

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Сітько Валентини Віталіївни
«Визначення молекулярно-цитогенетичних маркерів для зрілих
В-клітинних новоутворень в геномі субстратних клітин задля
удосконалення діагностичних та прогностичних критеріїв», представлену
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
зі спеціальності 03.00.15 - генетика

Робота В.В. Сітько присвячена актуальній проблемі сучасної біології і медичної науки – визначенню молекулярно-цитогенетичних маркерів, які можна було б використовувати в якості діагностичних та прогностичних критеріїв у хворих на хронічний В-клітинний лімфолейкоз (В-ХЛЛ) і деякими формами В-клітинних неходжкінських лімфом (В-НХЛ). Відомо, що в Україні, як і у більшості західних країн та США, ХЛЛ складає 30% всіх форм лейкозів. Показники захворюваності на неходжкінські лімфоми також є високими. В США НХЛ становлять 54,5% всіх пухлин кровотворної і лімфоїдної тканин. За даними Національного канцер-реєстру України (2015 р.), захворюваність на НХЛ складала 5,5 на 100 тис. населення. Серед НХЛ 85% становлять пухлини В-лімфоїдної природи. Слід відзначити, що В-НХЛ належать до тих небагатьох типів пухлин, смертність від яких в останні 2-3 десятиріччя продовжує невпинно зростати. Показники 5-річної виживаності дорослих хворих, за даними Національного інституту раку США, становлять трохи більше 50 %.

Дисертаційна робота В.В. Сітько викладена на 160 сторінках машинописного тексту. Складається зі вступу (6 сторінок), огляду літератури (20 сторінок), опису матеріалів і методів досліджень (16 сторінок), включає розділи, в яких представлені власні результати досліджень (77 сторінок), обговорення та узагальнення одержаних даних (11 сторінок), висновки і практичні рекомендації. Робота ілюстрована 25

таблицями та 48 рисунками. Список літератури включає 213 публікацій, переважна більшість яких належить іноземним авторам. Слід відзначити, що в цьому списку відсутні вітчизняні гематологи і патологи, які внесли суттєвий вклад у вивчення лімфопроліферативних захворювань (А.І. Воробйов, Ю.І. Криволапов, Н.О. Пробатова та ін.).

У “Вступі” чітко окреслено завдання дослідження – за допомогою методу інтерфазної флуоресцентної *in situ* гібридизації (I-FISH) дослідити різні типи генетичних порушень, в тому числі хромосомні аномалії, представлені делеціями, ампліфікаціями і транслокаціями певних генів, в клітинах при деяких формах В-клітинних лімфоїдних новоутворень і тим самим доповнити молекулярно-цитогенетичними маркерами існуючі методи їх діагностики і прогнозу.

В огляді доступної літератури “Сучасні можливості використання молекулярно-цитогенетичних методів діагностики та прогнозу перебігу зрілих В-клітинних новоутворень” розглядаються молекулярно-цитогенетичні особливості найпоширеніших форм лімфоїдних пухлин, які виникають із зрілих (периферичних) В-клітин, сучасні аспекти молекулярно-цитогенетичної діагностики пухлин, діагностичної та прогностичної значущості хромосомних аномалій. Велике значення приділяється анеуплоїдіям хромосом, делеціям 1, 13 та 17 хромосом в діагностиці та прогнозі перебігу лімфопроліферативних захворювань. Огляд є свідченням ерудиції автора, доброї обізнаності стосовно сучасних досягнень світової науки в галузі цитогенетики і молекулярної біології пухлин лімфоїдної тканини.

На нашу думку, дисертанту слід було б навести останню класифікацію ВООЗ (2008 р.) лімфоїдних пухлин і пояснити чому серед більш як 20 форм В-НХЛ вона детально зупинилася лише на В-ХЛЛ, дифузній В-крупноклітинній лімфомі (ДВККЛ) і лімфомі Беркітта (ЛБ) (складають біля 30 % всіх лімфоїдних новоутворень).

В розділі “Матеріали і методи дослідження” наведені дані про 70 хворих на лімфоїдні новоутворення із зрілих В-клітин, серед яких було 24 пацієнти з ДВККЛ, декілька хворих на лімфому маргінальної зони селезінки, фолікулярну, лімфоплазмочитарну лімфому і лімфому з клітин мантийної зони, 10 – з лімфомою Беркїтта та 30 хворих на В-ХЛЛ. Проведений аналіз з урахуванням клініко-гематологічних показників, стадії захворювання. Матеріалом для власних молекулярно-цитогенетичних досліджень слугували клітини периферичної крові, кісткового мозку і гістологічні препарати біоптатів лімфатичних вузлів. Вважаємо, що ці дані повинні бути доповнені посиланням на те, в яких клінічних відділеннях спостерігалися хворі, ким встановлювався діагноз на підставі цитоморфологічних та імуногістохімічних методів.

Вважаю дискусійним в дисертаційній роботі виконання молекулярно-цитогенетичних досліджень у 20 практично здорових осіб, які увійшли до складеної автором контрольної групи. В них не проводилося спеціального виділення В-лімфоцитів із периферичної крові і кісткового мозку і тому вважаю, що не варто порівнювати отримані дані зі злоякісно трансформованими клітинами у хворих на В-клітинні лімфопроліферативні захворювання. Замість цього можна було б провести дослідження у пацієнтів з моноклональним В-лімфоцитозом, який зустрічається у 3-5% дорослих людей і є основою розвитку В-ХЛЛ.

Слід зазначити, що дисертантом дуже детально наведені правила забору і підготовки біологічного матеріалу для проведення молекулярно-цитогенетичних досліджень, необхідні для цього реактиви та розчини, протоколи досліджень, включаючи виконання флуоресцентної *in situ* гібридизації на парафінізованих зрізах біоптатів лімфатичних вузлів. Наведені методи статистичного аналізу, які були використані при виконанні роботи. На нашу думку, в цьому розділі слід було б підкреслити

переваги застосованого дисертантом методу FISH у порівнянні з полімеразно ланцюговою реакцією при вирішенні поставлених завдань.

Третій розділ, як вже згадувалось, містить дані, отримані при дослідженні зразків периферичної крові практично здорових людей.

В четвертому розділі викладені результати власних молекулярно-цитогенетичних досліджень, виконаних на зразках клітин периферичної крові, кісткового мозку і гістологічних препаратів біоптатів лімфатичних вузлів у хворих на різні форми В-клітинних лімфопрولیферативних новоутворень та на зразках клітин периферичної крові, кісткового мозку здорових осіб. Послідовно наведені дані стосовно змін хромосом 1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17 і 18 у хворих на ДВККЛЛ, ЛБ та В-ХЛЛ.

Здійснений молекулярно-цитогенетичний аналіз наявності делецій хромосом 1 (1p36 – ген *CDC2L1*), 13q (13q14 і 13q34) та 17p13.1 (ген *TP53*) у хворих на вказані вище форми лімфоїдних новоутворень. Особливої уваги заслуговують результати дослідження транслокацій із залученням генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGH*) у хворих на лімфоїдні новоутворення із зрілих (периферичних) В-клітин.

П'ятий розділ дисертаційної роботи цілком присвячений обговоренню результатів виконаного дослідження, їх співставленню з тими, що наводяться в доступній світовій літературі. Слід зазначити, що деякі з отриманих В.В. Сітько даних мають елементи суттєвої наукової новизни. Прикладом може бути виявлення численних аберацій хромосом 1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17 і 18 в клітинах периферичної крові та кісткового мозку у 22 із 30 хворих на В-ХЛЛ, аномалій зазначених хромосом у більшості пацієнтів з ДВККЛ. До принципово важливих можуть бути також віднесені дані про наявність транслокацій із залученням генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGH*) у 16 хворих на В-клітинні лімфопрولیферативні захворювання.

Для верифікації діагнозу лімфоми Беркітта, як встановлено дисертантом, найбільш важливими з вивчених молекулярно-цитогенетичних маркерів є транслокація $t(8;14)$ за участю генів *MYC* і *IGH*.

В цілому, В.В. Сітько вдалось встановити при вивченні достатньої кількості хворих спектр молекулярно-цитогенетичних аномалій, важливих для удосконалення діагностичних і прогностичних критеріїв, які можуть бути використані в онкогематологічних відділеннях України.

Стосовно 8 висновків, зроблених дисертантом. Майже у 73% хворих на новоутворення із зрілих В-клітин було виявлено аномалії хромосом 1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17 і 18. Аномалії кількості хромосом (анеуплоїдія) визначено у третини пацієнтів. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між хромосомними аномаліями та показниками відповіді хворих на лікування.

На високу оцінку заслуговують і практичні рекомендації автора дисертаційної роботи. Особливо слід відмітити рекомендації стосовно визначення транслокацій генів *FGFR3*, *MYC*, цикліну *D1*, *MAF*, *MALT1* і мутацій генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGH*) у хворих з підозрою на наявність тих чи інших лімфоїдних новоутворень В-клітинного походження.

Маємо деякі зауваження, які не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. На нашу думку, потрібне уточнення специфічних термінів. Замість “зрілі В-клітинні новоутворення” краще вживати – новоутворення із зрілих (периферичних) лімфоцитів, на зміну “хронічні лімфопроліферативні новоутворення” – лімфопроліферативні захворювання, замість “хронічна лімфоцитарна В-клітинна лейкемія” – хронічний лімфолейкоз. Потребує також уточнення назва самої дисертації (виключити “в геномі субстратних клітин”).

Хотілося б почути відповідь дисертанта на такі запитання:

1. Чим пояснити, що серед більш як 20 форм В-клітинних неходжкінських лімфом для детального вивчення були вибрані лише групи із хворих на хронічний В-клітинний лімфолейкоз, лімфому Беркїтта спорадичного типу та дифузну В-крупноклітинну лімфому?

2. Обґунтувати, для чого у практично здорових осіб проводились молекулярно-цитогенетичні дослідження?

3. В чому полягають переваги застосованого дисертантом методу FISH у порівнянні з полімеразною ланцюговою реакцією при вирішенні поставлених завдань?

Висновок опонента:

У дисертаційній роботі В.В. Сітько наведено теоретичне узагальнення та нове практичне вирішення актуальної наукової задачі встановлення частоти і спектру молекулярно-цитогенетичних аномалій пухлинних клітин при В-клітинних лімфопроліферативних захворюваннях. Автором за допомогою сучасних технологій отримані дані з ознаками суттєвої наукової новизни. Практичні рекомендації, зроблені дисертантом, вкрай важливі для впровадження в клінічну діяльність з метою уточнення діагнозу і прогнозу перебігу із зрілих (периферичних) В-клітин.

Дослідження виконане в рамках НДР ДУ “ІНЦРМ НАМН України” за темою «Визначення ролі генетичних та епігенетичних змін в геномі соматичних клітин у патогенезі хронічних лімфопроліферативних захворювань, їх діагностичної та прогностичної значущості».

Результати дисертаційної роботи доповідались та були обговорені на ряді міжнародних і вітчизняних форумів. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, з яких 5 статей у провідних виданнях, затверджених ДАК МОН України як фахові з біологічних наук.

Основні положення роботи та висновки відповідають паспорту спеціальності – 03.00.15 – генетика.

7

Вважаю, що отримані автором результати за рівнем їх наукової новизни відповідають вимогам, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук згідно з пунктом 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013р. № 567 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19 серпня 2015р. і № 1159 від 30 грудня 2015р.), а автор дисертації Сітько Валентина Віталіївна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 — генетика.

Офіційний опонент
доктор медичних наук професор
завідувач відділу імуноцитохімії
та онкогематології
Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України

Д. Ф. Глузман Д. Ф. Глузман



Д. Ф. Глузман
ІДЧУЮ
М. Воробей
М. В. С.