

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Бровка Антона Олександровича «Оптимізація процесу ідентифікації хромосомного матеріалу невизначеного походження та складних хромосомних перебудов в каріотипі людини», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Актуальність теми. На даний час визначено значну кількість хромосомних аномалій, пов'язаних з виникненням та розвитком цілого ряду вроджених вад та синдромів. При цьому використання окремих молекулярно-цитогенетичних методів дослідження каріотипу людини досі не дозволяє об'єктивно та в повному обсязі аналізувати складні хромосомні перебудови, матеріал маркерних та дериватних хромосом. Це положення унеможливорює визначення каріотипу пацієнта остаточно в деяких складних випадках, та, в свою чергу, аргументує пошук оптимальних шляхів вирішення даної проблеми сучасної медичної генетики. Одним із таких методологічних підходів є розробка та використання алгоритмів із залученням комплексу методів, які дозволять в повному обсязі виконувати аналіз каріотипу людини з метою пренатальної та постнатальної діагностики. Щодо існуючих на даний час поодиноких алгоритмів проведення постнатального цитогенетичного обстеження слід зауважити їх суттєві обмеження, які не дозволяють в повній мірі аналізувати максимально широкий перелік аберацій хромосом.

Саме цій актуальній проблемі медичної генетики – підвищенню ефективності постнатальної діагностики шляхом оптимізації аналізу хромосомного матеріалу невизначеного походження та складних хромосомних перебудов – присвячена робота Бровка А.О.

В ході виконання дисертаційної роботи заплановано низку складних завдань, для вирішення яких було проведено широкомасштабні молекулярно-цитогенетичні дослідження.

Дисертація викладена на 141 стор. машинописного тексту та складається зі «Вступу»; розділу «Огляд літератури»; розділу «Матеріали та методів», двох розділів, в яких наведені результати власних досліджень та розділу «Узагальнення результатів та їх обговорення»; висновків; практичних рекомендацій; списку використаних літературних джерел (211 найменувань); робота ілюстрована 45 малюнками, 4 таблицями та 2 додатками. Слід підкреслити, що кожен розділ дисертаційної роботи

закінчується висновками, що полегшує сприймання та осмислення викладених даних.

У розділі «**Вступ**» розглядається актуальність проблеми, значення отриманих авторами результатів для теорії та практики досліджень в області медичної та лабораторної генетики; визначена наукова новизна одержаних даних. Чітко сформульовані мета та впливаючи з неї задачі роботи. Вказано, що вона виконувалась згідно з науковим планом НМАПО імені П. Л. Шупика на основі 2-х науково-дослідних тем, а також обстежень пацієнтів, проведених в МЦЛ (молекулярно-цитогенетична лабораторія) клініки «Ісіда». Відображено особистий внесок здобувача у виконанні дисертації.

Зауваження до вступу. Вважаю, що «актуальність теми» слід було завершити саме підкресленням наукової пріоритетності обраного напрямку досліджень а не «зниженням їх собівартості». Також бажано було у розділі «Вступ» дати посилання на літературні джерела, що ще більше підкреслило б актуальність та новизну дисертаційного дослідження Бровка А.О.

У розділі «**Огляд літератури**», який складається з 5 підрозділів, і закінчується короткими висновками, в логічній послідовності розглянуто та виконано поглиблений аналіз переваг, недоліків та обмежень сучасних методів цитогенетичної діагностики. В цілому розділ читається з великим інтересом, написаний змістовно та майстерно, що свідчить про відмінне знання автором вітчизняних та зарубіжних наукових публікацій, глибоке розуміння актуальної проблеми сучасного стану постнатальної цитогенетичної діагностики.

Зауваження до огляду літератури. Дуже докладно викладено характеристику каріотипу людини, його якісних та кількісних змін, але варто було хоча б коротко охарактеризувати і переваги лімфоцитів периферичної крові як основного об'єкту для виконання цитогенетичних досліджень. Також в роботі присутні деякі невдалі висловлення. Наприклад: автор пише, що «транслокації, як правило не шкідливі...» а далі «носії таких збалансованих перебудов мають підвищений ризик продукування гамет з аномальним хромосомним складом, що призводить до викиднів або народження дітей з відхиленнями». Автор нагадує, що «каріотип людини був встановлений на початку 1960 р.», а посилається при цьому на публікацію 2017 р. і т.д. Цей розділ закінчується 8 висновками, але поза увагою залишаються актуальність та пріоритетність запланованого наукового дослідження.

Розділ **«Матеріали та методи»** складається з 8 підрозділів. Наведено відомості щодо залучених адекватних завданням роботи молекулярно-цитогенетичних методів досліджень. Автором було використано базовий метод диференційного забарвлення GTG - для виявлення та аналізу хромосомних аномалій; додаткові методи диференційного забарвлення CBG, QFQ, NOR-Ag - для визначення хромосомного поліморфізму; FISH метод та його модифікації – для аналізу як індивідуальної хромосоми так, і її окремих локусів. Особливо слід відмітити фрагмент дисертації, присвячений методу мікродисекції хромосом. Автором було проведено кропітку, на високому технічному рівні роботу, суть якої полягала в отриманні власних ДНК-зондів з матеріалу механічно ізольованих фрагментів метафазних хромосом та подальшої їх ампліфікації. Завдяки такій техніці автору вдалося отримати унікальні ДНК-зонди з хромосом лімфоцитів периферичної крові пацієнта, та ідентифікувати додатковий генетичний матеріал в його каріотипі. Слід підкреслити відмінне оформлення ілюстраціями цього розділу, які підтверджують виконання роботи на високому методологічному рівні. Це дало в подальшому змогу на основі комбінації вищезазначених методів розробити уніфікований алгоритм та виконати аналіз каріотипів у 100% випадків.

Зауваження. В цьому розділі доцільно було б доповнити таблицю 1 інформацією про групи обстежених пацієнтів із залученням всіх використаних методів.

В наступному розділі дисертації **«Результати дослідження»** чітко, послідовно та логічно наведені результати власних досліджень пошукувача Бровка А.О. Приймаючи до уваги основну ідею та назву дисертації, найсуттєвішими результатами роботи вважаю наступні: встановлено, що використання методу GTG в якості скринінгового, залишає відкритим питання визначення каріотипу приблизно у 4% випадків. Виявлено, що деякі поліморфні варіанти хромосом можуть бути хибно інтерпретовані через їх морфологічну подібність до дериватних хромосом. Також показано, що при відсутності певної мікроделеції в каріотипі можуть бути інші хромосомні аберації у 4% випадків. Одним з найцікавіших досягнень можна вважати доведену автором можливість використання реверсної FISH в якості альтернативного методу діагностики та максимально ефективного (100%) застосування WCP зондів для ідентифікації хромосомного матеріалу невизначеного походження. Автор акцентує увагу, що наукової значущості набувають вперше виявлені 4 унікальні каріотипи, які є «обов'язковою

складовою опису випадків перед розміщенням їх у світовому науковому реєстрі хромосомних аберацій (ECARUCA)». На основі отриманих даних, дисертантом було розроблено новий алгоритм цитогенетичних досліджень, завдяки якому в рамках виконаної роботи, остаточні каріотипи встановлено у всіх досліджених випадках (100%). Цей розділ дисертації супроводжується якісними кольоровими ілюстраціями, що також демонструють високий науково-методологічний рівень виконаної дисертаційної роботи.

Основні наукові положення дисертаційної роботи Бровка А.О. підтверджено достатнім обсягом проведених досліджень і характером отриманих результатів. Принципових зауважень до викладання фактичного матеріалу немає.

В наступному розділі дисертації **«Узагальнення результатів та їх обговорення»** одержані автором фактичні матеріали детально аналізуються в порівнянні з даними світової літератури. Дисертант акцентує увагу на проблемі ідентифікації маркерних хромосом груп D та G, що не містять еухроматину, які складно аналізувати за допомогою FISH. Хоча такі маркерні хромосоми вважаються безпечними для носія, але вони обумовлюють генетичний дисбаланс. Тому подальші дослідження є перспективними в плані виявлення та ідентифікації маркерних хромосом, що містять матеріал хромосом інших груп каріотипу. Виявлення подібних випадків призведе до внесення удосконалень в алгоритм постнатальної діагностики і підвищить її ефективність. Автор підкреслює недостатній рівень комунікації між співробітниками клінік та генетичних лабораторій, що не може не відображатися на якості медико-генетичної допомоги.

Зауваження. Схема «Загального алгоритму цитогенетичної діагностики» перевантажена другорядними компонентами, скорочення яких не вплине на інформативність алгоритму в цілому.

Висновки повністю відповідають одержаним результатам та відображають рішення запланованих 6 завдань дослідження.

Відповідність автореферату щодо змісту і оформлення дисертації. Автореферат відображає зміст та досягнення мети дисертаційної роботи. Основні положення дисертації та її висновки ідентичні змісту автореферату. Оформлення дисертації та автореферату відповідає вимогам ДАК МОН України.

Результати роботи доповідались та обговорювались на 8 наукових форумах з міжнародною участю і достатньо повно викладені в профільних виданнях.

Наукова новизна. Вперше в Україні виконано ідентифікацію хромосомного матеріалу невідомого походження за допомогою флуоресцентно-мічених олігонуклеотидів, отриманих методом мікродисекції. За результатами проведених досліджень вперше виявлено явище «мімікрії» хромосомних аберацій під хромосомний поліморфізм, що може призвести до помилок при визначенні каріотипу. Виконані автором цитогенетичні дослідження спрямовані на виявлення та вивчення природи хромосомних аномалій, в тому числі маркерних та дериватних хромосом, генетичного матеріалу невизначеного походження. Тому накопичення такої інформації має підвищувати науковий потенціал медичної генетики.

Практичне значення одержаних результатів вкрай важливе і не може викликати сумніву. Застосування нового алгоритму проведення постнатальної діагностики, у складних випадках, коли це не можливо досягти за допомогою стандартних цитогенетичних методик, підвищує її ефективність до 100%. Загальний алгоритм цитогенетичної діагностики, що представлений в дисертаційній роботі, доцільно впроваджувати в установах, які здійснюють цитогенетичну діагностику та медико-генетичне консультування. З цією метою варто подати відповідні методичні рекомендації або інформаційні листи до МОЗ України з метою їх затвердження.

Загальні зауваження.

Вважаю, що не варто по тексту дисертації так часто звертати увагу на вартість тих чи інших методів дослідження, адже це наукова праця в галузі біології (наприклад, на стор.7 вартість тільки в одному абзаці згадується 4 рази). Ефективність застосування GTG для встановлення каріотипу варіює по тексту від 94,4 до 97,4%, хоча насправді складає 96.05%, що й відображено у висновку №1. Це означає, що тільки у 3.95% випадків постнатальна діагностика виконується відповідно до розробленого алгоритму.

Питання, які виникли в процесі рецензування дисертаційної роботи.

1. Відомо, що кільцеві хромосоми можуть формуватися внаслідок опромінення і визначені як променеві маркери. З цього приводу як Ви можете, враховуючи в тому числі дані літератури стосовно цитогенетичних наслідків Чорнобильської катастрофи, відрізнити конституційний характер даної хромосомної патології від радіаційно-індукованого?

2. Чи можете ви відповісти, наскільки результати цитогенетичного обстеження, що отримані відповідно до розробленого Вами алгоритму,

корелюють з анамнезом, клінічною картиною обстежених пацієнтів? Тобто яка «подальша доля» цитогенетичного висновку?

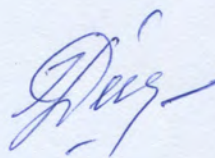
3. Вами запропоновано алгоритм, який дозволяє у 100% випадків аналізувати складні каріотиби. З приводу цього окресліть, які подальші шляхи Ваших досліджень в області лабораторної цитогенетики?

4. Обґрунтуйте, чи доцільно враховувати запропонований Вами алгоритм у пренатальній діагностиці?

Зауваження та питання носять непринциповий характер та не применшують науково-практичну значущість дисертаційного дослідження Бровка А.О.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Бровка Антона Олександровича «Оптимізація процесу ідентифікації хромосомного матеріалу невизначеного походження та складних хромосомних перебудов в каріотипі людини» є завершеною науковою роботою. За актуальністю, новизною, глибиною, обсягом проведених досліджень і практичною цінністю дисертаційна робота А.О. Бровка повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567., а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук
завідувач відділу біологічних ефектів іонізуючого
та неіонізуючого випромінювання
Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України



Е.А. Дьоміна



Підпис *Е.А. Дьоміна*
ЗАСВІДЧУЮ
Заступник секретаря
І.М. Воробей
МВБ