робота Валерії Михайлівни заслуговує на позитивну оцінку, незважаючи на ряд запитань та зауважень, які виникли в процесі рецензування роботи, і, загалом, не знижують наукової цінності роботи, оскільки вони стосуються головним чином інтерпретації її результатів.

Висновок. Дисертаційна робота Щербіни Валерії Михайлівни «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків» є завершеною науковою працею, яка розкриває молекулярні механізми чутливості хронічного лімфолейкозу до хіміопрепаратів в залежності від гетерогенності пухлинних клітин, їх фенотипу та мікрооточення. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, а також сучасний методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високі наукові досягнення здобувачки, а дисертаційна робота Щербіни Валерії Михайлівни «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків» повністю 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). Тому вважаю, що здобувачка заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

д.б.н., проф.,
проф. кафедри зоології та екології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

П.В. Гарманчук



Підпис засідача
вченої секретар ННЦ
КАРАУЛЬНА Н.В.
19.10.2021р.