

## **ВІДГУК**

### **офіційного опонента**

на дисертаційну роботу ГОРДІЄНКО ІННИ МИХАЙЛІВНИ  
**«ЕКСПРЕСІЯ ТА СИГНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ CD150 РЕЦЕПТОРА У  
В-ЛІМФОЦИТАХ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЛІМФОЛЕЙКОЗІ»**

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
за спеціальністю 14.01.07 – онкологія

Однією з найбільш поширених форм лейкозів, на яку хворіє до 40% дорослого населення у країнах Європи та Північної Америки, є хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ). Важливим показником, який використовується для діагностування ХЛЛ та диференціювання його агресивної форми є, зокрема, рівень експресії певних білків (наприклад, ZAP-70), або оцінка мутаційного статусу варіабельної ділянки важкого ланцюга імуноглобулінів (*IGHV*) у В-лімфоцитах. Процедури визначення таких маркерів виявились або недосконалими через значні варіації в їх експресії у динаміці захворювання, або занадто вартісними. Тому виникає потреба пошуку нових прогностичних маркерів ХЛЛ. Той факт, що експресія CD150, одного з представників рецепторів родини SLAM, у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ є не такою, як у В-лімфоцитах здорових донорів, а також дані щодо можливого взаємозв'язку між рівнем експресії CD150 та сприятливим перебігом захворювання на ХЛЛ, визначають необхідність більш глибокого дослідження ролі CD150 рецептора В-лімфоцитів за цієї патології. Такі дослідження потребують не лише оцінки профілю його експресії, але й ідентифікації CD150-опосередкованих сигнальних шляхів. Це і визначає актуальність обраної дисертантом теми, сформульованих у роботі мети та задач дослідження.

Дисертаційну роботу виконано згідно тематики низки державних наукових програм Інституту експериментальної патології, онкології

і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, а також за підтримки гранту Національної академії наук України для молодих вчених.

Дисертація оформлена із дотриманням існуючих правил, побудована за традиційним стилем і складається із вступу, огляду літератури та розділів, у яких представлено матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, висновків. Список використаних джерел, налічує 151 посилання, серед яких достатньо робіт останніх років. Роботу ілюстровано 42 рисунками та 5 таблицями.

В огляді літератури, що складається з шести підрозділів, дано вичерпний аналіз сучасних даних, що стосуються загальної характеристики хронічного лімфо лейкозу; рецептор-опосередкованих сигнальних шляхів в злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ; особливостей сигналювання через В-клітинний рецептор при ХЛЛ; ролі рецепторів родини TNF в патобіології ХЛЛ; ролі Toll-подібних рецепторів в патобіології ХЛЛ; і, зрештою, характеристики CD150 рецептора, як потенційного прогностичного маркера сприятливого прогнозу для пацієнтів з ХЛЛ. Бажано було центром літогляду зробити саме CD150 рецептор та приділити більше уваги його характеристиці у нормі та за ХЛЛ.

Свідченням достовірності та обґрунтованості сформульованих у дисертації наукових положень, висновків та рекомендацій є застосування сучасних методів та адекватних моделей дослідження. У роботі використано популяції В-лімфоцитів виділених у градієнті Lymphoprep з периферичної крові здорових донорів та 67 хворих на ХЛЛ з верифікованим діагнозом.

Важливо, що моніторинг досліджуваних показників здійснено не лише на клінічному матеріалі хворих на ХЛЛ, але й *in vitro* на В-лімфобластоїдних лініях клітин, набір яких є достатньо широким.

У роботі використано надзвичайно широкий спектр первинних та вторинних антитіл, а також кон'югованих з FITC, або з Alexa Fluor 594 антитіл, що дало змогу провести імунофенотипування В-лімфоцитів методом протокової цитофлуорометрії, візуалізувати топологію CD 150 рецептора з

використанням конфокальної мікроскопії, здійснити Вестерн-блот аналіз активності низки сигнальних кіназ та рівня фосфорилування їх субстратів. Для оцінки відносного рівня експресії мРНК ізоформ CD150 рецептора та транскрипційних факторів було застосовано кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в режимі реального часу. Отримані дані статистично оброблені з використанням відповідних комп'ютерних програм.

У роботі отримано низку цікавих та важливих даних, які є свідченням її новизни та практичного значення. Експресію CD150 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів було виявлено у 71,6% досліджених випадків ХЛЛ, у 50,8% випадків рівень експресії CD150 був низьким, у 10,4% випадків – середнім та у 10,4% випадків – високим. Встановлено сильний прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії CD150 та рівнем експресії CD180 на поверхні В-лімфоцитів, виявлено колокалізацію цих рецепторів та показано, що активація саме CD180 призводила до достовірного зростання рівня його експресії як на рівні мРНК, так і протеїна.

Неочікувано виявлено, що CD150<sup>+</sup> зляккісно трансформовані В-лімфоцити хворих також експресували CD150, причому як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну. Пояснення цього факту стало зрозумілим після проведення аналізу локалізації рецептора у клітині. У CD150<sup>+</sup> В-лімфоцитах при ХЛЛ CD150 локалізувався виключно у межах внутрішньоклітинних компартментів - ER, АГ та ранніх ендосом, залишкову кількість CD150 знайдено в лізосомах. Цікаво, що у ранніх ендосомах В-лімфоцитів, які були CD180<sup>+</sup> за результатами проточної цитометрії, також виявлено локалізацію CD180.

З використанням методу кількісної ПЛР показано, що у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ експресується переважно мРНК мембранної ізоформи CD150. Важливим є той факт, що В-лімфоцити експресували мРНК розчинної форми рецептора (на вищому рівні ніж В-лімфоцити донорів) та, незалежно від наявності CD150 на плазматичній мембрані, були здатні секретувати sCD150 у середовище. Автор припускає, що саме підвищений

рівень експресії розчинної ізоформи CD150 може бути однією з причин виявленої цитоплазматичної експресії CD150 в частині випадків ХЛЛ.

Потребує пояснення, чому у CD150<sup>-</sup> лініях клітин, які походять від злоякісно трансформованих В-лімфоцитів гострої лімфобластної лейкемії, або лімфоми Беркітта і у яких підтверджено переважну експресію мРНК мембранної ізоформи рецептора проте не виявлено експресії CD150 на білковому рівні.

Для дослідження сигнальних властивостей CD150 було оцінено рівень базального фосфорилування білків в CD150<sup>-</sup> та CD150<sup>+</sup> В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та досліджено кінетику фосфорилування ключових кіназ Akt та MAPK сигнальних шляхів після активації CD150 та CD180 рецепторів окремо або одночасно. Конститутивний рівень фосфорилування по тирозину та S/T мотивах був вищим в CD150<sup>+</sup> В-лімфоцитах порівняно з таким у csCD150<sup>-</sup>. Активація CD150 на поверхні CD150<sup>+</sup> клітин призводила до активації Akt, mTOR, ERK1/2, JNK1/2 та p38MAP кіназ та посиленого фосфорилування їх субстратів. Такі ж ефекти, хоча і менші за амплітудою, виявлено у разі активації CD180 рецептора на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ.

Вперше показано, що у разі не окремої, а сумісної лігації CD150 та CD180 спостерігається протилежний ефект - блокування Akt-, mTOR-, p38MAPK-залежних сигнальних шляхів та дефосфорилування їх компонентів. Продемонстровано, що цей ефект не є наслідком неспецифічного стеричного інгібуванням рецепторів внаслідок зв'язування МКАТ, а є специфічним саме для пари CD150- CD180.

На основі отриманих даних автор робить висновок, що експресія лише CD150 або CD180 на мембрані В-лімфоцитів не вказує на сприятливий прогноз для пацієнтів з ХЛЛ, оскільки у разі активації цих рецепторів запускаються сигнальні шляхи, які підтримують виживаність та проліферацію злоякісно трансформованих клонів.

Авторт припускає, що лише одночасна лігація CD150 та CD180 може призводити до блокування трансляційних процесів та до зниження

виживаності зляккісно трансформованих В-лімфоцитів і що саме тому зляккісно трансформовані В-лімфоцити уникають одночасної експресії CD150 та CD180 на поверхні, утримуючи їх в цитоплазмі при ХЛЛ.

Таким чином, отримані автором дані вказують на перспективність використання CD150 та CD180 рецепторів як мішеней впливу при розробці таргетних препаратів для лікування хворих на ХЛЛ, що і визначає практичну значимість представленої роботи.

Зроблені у роботі висновки відповідають поставленим у дослідженні завданням. Зміст автореферату відбиває основний зміст дисертаційної роботи. Отримані автором дані апробовано на численних вітчизняних та зарубіжних конференціях та опубліковано у 6 статтях, з них 5 - у фахових виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз.

До роботи виникають питання, відповіді на які сприятимуть глибшому розумінню отриманих автором даних.

1. Чи усі виявлені на поверхні CD150<sup>+</sup> належали зляккісно трансформованим лімфоцитам, чи були присутні і нормальні з високою експресією рецептора?

2. Чому по-різному мітили МКАТ до CD150 у разі виявлення рецептора на ПМ (кон'юговані з Alexa Fluor 594) та всередині клітин (з FITC)?

3. Чи однаковим і яким саме був рівень експресії CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, використаних у експериментах з дослідження CD150<sup>+</sup>-залежних сигнальних шляхів.

4. Чи змінюється експресія CD150 чи CD 180 у В-лімфоцитах у динаміці прогресії захворювання та після лікування? Чи є дані про те, що тяжкість протікання хвороби була різною у пацієнтів з CD150<sup>+</sup> чи - , чи з різним ступенем експресії CD150.

5. Індукція сигналу через CD150 рецептор вела до повної активації Akt та фосфорилування Akt-залежних кіназ, що автор розцінює як забезпечення живлення та виживання зляккісних В-лімфоцитах. Але одночасну активацію

p38 MAP кінази можна розцінювати як маркер апоптозу. Так само сумісна активація CD150 та CD180 призводила до пригнічення фосфорилування за Akt – залежним шляхом, але водночас і до пригнічення активності p38 MAP кінази. Тому для підтвердження сприятливого чи несприятливого прогнозу протікання ХЛЛ бажано було б оцінити виживаність та рівень апоптозу В-лімфоцитів у разі експресії та лігації цих рецепторів окремо або у комбінації.

Ці зауваження носять дискусійний характер і не зменшують наукової цінності роботи. Вважаю, що за актуальністю, достовірністю, науковою новизною, практичною цінністю кандидатська дисертація «Експресія та сигнальні властивості CD150 рецептора у В-лімфоцитах при хронічному лімфолейкозі» відповідає вимогам п. 11 та п. 13 постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор Гордієнко Інна Михайлівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 — онкологія.

Доктор біологічних наук,  
професор кафедри біохімії  
ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка



О. П. Матишевська

Підпис проф. Матишевської О.П. засвідчую  
Заст. директора ННЦ «Інститут біології та медицини»

*Сиренко А.В.* (Заст. директора ННЦ «Інститут біології та медицини» А.В.)

