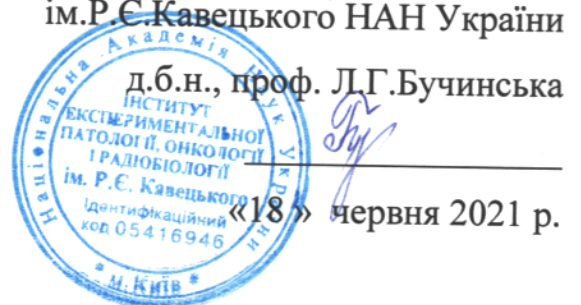


«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім.Р.Є.Кавецького НАН України



д.б.н., проф. Л.Г.Бучинська

«18» червня 2021 р.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації Щербіни Валерії Михайлівни на тему «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія»

Комісія у складі д.б.н., ст. досл. Н.Ю. Лук'янової та к.б.н. М.П. Завелевича проаналізувала результати виконання здобувачем ступеня доктора філософії, аспірантом Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України В.М. Щербіни освітньо-наукової програми, ознайомила із 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 наукової праці на правах рукопису, є закінченою самостійною роботою, виконаною на сучасному науково-методичному рівні.

Актуальність теми. Хронічний лімфлейкоз (ХЛЛ) є найбільш розповсюдженою нозологічною формою лімфопроліферативних захворювань, при якому внаслідок розбалансування механізмів елімінації В-лімфоцитів відбувається їх клональна експансія, що призводить до накопичення зрілих неопластичних клітин у периферичній крові, кістковому мозку та вторинних лімфоїдних органах хворих. Перебіг пухлинного процесу характеризується значною варіабельністю серед пацієнтів з ХЛЛ. Здебільшого дане захворювання протікає індолентно протягом тривалого часу і тому для більшості хворих на ХЛЛ застосовується тактика постійного моніторингу та динамічного спостереження. Однак, в частині випадків, відбувається раптовий перехід індолентної форми ХЛЛ в агресивну, що супроводжується клінічною маніфестацією пухлинного процесу, за якого обов'язковим є негайне призначення хіміотерапії (ХТ).

Гетерогенність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів за молекулярно-генетичними параметрами вимагає постійного удосконалення підходів до лікування хворих на ХЛЛ, зокрема розширення спектра медикаментозних препаратів, а також алгоритмів їх підбору. Однак, не зважаючи на терапевтичний ефект, що спостерігається у разі застосування комплексної терапії при лікуванні хворих на ХЛЛ, ефективність дії окремих препаратів, що входять до складу схем ХТ характеризується значною варіабельністю серед пацієнтів. Тому пошук можливих маркерів, використання яких дозволить виокремити групи пацієнтів з ХЛЛ із прогнозовано вищою ефективністю до певних компонентів схем ХТ сприятиме покращенню безпосередніх та віддалених результатів лікування цього контингенту хворих.

Додатковим аргументом на підтримку важливості удосконалення сучасних стандартів підбору схем ХТ для лікування хворих на ХЛЛ з урахуванням маркерів індивідуалізованої чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до хіміопрепаратів є факт того, що вибір між

схемами терапії, зокрема флударабін- та бендамустин-вмісними, обумовлений здебільшого віком пацієнта та наявністю супутніх захворювань.

Серед потенційних кандидатів на роль предиктивних маркерів особливе місце займають диференційно експресовані поверхневі антигени, які мають сигнальні властивості, і завдяки цьому можуть бути залучені до формування біологічних особливостей злоякісно трансформованих клітин, у тому числі і чутливості до ХТ.

Вагоме місце у координації процесів, від яких залежать проліферативна активність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, ступінь їх чутливості до хіміопрепаратів, а також темпи і характер прогресування ХЛЛ загалом, належить елементам мікрооточення. Окрім елементів строми та інфільтруючих клітин, активними учасниками формування локального мікрооточення є власне злоякісно трансформовані В-лімфоцити, які здатні до активної секреції цитокінів та подальшого ауто- та паракринного впливу. До ключових цитокінів, що секретують В-лімфоцити, рівень вмісту в плазмі крові хворих на ХЛЛ яких має прогностичне значення, належать CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10. Проте до цього часу не існує певного погляду на використання зазначених цитокінів у якості предиктивних маркерів у хворих на злоякісні новоутворення. Враховуючи все вище викладене, доцільним є з'ясування предиктивного значення маркерів імунофенотипового та цитокінового профілю при ХЛЛ, що дозволить удосконалити алгоритм підбору схем ХТ з урахуванням клінічних характеристик кожного конкретного пацієнта.

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 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.).

Достовірність та обґрунтованість отриманих результатів та висновків: Робота виконана в результаті дослідження злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, виділених з периферичної крові 82 хворих на ХЛЛ. З метою з'ясування предиктивної значимості маркерів імунотипового та цитокінового профілю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, проведено детальний аналіз рівня їх експресії та пошук асоціативних зв'язків із чутливістю В-лімфоцитів до цитотоксичної дії компонентів схем ХТ.

В ході виконання роботи були використані наступні методи дослідження: імунотипування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів за допомогою непрямого варіанту імунофлуоресцентного методу з використанням проточної цитометрії, резазуриновий тест для оцінки життєздатності клітин після їх культивування в присутності хіміопрепаратів. Культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ у присутності МКАТ проти поверхневих рецепторів було використано з метою активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів для з'ясування їх ролі у формуванні ступеня чутливості цих клітин до цитостатиків. Рівень експресії мРНК ізоформ CD150 та цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 оцінювали методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Вестерн блот аналіз було застосовано для оцінки рівня експресії білків IL-6 та IL-10 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, а твердофазний імуносорбентний сендвіч-метод ELISA - з метою детекції вмісту IL-6 та IL-10 в сироватці крові

хворих на ХЛЛ та середовищі культивування злякисно трансформованих В-лімфоцитів. Достовірність отриманих результатів визначалась з використанням статистичних методів.

Застосування широко спектру методик повністю відповідає поставленим завданням. Аналіз результатів досліджень знайшов своє відображення у науково обґрунтованих висновках, які належно аргументовані і свідчать про завершеність здійсненого здобувачем дослідження. При вивченні сучасного стану проблеми за темою дисертації було опрацьовано 207 літературних джерел, у тому числі 202 зарубіжних.

Наукова новизна отриманих результатів. В результаті комплексного підходу із застосуванням сучасних методів дослідження ідентифіковано спектр маркерів імунотипового та цитокінового профілю злякисно трансформованих В-лімфоцитів при ХЛЛ, які потенційно можуть бути використані у якості предиктивних факторів чутливості до цитостатиків.

Вперше серед імунотипових маркерів, які включені до діагностичної панелі ХЛЛ, виявлені такі, що асоційовані із високою чутливістю В-лімфоцитів до дії протипухлинних препаратів. Зокрема, встановлено зв'язок між високою чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії бендамустину (БН) та фенотипом клітин, що включає підвищену експресію CD5, зменшену експресію CD37 та CD40 за відсутності CD38. Достовірно краща чутливість до дії циклофосфаміду (ЦФ) виявлена за умов експресії CD5 та CD20 на рівні вище значення медіани серед дослідженої вибірки хворих на ХЛЛ.

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, що може бути обумовлено характером експресії деяких ізоформ CD150 у В-лімфоцитах. Так, достовірно більш чутливими до

дії ФЛ виявилися В-лімфоцити, у яких визначався високий рівень експресії мРНК mCD150 та низький рівень експресії nCD150, а до ЦФ – за умов низького рівня експресії мРНК ізоформи mCD150.

Вперше доведено, що активація CD180-опосередкованого сигнального шляху дозволяє значно підвищити чутливість В-лімфоцитів до БН *ex vivo*.

Доповнені наукові відомості щодо асоціації експресії цитокінів CCL3, CCL4 та IL-6, IL-10 з імунотиповими особливостями В-лімфоцитів при ХЛЛ. Вперше встановлено, що характерною ознакою CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів є високий 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 сприяє зменшенню секреції ними імуносупресорного IL-10 *ex vivo* ($p < 0,05$). Вперше доведено, що показники рівня експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-10 та IL-6 можуть бути використанні у якості предиктивних чутливості до дії цитостатиків. Зокрема, за умов високого рівня експресії мРНК CCL3 і CCL4 клітини хворих на ХЛЛ є більш чутливі до дії ФЛ і БН, а низького рівня експресії мРНК IL-10 і IL-6 – до дії ФЛ і ЦФ. Підвищена чутливість В-лімфоцитів при ХЛЛ до БН встановлена лише тоді, коли клітини мають низький рівень експресії мРНК IL-10.

Практичне значення. Отримані в ході виконання дисертаційного дослідження результати аргументують необхідність застосування комплексного підходу до вибору схеми лікування хворих на ХЛЛ із урахуванням клінічних характеристик пацієнтів та ідентифікованих предиктивних маркерів молекулярного профілю В-лімфоцитів, асоційованих із чутливістю до дії цитостатиків, що забезпечує індивідуальний підбір оптимальної схеми терапії. Враховуючи вперше встановлену предиктивну значимість імунотипових 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 фундаментальні дані щодо підвищення рівня експресії даного антигена шляхом активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних каскадів може стати підґрунтям для розробки нових підходів до підвищення ефективності анти-CD20 таргетної терапії. Крім того, враховуючи, що за умов лігації CD180 на В-лімфоцитах при ХЛЛ чутливість клітин хворих до дії БН зростає до 10 разів, даний підхід слід враховувати при оптимізації застосування даного препарату.

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 пухлинного процесу, вказує на необхідність проведення подальших досліджень, спрямованих на розробку підходів до інгібування IL-10-залежного стану загальної імуносупресії при ХЛЛ.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені 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 міжнародним представництвом (Яремче, Україна, 2019 р.), II міжнародній конференції «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem» (Київ, 2019 р.) та XVI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2020 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно опрацьовано та проаналізовано наукову літературу згідно тематики дослідження, виконано основний об'єм експериментальних досліджень та їх статистичну обробку.

Спільно з науковим керівником сформульовано мету та завдання роботи, а на основі отриманих в ході виконання роботи результатів проведено їх узагальнення та сформульовано висновки. Верифікація діагнозу ХЛЛ проводилась співробітниками відділу онкогематології ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького під керівництвом зав.відділу д.мед.н., проф. Д.Ф. Глузмана. У працях, написаних у співавторстві, реалізовані наукові ідеї здобувача.

Повнота опублікування результатів дисертації та особливий внесок здобувача до всіх наукових публікацій, опублікованих із співавторами та зарахованих за темою дисертації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, зокрема 4 статті, з яких 2 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.

1. I. Gordiienko, L. Shlapatska, V. Kholodniuk, L. Sklyarenko, D. Gluzman, E. Clark, S. Sidorenko / The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling // PLoS ONE. – 2017, 12(10): e0185940. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні експериментальної частини статті та оформленні результатів).*

2. I.M. Gordiienko, L.M. Shlapatska, V.M. Kholodniuk, L.M. Kovalevska, T.S. Ivanivskaya, S.P. Sidorenko / CD150 and CD180 are involved in regulation of transcription factors expression in the chronic lymphocytic leukemia B cells // Experimental Oncology. – 2017. – Vol. 39, N4. - P. 291-298. *(Особистий внесок здобувача: участь у проведенні лігації злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, виділення РНК і синтез кДНК, постановка кПЛР у режимі real-time, обробка та аналіз даних).*

3. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska, T. Ivanivska, S. Sidorenko / Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapeutic drugs ex

vivo depends on expression status of cell surface receptors // *Experimental Oncology*. – 2020. – Vol. 42, N1. - P. 16-24 (*Особистий внесок здобувача: виконання основної експериментальної частини роботи, підбір та аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті*).

4. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska, D. Gluzman, S. Sidorenko / CD150 and CD180 are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells // *Neoplasma*. – 2021. – Vol. 68, N4. - P. 760-769 (*Особистий внесок здобувача: виконання основної експериментальної частини роботи, підбір та аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті*).

5. Спосіб прогнозування чутливості до дії хіміопрепаратів при хронічному лімфолейкозі: інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №212-2019 / Сидоренко С.П., Шлапацька Л.М., Гордієнко І.М., Щербіна В.М., Скляренко Л.М., Іванівська Т.С., Поліщук А.С.; МОЗ України, Укрмедпатентінформ. – Київ: Укрмедпатентінформ, 2019. – 4с.

6. V. Kholodniuk, I. Gordiienko, V. Huryn, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / *In vitro* sensitivity of CLL B cells to chemotherapy agents is depend on CD150 and CD180 cell surface expression level // Тези науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопаталогією», 4-5 лютого 2019 р., м. Київ, Україна. Онкологія. – 2019. – Т. 21, N 1(79). - С.75.

7. V. Kholodniuk, V. Huryn, I. Gordiienko, L. Shlapatska / CD150 and CD180 cell surface receptors are negative regulators of IL-6 and IL-10 mRNA expression in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези XV міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 9-11 квітня 2019 р., м.Львів, Україна. – 2019. – С. 81.

8. V. Shcherbina, I. Gordiienko, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / Connection between cell surface receptor status of CLL B cells and their sensitivity to chemotherapy agents *ex vivo* // 6-й з'їзд Українського товариства клітинної

біології з міжнародним представництвом, 18-21 червня 2019 р., м.Яремче, Україна. – 2019. – С. 119.

9. V. Shcherbina, I. Gordiienko, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / CD150 is a positive regulator of CD20 expression in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези II міжнародної конференції «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem», 21-22 листопада 2019 р., м.Київ, Україна. Experimental Oncology. – 2019. – Vol. 41, N3. - P. 276.

10. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska / CD150 and CD180 receptors are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези XVI міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27-29 квітня 2020 р., м.Львів, Україна. – 2020. – С. 134.

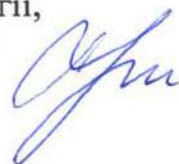
Відомості щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень. Матеріали дисертаційних досліджень відповідають нормам біоетики, що засвідчено висновком комісії з біоетики Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (протокол №01 від 16.03.2021 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 В.М. Щербіни на тему: «Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитокстатиків» повністю відповідає вимогам, передбаченим п.9, 10, 11, 12 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №167 від 6 березня 2019 року (у редакції постанови КМУ від 09.06.2021 № 608) відносно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії.

ВВАЖАТИ, що 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 спеціальності 091 – Біологія та вимогам Порядку підготовки здобувачів 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 2019 року №283), п.10 - 11 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 06 березня 2019 року №167 (у редакції постанови КМУ від 09.06.2021 № 608), та може бути рекомендована до офіційного захисту на здобуття ступеня доктора філософії у разовій спеціалізованій вченій раді зі спеціальності «Біологія».

Рецензенти:

Доктор біологічних наук,
старший дослідник,
завідувачка лабораторії механізмів
медикаментозної резистентності відділу
моніторингу пухлинного процесу та дизайну
терапії Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України



Н.Ю. Лук'янова

Кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу онкогематології
Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України



М.П. Завелевич