

ВІДГУК

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

Актуальність теми. Актуальність обраної дисертантом теми не викликає сумнівів, оскільки проведення максимально точного та об'ємного аналізу каріотипу людини є передумовою для найбільш повного та результативного медико-генетичного консультування.

Сучасні успіхи у галузі молекулярної генетики і цитогенетики обумовили успішне застосування великої кількості методів, що відрізняються за принципом й складністю виконання, чутливістю та інформативністю. Проте, жоден не носить універсального характеру і має обмеження, переваги та сферу застосування. Питання про доцільність залучення того чи іншого підходу для розв'язання цитогенетичної задачі вирішується індивідуально в кожному випадку, на основі вказаної причини звернення та перших отриманих даних після дослідження каріотипу методом диференційного забарвлення. В той же час, отримання повної інформації щодо каріотипу пацієнта не завжди можливе при застосуванні тільки традиційних цитогенетичних методів. В випадках складних хромосомних перебудов, наявності додаткового хромосомного матеріалу невизначеного походження метод диференційного фарбування малоінформативний, тому виникає необхідність залучення цілого комплексу молекулярно-цитогенетичних методів для встановлення природи даних змін. Як правило, завжди існує кілька альтернативних шляхів подальшого цитогенетичного аналізу, що можуть відрізнитись часом виконання або кількістю додаткових діагностичних кроків.

Саме тому дисертаційна робота Бровка Антона Олександровича присвячена надзвичайно важливій проблемі в галузі репродуктології та генетики людини в цілому - оптимізації шляхів цитогенетичної та молекулярно-цитогенетичної діагностики, для встановлення каріотипу пацієнта, і тримання остаточної відповіді на запит лікаря.

Створення максимально уніфікованого алгоритму дій для випадків коли не можливо встановити остаточної каріотип за допомогою одного методу, наразі є актуальною задачею, оскільки раніше представлені алгоритми, в основному, присвячені розв'язанню конкретних, вузьких задач, і не охоплюють весь спектр хромосомних аберацій.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та зв'язок роботи з іншими науковими програмами.

У дисертаційній роботі Бровка А.О. надане серйозне обґрунтування представлених наукових положень на підставі результатів досліджень з використанням цілої низки сучасних високоінформативних цитогенетичних і молекулярно-цитогенетичних методів.

Запропонований алгоритм проведення дослідження дозволяє встановити остаточний каріотип пацієнта у випадках, коли це не можливо зробити за допомогою стандартних цитогенетичних методик, виключає необґрунтоване залучення складних діагностичних процедур та підвищує ефективність досліджень каріотипу людини.

В цілому дисертаційна робота виконана на високому методологічному рівні. Автором проаналізовано надзвичайно великий обсяг фактичного матеріалу, який складають дані обстеження 8183 пацієнтів, при цьому, особисто автором було здійснено понад 2000 цитогенетичних досліджень, з них усі випадки із хромосомним матеріалом невизначеного походження та складними хромосомними перебудовами.

Основні наукові положення закономірно впливають зі змісту дисертації, переконливо обґрунтовані та базуються на вірогідних результатах досліджень, проведених автором. Достовірність аналізу матеріалу забезпечена використанням сучасних, адекватних меті та завданням роботи, методів. Висновки дисертації закономірно впливають з проведених досліджень та відображають основні результати роботи, що впроваджені у роботу закладів охорони здоров'я. Рекомендації розроблені на підставі отриманих результатів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає плану наукових досліджень та виконувалась в межах НДР «Роль генетичних та середовищних факторів у виникненні та перебігу спадкової та набутої патології в онтогенезі» 0109U0022634, термін виконання 2009-2013 та ініціативно-пошукової НДР «Визначення генетичних основ ризику розвитку патологічних станів на різних етапах онтогенезу» 0114U002215 (2014-2018) кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П. Л. Шупика.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що за результатами аналізу та узагальнення даних власних досліджень на великому за обсягом клінічному матеріалі дисертантом вперше було розроблено та використано уніфікований алгоритм цитогенетичної та молекулярно-цитогенетичної діагностики, з фокусом на ідентифікацію хромосомного матеріалу невизначеного походження та складних хромосомних перебудов.

Алгоритм охоплює широкий спектр хромосомної патології та дозволяє встановити остаточний каріотип в 100% випадків.

Вперше в Україні проведено ідентифікацію хромосомного матеріалу невизначеного походження із застосуванням мічених ДНК-зондів, отриманих автором шляхом мікродисекції метафазних хромосом, та за їх допомогою проведено ідентифікацію хромосомного матеріалу невизначеного походження, чим доведено можливість використання реверсної FISH в якості альтернативи.

Використані дисертантом оригінальні підходи щодо діагностики складних хромосомних змін дозволили виявити та довести, що екстремальні варіанти поліморфізму коротких плечей акроцентричних хромосом, оцінені у 5 балів, у 40% випадків насправді є дериватними хромосомами, які морфологічно лише нагадують поліморфізм.

Також автором виявлено та проведено завершену діагностику чотирьох унікальних випадків каріотипів людини, які ще не були описані в літературі. Дані про каріотипи в сукупності з клінічними даними цих пацієнтів можуть поповнити світовий науковий реєстр незбалансованих хромосомних аберацій ECARUKA, завданням якого є зведення кореляції фенотипів та каріотипів при нових хромосомних синдромах. Тому будь-які дані про каріотип, що в своєму об'ємі перевищують мінімум, необхідний для пояснення причини звернення пацієнта, швидше носять науковий характер і мають велике значення для поглиблення знань про цитогенетичні характеристики нових та вже відкритих синдромів.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження. Дані отримані дисертантом мають велике практичне значення, оскільки певні випадки, що підлягають аналізу традиційними методами цитогенетики потребують особливого підходу, а це, в свою чергу, змінює загальноприйняту тактику проведення рутинних цитогенетичних досліджень. В зв'язку з цим автором обґрунтовано та доведено необхідність поетапного підходу для ідентифікації хромосомного матеріалу невизначеного походження в залежності від типу хромосомної патології, попередньо виявленої методом GTG. Дисертантом також окреслено сферу застосування WCP ДНК-зондів (як комерційних, так і отриманих шляхом мікродисекції) та визначено типи хромосомних аберацій які доцільно ідентифікувати за допомогою хромосом специфічних ДНК-зондів. Застосування центромерних ДНК-зондів для ідентифікації інвертованих дуплікацій коротких плечей акроцентричних хромосом дозволяє визначити походження таких хромосомних аномалій у 84,6%, і, відповідно, полегшує рішення подібних цитогенетичних задач. Встановлені дані, що маркерні хромосоми, які не містять еухроматин, а отже і не ідентифікуються

методом FISH, є нейтральними щодо розвитку ускладнень, дозволяють лікарю-генетику в ході медико-генетичної консультації давати позитивний прогноз для пацієнта і, відповідно, звільняють дослідника від необхідності проведення подальшого дослідження. Запропонований автором алгоритм дозволяє встановити остаточний каріотип пацієнта у випадках, коли це не можливо зробити за допомогою стандартних цитогенетичних методів, та виключає необґрунтоване залучення складних діагностичних процедур. Теоретичні положення дисертаційної роботи та практичні рекомендації можуть бути впроваджені в практику цитогенетичних лабораторій не тільки лабораторії медичної генетики спеціалізованого медико-генетичного центру НДСЛ «ОХМАТДИТ» та кафедри медичної та лабораторної генетики Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, а й інших лікувальних закладів

В той же час, на мою думку, недооцінена практична значимість отриманих результатів. Так автором зазначено, що при використанні запропонованого алгоритму економія коштів складала від 10 до 42% в залежності від кількості застосованих ДНК-зондів, проте в практичній значимості це не знайшло свого висвітлення. Хоча, основна кінцева мета будь-якого обстеження - це надання чіткої відповіді пацієнту щодо результату обстеження та формування відповідного цим результатам ефективного плану подальшого ведення пацієнта або сім'ї в цілому з максимальною мінімізацією витрат коштів та часу персоналу медичних установ і самих пацієнтів. Запропонована автором оптимізація процесу ідентифікації хромосомного матеріалу невизначеного походження та складних хромосомних перебудов суттєво поліпшує вирішення цього завдання.

Оцінка структури, змісту та завершеності дисертаційної роботи.

Дисертація Бровка А.О. побудована відповідно до вимог ДАК МОН України. Робота викладена на 141 сторінці машинописного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, розділу „Матеріали і методи дослідження“, розділів за результатами власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури, який включає 211 найменувань (24 кирилицею та 187 латиною). Дисертація ілюстрована 45 рисунками, 4 таблицями та містить 2 додатки.

У **Вступі** автор обґрунтовує актуальність роботи, та викладає положення, що створюють передумови до формування мети й задач дослідження та підводить до думки про необхідність створення загального алгоритму цитогенетичної діагностики.

На початку розділу **“Огляд літератури”** автором детально описані основні етапи та тенденції розвитку сучасної цитогенетики та охарактеризовані мета та процес цитогенетичної діагностики. Окрему увагу автор приділяє проблемі обрання методу

діагностики та його відповідності поставленим цілям. Дисертантом також описані основні хромосомні аберації та поліморфізм хромосом, в рамках загальної характеристики каріотипу людини. Тут автор коротко описує принципи оцінки поліморфізмів, кількісні та якісні зміни каріотипу людини та їх основні клінічні прояви, з посиланнями на джерела. Огляд літератури автор завершує характеристикою існуючих алгоритмів цитогенетичної діагностики та наукової бази даних хромосомних аберацій, особливо акцентуючи увагу на ролі яку цей реєстр хромосомних аберацій грає для поліпшення комунікації між лікарем, пацієнтом та цитогенетиком.

У розділі **матеріали та методи дослідження** автором детально описані використані методи, як традиційні так і різноманітні варіації FISH, в тому числі з використанням мічених олігонуклеотидів, що були отримані шляхом мікродисекції. Слід відмітити, що дисертантом самостійно обстежена велика група пацієнтів ($n=2000$) за допомогою стандартного цитогенетичного методу та понад 50 випадків «складних» каріотипів - молекулярно-цитогенетичними методами.

Результати досліджень викладено у розділі 3 та 11 підрозділах, які повністю розкривають сутність проведених досліджень, завершуються проміжними висновками. Матеріал ілюстровано таблицями та рисунками, легко сприймається.

Заключний розділ 5 присвячено узагальненню дисертаційної роботи в цілому та підсумовуванню результатів дослідження. Тут у стислому вигляді подано зміст попередніх розділів, а також наведено обговорення окремих положень дисертаційної роботи.

Висновки чіткі, коректні, відображають основні положення дисертації та відповідають сформульованим автором меті й завданням дослідження, оформлені відповідно до вимог ДАК МОН України.

Практичні рекомендації є доречними й доцільними для використання.

Таким чином, результати проведених досліджень узагальнені, викладені в основних положеннях та висновках дисертаційної роботи, що обґрунтовані та достовірні.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріал основних розділів дисертації викладено в опублікованих за результатами дисертації 5 друкованих працях (фахових наукових виданнях, внесених до переліку ДАК МОН України, міжнародних журналах), 8 тезах матеріалів наукових форумів.

Відповідність автореферату щодо змісту і оформлення дисертації. Автореферат повністю відповідає змісту дисертаційної роботи. Основні положення

дисертації та її висновки ідентичні за змістом автореферату. Оформлення дисертації та автореферату відповідає вимогам ДАК МОН України.

Рекомендації щодо використання результатів дослідження в практиці. Отримані дисертантом результати є підґрунтям для подальшого удосконалення алгоритму цитогенетичного обстеження пацієнтів з складними хромосомними перебудовами. Ретельне, максимально повне цитогенетичне обстеження пацієнтів має допомогти в ході медико-генетичного консультування, а всі виявлені випадки, разом з клінічними даними, повинні реєструватися у відповідних базах даних. Такий загальний принцип проведення комплексного обстеження, є запорукою постійного покращення якості досліджень, та поглибленню наукових знань щодо кореляції формули каріотипу та фенотипу пацієнта.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі зауваження та побажання.

Зокрема, в огляді літератури автор занадто багато уваги приділяє методам цитогенетики, в той же час, на мою думку, недостатньо висвітлено сучасний стан вивчення поліморфізму хромосом, хоча проблема ідентифікації поліморфізму залишається актуальною і сьогодні. Що, власне, автором і доведено у своїй роботі.

Необхідно зазначити, що більшість використаних наукових джерел опубліковані більше, ніж 10 років тому. В той же час, на сьогодні є достатня кількість сучасної наукової інформації, яка могла бути використана автором.

Хоча розділ 3 «Результати дослідження» написаний досить грамотно і чітко, однак у процесі рецензування роботи було виявлено також деякі неточності. Так на стор. 56 наводиться інформація, що «Після аналізу за допомогою GTG-фарбування, нормальні каріотиби було встановлено у 88,48% випадків від загальної кількості пацієнтів (n=8183) (Рис. 3.1). Патологічні каріотиби було встановлено у 7,55%, відповідно 3,95% пацієнтів потребували дообстеження, для встановлення остаточного каріотипу. Таким чином, ефективність застосування GTG методу для встановлення остаточного каріотипу склала 96,03%».

Які саме патологічні каріотиби були визначені? Взагалі, на мою думку, варто було б надати загальну таблицю з розподілом визначених аномалій хромосом серед 618 осіб зі встановленим патологічним каріотипом та у 324 (3,95%) пацієнтів, тих, що потребували дообстеження (хоча б з аналізом які саме хромосоми були залучені до перебудов найчастіше). Не зрозуміло звідки випливає висновок щодо ефективності застосування GTG, яка склала 96,03%.

На стор.77 вказано, що «Виявлені ізодисцентричні хромосоми у своїй більшості склалися із двох копій коротких плечей хромосоми 15 [186]». Не зовсім зрозуміло чий дані наводяться: чи то власні, чи іншого автора [186]?

На стор. 85 речення «У разі, коли до складу маркерної хромосоми входять послідовності, багаті на повтори, ідентифікація таких об'єктів молекулярно-цитогенетичними методами ускладнена і має обмеження при застосуванні методик заснованих на FISH, таких як класична *in situ* гібридизація та порівняльна геномна гібридизація на метафазних хромосомах або на ДНК-чипах [196]» в одному абзаці повторюється двічі.

Схематичне зображення та порівняння двох напрямків аналізу мікрodelейних синдромів дещо перевантажує рисунок 3.6, тому його варто було винести в окремий рисунок.

Викликає певні питання розділ 4, назва якого сформульована як «Порівняння використаних методів цитогенетичної діагностики», проте жодне твердження не підкріплено власними фактичними даними та не містить посилань на наукові джерела.

В розділі 5 на сторінці 99 наводиться підсумовуюча інформація «Таким чином, застосування GTG методу на початку цитогенетичної діагностики дозволяє встановити каріотип у 97,46% випадків». Не зрозуміло, звідки впливає відсоток у 97,46%, тим більше, що він відрізняється від наведеного в розділі 3.

Це ж стосується і висновку 1, де зазначено, що «... додаткове застосування методів фарбування NOR-Ag, QFQ, CBG дозволяє у 98.5% випадків підтвердити наявність хромосомного поліморфізму, які не потребують уточнення методом FISH», проте у висновках до розділу 3 та в самому тексті даного розділу наводяться дещо інші цифри.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли наступні запитання.

1. Які саме патологічні каріотиби були визначені у 618 осіб зі встановленими методом GTG змінами в каріотипі та у 324 (3,95%) пацієнтів, тих, що потребували дообстеження? Чи проводили Ви аналіз, які саме хромосоми були залучені до перебувань найчастіше?
2. Чи проводилась статистична обробка матеріалу, якщо так, то які методи статистичного аналізу було використано?
3. В одній з таблиць зазначено такий критерій оцінки методу, як «Середня вартість (екв.к*)», але немає жодної інформації, хто запропонував такий спосіб оцінки, чому Ви його використовуєте. Поясніть, будь ласка.

4. Які критерії оцінки поліморфізму хромосом Ви використовували?
5. В розділі 4, назва якого сформульована як «Порівняння використаних методів цитогенетичної діагностики» жодне твердження не підкріплено власними фактичними даними та не містить посилань на наукові джерела. Поясніть, будь ласка, чому.

Дисертація Бровка А.О. в цілому написана професійно, грамотно, легко читається, з логічною й послідовною манерою викладення матеріалу. Дисертант показав справжню обізнаність у всіх питаннях, що порушені у роботі, а сама дисертація свідчить про глибокі знання автора в цій галузі, вміння поставити завдання, методично їх вирішувати та об'єктивно оцінити отримані результати. Принципових зауважень до роботи немає, є лише незначні недоліки, зокрема стилістичні, орфографічні помилки, невдало сформульовані речення, а також ті, що були вже відзначені по ходу аналізу результатів досліджень у певних розділах. Усі зазначені недоліки та питання, які виникли в процесі рецензування, не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення.

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 –

кандидат медичних наук, асистент

кафедри клінічної імунології та алергології

з секцією медичної генетики

Національного медичного університету

імені О.О.Богомольця



Мішаріна Ж.А.