

ВІДГУК

офіційного опонента д. мед. н. професора Г.Р. Акопян, заступника директора з наукової роботи ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» про дисертацію Полубень Л.О. «Молекулярно-генетичні особливості Ph-негативних мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС», подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Класичні хронічні Ph-негативні мієлопроліферативні неоплазії (МПН), до яких відносять справжню поліцитемію (СП), есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) і первинний мієлофіброз (ПМФ), є порівняно рідкісними клональними захворюваннями кровотворної системи, що виникають в осіб віком більше 60 років. МПН не входять до переліку злоякісних захворювань гематопоетичної системи за даними МКХ десятого перегляду і тому не представлені в Національному канцер-реєстрі України. Проте, МПН здатні значно порушувати якість життя та його тривалість, оскільки їх перебіг може супроводжуватись тромбогеморагічними подіями і підвищеним ризиком трансформації у гостру лейкемію. На даний час повідомляють про зростання захворюваності на МПН в різних популяціях та їх значне «омолодження» із початком хвороби у 35–40 років.

Особливе місце серед етіологічних чинників МПН в Україні належить наслідкам аварії на Чорнобильській АЕС, що виявились особливо загрозливими для учасників ліквідації аварії, евакуйованих із місця події та мешканців забруднених радіонуклідами територій. Це підтверджують результати попередніх досліджень, які демонструють значно підвищену частоту МПН серед осіб, які зазнали дії іонізуючої радіації. Ця категорія пацієнтів потребує якісної своєчасної діагностики та ефективної тактики лікування, чому сприяє поглиблення знань щодо патогенетичних механізмів розвитку МПН. У близько 85–90% випадків можливо підтвердити клональну природу МПН на підставі наявності соматичної мутації в одному із генів: *JAK2*, *MPL* або *CALR*. Проте, у 10–15% хворих не знаходять основних

мутацій у згаданих генах, а тому механізм розвитку хвороби залишається невідомим і вимагає продовження наукового пошуку. Особливу увагу привертають результати порівняльних досліджень молекулярно-генетичних особливостей гострої лейкемії та МПН у випадках індукованих дією іонізуючої радіації та спонтанних гематологічних неоплазій. Це підтверджує актуальність та своєчасність виконання дисертаційної роботи Л. О. Полубень, яка спрямована на ідентифікацію додаткових молекулярно-генетичних маркерів МПН та з'ясування відповідних патогенетичних механізмів, які можуть бути використані для підвищення ефективності діагностики радіаційно-асоційованих та спонтанних МПН в Україні.

Кандидатська дисертація Л.О. Полубень логічно впливає з науково-дослідної роботи відділу молекулярної генетики Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України». Варто відмітити безсумнівний особистий внесок дисертанта у виконання роботи, оскільки поряд із опрацюванням літератури та формуванням дослідних груп, лікар Л.О. Полубень особисто опрацювала і виконала комплексні молекулярно-генетичні обстеження хворих на рівні сучасних методичних вимог.

Дисертація викладена на 163 сторінках друкованого тексту, з яких 114 сторінки – основний текст, а це відповідає вимогам ДАК України щодо обсягу кандидатських дисертацій. Структура дисертації є традиційною і містить вступ, огляд літератури, об'єкт і методи дослідження, розділ результатів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки і практичні рекомендації, перелік посилань та додатки. Дисертацію написано грамотною, плинною українською мовою та добре ілюстровано 9 рисунками та 20 таблицями, Перелік використаної літератури містить 167 посилань, більшість з яких за останні 5 років. Зауважень до оформлення дисертації немає.

Мета дослідження сформульована чітко і відповідає основному змісту проведених досліджень. Сім завдань дисертації поставлені коректно і відповідають меті роботи.

В розділі I «Огляд літератури» охарактеризовано спектр молекулярно-генетичних змін, які супроводжують розвиток МПН і спричиняють порушення функціонування JAK/STAT патогенетичного механізму, на базі якого формується мієлопроліферативний фенотип. Дослідження по проблемі охарактеризовані достатньо повно і зрозуміло, що не залишає сумнівів щодо глибокого розуміння дисертантом геномних змін та патогенетичних механізмів, які задіяні в розвитку та еволюції МПН.

У розділі II «Об'єкт і методи дослідження» вірно визначені об'єкт і предмет дослідження та ємко охарактеризовані використані методичні підходи. Схвально оцінюючи загальний високий методичний рівень дисертаційної роботи, хочу особливо відмітити: 1) адекватність метода клінічної оцінки пацієнтів (оптимізована шкала MPN-SAF TSS) вирішенню науково-медичних завдань (дисертація подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук), 2) репрезентативність виконаних досліджень (90 та 191 хворих на радіаційно-асоційований і спонтанний МПН відповідно); 3) дотриманням вимог щодо формування групи контролю (в одній контрольній групі – особи з радіаційним анамнезом, які не мають неоплазій, в другій – випадки неоплазій за відсутності радіаційного анамнезу); 4) застосування високотехнологічних методів молекулярно-генетичного аналізу (полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі, сангерівське секвенування та секвенування наступного покоління, аналіз збалансованості геному за допомогою чипів із оліго- та одонуклеотидними пробамі). У дисертації Л.О. Полубень дотримано вимоги об'єктивного трактування результатів генетичного тестування на підставі ретельного біоінформатичного аналізу з використанням визнаних інформаційних баз (dbSNP – база одонуклеотидних поліморфізмів та ExAC – Exome

Aggregation Consortium), а також адекватного і виконаного на сучасному рівні, статистичного аналізу отриманих результатів.

Виразних методичних недоліків не помічено, хоча варто було скоротити опис деяких методів (наприклад, виділення ДНК). Підсумовуючи, застосований методичний рівень досліджень дозволив отримати високо вірогідні результати для досягнення мети дослідження.

У розділі III власних досліджень викладені основні результати досліджень, проведено їх всебічний аналіз та авторську інтерпретацію у контексті сучасних поглядів на проблему.

У підрозділі 3.1 проаналізовано демографічні та клініко-гематологічні показники хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні МПН (випадки спленомегалії, тромбозів, трансфузійної залежності, трансформації у гостру лейкемію) з визначенням інтенсивності обтяжливих симптомів за допомогою адаптованої шкали самооцінки MPN-SAF TSS. Принципових зауважень немає. Результати, що отримані, відповідають завданням дисертаційної роботи.

У підрозділі 3.2 у хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні МПН проаналізовано частоту та визначено відмінності у частоті реєстрації «канонічних» мутацій генів *JAK2*, *MPL* та *CALR*. Встановлено, що пацієнти з радіаційно-асоційованими МПН були частіше негативними за основними мутаціями згаданих генів порівняно із хворими на спонтанні МПН. Показовими відмінностями досліджених експериментальних груп виявились підвищення частоти мутації *JAK2* V617F у хворих на спонтанні МПН та поширеність мутації гена *CALR* 1-го типу (делеції) серед хворих на радіаційно-асоційовані МПН. Вирішуючи завдання 2 дисертаційної роботи, в цьому підрозділі також проаналізовано асоціацію основних мутацій генів *JAK2*, та *CALR* із показниками загального аналізу крові у хворих на ЕТ та ПМФ. Принципових зауважень немає. Результати, що отримані, відповідають завданням дисертаційної роботи.

У підрозділі 3.3 у хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні МПН докладно описані геномні зміни (однонуклеотидні заміни, інсерції, делеції та варіанти кількості повторів, а також зміни збалансованості генома), що можуть бути асоційовані з ризиком виникнення МПН та онкогенної трансформації. Аналіз проведено з урахуванням наявності або відсутності основних мутацій у генах *JAK2*, *MPL* або *CALR*. Визначено спектр генів, які зазнали змін у більше, ніж 5% випадків серед хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні МПН. Особливо виразні зміни зареєстровані у випадках радіаційно-асоційованого та спонтанного ПМФ, причому значна кількість генів зі зміненими нуклеотидними послідовностями зустрічались в обох групах (*ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *TET2*, *PEG3*, *ATM*, *SUZ12* та інші). Були визначені рекурентно пошкоджені (у більш, ніж 5% випадків) гени при радіаційно-асоційованому ПМФ (*ASXL1*, *U2AF1*, *PEG3*, *LAMB4*, *NF1*, *JARID2*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2* та *ATM*) та спонтанному ПМФ (*ASXL1*, *EZH2*, *PEG3*, *RTEL1*, *SUZ12*, *RBBP8*, *BRCA2*, *FLT3LG*, а також *ATM*). Найчастіше патогенні або ймовірно патогенні варіанти зустрічались саме у хворих на радіаційно-асоційований ПМФ, а за відсутності носійство «канонічних» мутацій, це стосувалося генів *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2* та *ATM*. Виключно в групі хворих на радіаційно-асоційовані МПН, які не мали основних мутацій у генах *JAK2*, *MPL* та *CALR*, ідентифіковано варіанти генів *EZH2* p.D659G (7q36.1) та *SUZ12* p.V71M (17q11.2) і не пов'язаний із втратою копій варіант *ATM* p.S1691R (11q22.3.), які потенційно можуть бути залученими до розвитку МПН. Принципових зауважень немає. Результати, що отримані, відповідають завданням дисертаційної роботи.

В підрозділі 3.4 описані варіанти нуклеотидних послідовностей, виникнення яких було, вірогідно, спровоковано дією іонізуючої радіації в анамнезі та обговорена їх можлива причетність до розвитку МПН. Принципових зауважень до матеріалу підрозділу немає. Результати, що отримані, відповідають завданням дисертаційної роботи.

Наприкінці розділу III зроблено чітке резюме, яке узагальнює отримані результати.

Четвертий розділ роботи дисертант присвятив аналізу та обговоренню отриманих результатів. Високої оцінки заслуговують спроби дисертанта провести трактовку отриманих результатів, опираючись на сучасні досягненні молекулярно-генетичних підвалин патогенетичних механізмів МПН. Принципових зауважень до розділу немає.

Результати, що отримані у кандидатській дисертації Л.О. Полубень, є науково обґрунтованими, доказовими та у переважній більшості новаторськими. Їх наукова новизна і практична значущість не викликають сумнівів. Так, вперше в дослідженнях радіаційно-асоційованих МПН та вперше в Україні у випадках спонтанних МПН визначено частоту основних мутацій генів *MPL* та *CALR*, випадків відсутності основних мутацій в генах *JAK2*, *MPL* та *CALR*, а також спектр патогенних та ймовірно патогенних варіантів нуклеотидних послідовностей у комбінації із змінами збалансованості геному. Вперше в дослідженнях радіаційно-асоційованих МПН та вперше в Україні у випадках спонтанних МПН ідентифіковано молекулярно-генетичні маркери ризику розвитку захворювання за відсутності основних мутацій в генах *JAK2*, *MPL* та *CALR*. Вперше були визначені варіанти нуклеотидних послідовностей, виникнення яких могло бути обумовлене дією іонізуючої радіації та потенційно передувати розвитку радіаційно-асоційованих МПН. Для медичної практики обґрунтовано доцільність першочергового дослідження у хворих на радіаційно-асоційовані МПН, які не мають основних мутацій *JAK2*, *MPL* та *CALR*, певних нуклеотидних послідовностей визначених генів високого ризику (*EZH2*, *SUZ12*, *ASXL1* та *DNMT3A*).

Висновки дисертаційної роботи цілком обґрунтовані результатами дослідження, сформульовані чітко та відповідають меті і завданням роботи.

Автореферат написаний у повній відповідності зі змістом дисертації, відповідає вимогам ДАК України.

Про повноту висвітлення результатів роботи свідчать публікації по темі дисертації: 7 наукових праць, із них 5 відповідають вимогам ДАК України (4 статті у профільних фахових виданнях, 1 стаття в іноземному виданні).

Результати дисертаційної роботи Л.О. Полубень були представлені на міжнародних та національних наукових конференціях із гематології та онкології, що засвідчують опубліковані тези доповідей.

Попри загальне позитивне враження від дисертаційної роботи Л.О. Полубень, дещо у стилі її викладення викликало застереження. Це стосується окремих стилістично невдалих виразів («зміни збалансованості в геномі», «варіанти генних послідовностей»), важких для розуміння складнопідрядних речень, а часом бездоказових стверджень: «сигналювання, регуляція транскрипції, репарації ДНК і сплайсинг були порушені у більшій мірі у цих хворих». Це може бути лише припущенням, оскільки застосований методичний підхід не дозволяв відповісти на питання: чи постраждала функція гена внаслідок виявлених змін у даної особи.

Висловлені зауваження безумовно не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. В якості дискусії хочу поставити дисертанту два запитання:

1. Резюмуйте притаманні для української популяції молекулярно-генетичні особливості МПН у випадках відсутності мутацій «канонічних» генів.
2. Оскільки МПН є мультифакторної патологією з полігенним підґрунтям, чи вдалося вам зареєструвати множинні зміни обраних мішеневих генів в обстежених осіб, і які гени вірогідно претендують на роль кандидатів радіаційно-асоційованих і спонтанних МПН.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Полубень Лариси Олександрівни «Молекулярно-генетичні особливості Ph-негативних мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС» є завершеною науковою роботою. За актуальністю, новизною, глибиною, обсягом проведених досліджень і практичною цінністю дисертаційна робота Полубень Л.О. відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів», що пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Заступник директора з наукової
роботи ДУ «Інститут спадкової
патології НАМН України»,
д.мед.н., професор



Г. Р. Акопян

