

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Сітько Валентини Віталіївни

«Визначення молекулярно-цитогенетичних маркерів для зрілих В-клітинних новоутворень у геномі субстратних клітин задля удосконалення діагностичних та прогностичних критеріїв»,
що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика (біологічні науки)

Актуальність теми. Щороку в світі реєструється високий рівень захворюваності і смертності від онкогематологічних захворювань, генетична гетерогенність і клінічний поліморфізм яких, особливості механізмів взаємодії генетичних і середовищних чинників, що лежать у їх основі, передбачають необхідність розвитку генетичних досліджень у кожній конкретній популяції. Сучасні успіхи у галузі молекулярної генетики і цитогенетики покращують розуміння біології цих захворювань, зокрема природу гетерогенної групи злоякісних новоутворень В-клітинного походження, що розвиваються з клітин лімфоїдної тканини. Подібно до інших неоплазій вони виникають в результаті акумуляції генетичних аберацій, що сприяють селективному росту клону злоякісних клітин. Одним із найбільш об'єктивних методів загальної оцінки різних типів генетичних порушень у злоякісних лімфоїдних клітинах, в тому числі складних структурних хромосомних перебудов, є інтерфазна флуоресцентна гібридизації *in situ* (I-FISH), який є незамінним для вивчення патогенезу пухлин кровотворної тканини. Саме тому дисертаційна робота Сітько Валентини Віталіївни присвячена надзвичайно важливій проблемі у генетиці людини – визначенню молекулярно-цитогенетичних маркерів для зрілих В-клітинних новоутворень у геномі субстратних клітин у мешканців України для удосконалення діагностичних та прогностичних критеріїв.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та зв'язок роботи з іншими науковими програмами. У дисертаційній роботі Сітько В.В. представлено серйозне обґрунтування представлених наукових положень на підставі результатів молекулярно-цитогенетичних досліджень на зразках клітин зрізів парафінізованих блоків біопсійного матеріалу, на культурах клітин периферичної крові та кісткового мозку. Запропонований алгоритм проведення молекулярно-цитогенетичних досліджень у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення допоможе підтвердити діагноз, дозволить здійснити індивідуальний прогноз для кожного пацієнта і сформулювати групи ризику.

Дисертаційна робота Сітько В.В. має послідовний та логічний дизайн дослідження. Для реалізації мети дисертантом вирішувалися чітко сформульовані завдання, яким відповідають отримані результати, підсумовані у висновках. Дисертантом детально опрацьована література на тему дослідження, особисто підібрано та використано сучасні методи для проведення молекулярно-цитогенетичних досліджень, зібрано достатній об'єм первинного експериментального матеріалу, самостійно виконано молекулярно-цитогенетичні дослідження клітин периферичної крові, кісткового мозку та лімфатичних вузлів у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення та осіб контрольної групи методами флуоресцентної гібридизації *in situ*, критично і професійно проаналізовано і узагальнено отримані результати.

Дисертаційна робота відповідає плану наукових досліджень ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України»: «Визначення ролі генетичних та епігенетичних змін у геномі соматичних клітин у патогенезі хронічних лімфопроліферативних захворювань, їх діагностичної та прогностичної значущості» (№ держ. реєстрації 0113U002317), що виконувалися за період із 2013 по 2015 років.

Наукова новизна роботи. Новизна наукової роботи полягає в тому, що в результаті глибокого, ретельного аналізу та узагальнення власних даних молекулярно-цитогенетичного дослідження з урахуванням клінічного поліморфізму дисертант на великому за обсягом клінічному матеріалі запропонувала молекулярно-цитогенетичні критерії діагностики та прогнозування перебігу зрілих В-клітинних новоутворень, які характеризують субстратні клітини периферичної крові, кісткового мозку та пухлинної тканини хворих з використання флуоресцентної гібридизації *in situ*. Вперше показано, що у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення віком менше 50 років транслокація t(8; 14) за участю генів *MYC* і *IGH* виявлялася частіше порівняно з пацієнтами старшого віку. Вперше визначено частоту аномалій хромосом 1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17 та 18 в ядрах субстратних клітин периферичної крові, кісткового мозку і лімфатичних вузлів хворих на зрілі В-клітинні новоутворення та встановлено прогностичні критерії, які дозволяють контролювати резистентність пацієнтів до лікарських засобів. Встановлено, що трисомія хромосоми 12, делеції 1p36, 13q14, 13q34 та 17p13.1 важливі для прогнозу перебігу зрілих В-клітинних новоутворень.

З точки зору практичного значення важливо те, що отримані дані є науковою розробкою, яка відкриває можливості для тісної співпраці фахівців-генетиків та клініцистів з метою впровадження молекулярно-цитогенетичних підходів у клінічну практику, особливо онкологічних закладів. Саме так стоїть це питання щодо впровадження результатів наукових медико-біологічних досліджень у масштабах держави.

Для проаналізованих нозологічних форм отримано індивідуальні цитогенетичні характеристики, кількісні показники, статеві-вікові та інші особливості, які складають основу розвитку діагностики онкологічних захворювань, що є передумовою формування індивідуального прогнозу і групи ризику для кожного пацієнта.

Оцінка структури, змісту та завершеності дисертаційної роботи. Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках тексту, матеріали дисертації

ілюстровано 25 таблицями та 48 рисунками. Список використаних джерел налічує 213 найменувань, з яких 181 - іноземні. Виклад матеріалу логічно пов'язаний з поставленою метою та завданнями, висновки, в цілому, відповідають поставленим завданням. У дисертації представлені усі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, обговорення результатів досліджень, висновки, практичні рекомендації. Власні результати викладені у чотирьох підрозділах. У розділах «Аналіз та узагальнення результатів» та «Висновки» підсумовані отримані результати.

Відповідність автореферату змісту дисертації. Автореферат повністю відповідає змісту дисертаційної роботи.

Повнота огляду та аналізу літератури у напрямі дослідження. В огляді літератури, який складається з трьох основних підрозділів, Сітько В.В. всебічно та критично аналізує сучасну літературу, присвячену питанням генетичної гетерогенності та клінічного поліморфізму В-клітинних новоутворень, молекулярно-генетичних та цитогенетичних досліджень різних їх форм. Автор детально обговорює проблему сучасних підходів до діагностики цих захворювань у людини, прогностичного значення кількісних та структурних аномалій хромосом, які виявляють при зрілих В-клітинних новоутвореннях.

Оцінка якості використаних методів досліджень, отриманих результатів, їх аналізу та обговорення. Дисертантом представлено відомості про об'єкт та методи дослідження, про використаний великий об'єм первинної інформації, медичної документації, зразків біологічного матеріалу хворих. Методи генетичних досліджень адекватно підібрані. Слід відмітити, що автором проведено молекулярно-цитогенетичні дослідження методом інтерфазної флуоресцентної гібридизації *in situ* (I-FISH) як на зразках клітин зрізів парафінізованих блоків біопсійного матеріалу, так і на культурах клітин периферичної крові та кісткового мозку. Молекулярно-

цитогенетичні дослідження практично здоровим особам проводили на культурі клітин периферичної крові.

Результати дослідження представлено у наочній формі, у вигляді таблиць і рисунків, їх проаналізовано та співставлено с даними світової літератури. Отримані результати є базою для подальших досліджень і є важливими для вивчення патогенезу пухлин кровотворної тканини, подальшого розвитку системи діагностики злоякісних новоутворень людини. Висновки логічно витікають із проведених досліджень, зроблені автором обґрунтовано, відповідно до сучасних уявлень, цілком відображають основний зміст роботи і привертають увагу до основних моментів проведеного дослідження.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових фахових виданнях. Основні положення дисертаційної роботи представлено у 10 наукових працях, з яких 5 статей - у фахових періодичних виданнях, а також 3 тез доповідей на міжнародних науково-практичних конференціях. Хоча практичне значення роботи не викликає сумніву, однак, на жаль, автором на основі отриманих результатів не розроблено методичних рекомендацій чи інформаційного листа. Ці нововведення мали б важливе значення для охорони здоров'я. Хоча результати молекулярно-генетичних досліджень доповідалися та були обговорені в основному на наукових форумах України та один раз в Росії (Петербург), однак було б доцільним представити результати роботи з використанням високотехнологічних методів генетичних досліджень і за межами нашої країни серед світової наукової спільноти.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі побажання, та зауваження. Зокрема, вважаю назву роботи досить громіздкою: в одному реченні двічі вживається слово «для». Коротшою могла б бути назва: «Молекулярно-цитогенетична характеристика зрілих В-клітинних новоутворень у геномі субстратних клітин для удосконалення прогностичних критеріїв діагностики».

У розділі «Матеріали та методи дослідження» (с. 33) дисертантом написано «Діагноз В-клітинних лімфом було встановлено за результатами гістологічного дослідження ураженої тканини лімфовузлів пацієнтів згідно сучасної класифікації ВООЗ..., стадію захворювання визначали у відповідності із системою стадіювання лімфом Ann Arbor (США)....», хоча це не входило у компетенцію і завдання дослідника. Необхідно було вказати, що робота з медичною документацією виконувалася разом з лікарями-фахівцями на підставі аналізу результатів клінічних і літературних даних.

Хоча підрозділ «Реактиви та розчини для проведення молекулярно-цитогенетичних досліджень» написаний дуже грамотно і чітко, однак у процесі рецензування роботи було виявлено також деякі неточності. Наприклад, на с. 39 вказано «...за допомогою даної проби визначали делецію гена *TP53* та інші аномалії хромосоми 17», а потрібно - визначали делецію ділянки 17p13.1 хромосоми 17, в якій розміщений ген *TP53*». Крім того, слід відмітити, що в українській науковій термінології немає слова регіони хромосоми, як періодично вживається в дисертації, а ділянки хромосоми (с. 40).

У розділі «Результатів дослідження» у тексті і часто у назвах таблиць, також відмічено низку неточностей: на с. 55 вказано «...були проаналізовані показники кореляції виявлених делецій 1p36, 13q і 17p.13.1 із віком, статтю та стадією захворювання у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення», на с. 81 «були проаналізовані показники кореляції виявленої трисомії хромосоми 12 із віком, статтю та стадією захворювання, а на с. 87- «...проаналізовано чи корелюють виявлені транслокації із залученням генів важких ланцюгів *IGH* із віком, статтю та стадією захворювання у хворих ...», однак в жодному випадку визначення коефіцієнтів кореляції не було наведено. Відповідно, назви таблиць під таким текстом не зовсім відповідали змісту. Наприклад, подана назва табл. 4.1 «Делеції хромосом 1, 13 та 17 у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення» не точна, так як, по-перше, слід писати, що саме досліджувалося – частота делецій, коефіцієнти кореляції частоти делецій

хромосом із віком статтю, стадією захворювання, тощо, по-друге, потрібно писати - делеції ділянок хромосом. Аналогічне зауваження до назви табл. 4.6 – «Делеція гена *TP53* у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення» (с. 72), табл.4.8 – «Трисомія хромосоми 12 у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення» (с.79). На с. 54 не зовсім зрозуміло написано: «Найчастіше спостерігалися делеції 1p, 13q і 17p – 88,46 % (46 випадків у 36 із 70 пацієнтів), значно рідше визначалися полісомії хромосом 1, 13 та 17 – 11,54% (6 випадків у шести із 70 пацієнтів) – чим відрізняються випадки від пацієнтів? У назві рис. 4.19 замість «Особливості спектру аномалій хромосоми 17 у хворих на лімфому Беркітта» можливо, краще було б написати просто «Спектр аномалій хромосоми 17....». Аналогічне побажання для підписів під рис. 4.25, 4.27, 4.31, 4.34. У підписі до рис. 4.36, 4.44 виявлено неточність в термінології: замість «дифузна В-великоклітинна лімфома» написано – «дифузна великоклітинна В-лімфома». На с. 114 замість вказаного номера таблиці помилково написана середня кількість аномальних клітин із транслокацією.

Інколи дисертант спочатку подає таблицю, а під нею наводить посилання на неї, що утруднює сприймання інформації. Має бути навпаки (табл. 4.4).

В обговоренні результатів дослідження вказано суперечливі твердження в одному і тому ж реченні. Зокрема, написано на початку речення, що «аномалії хромосом... найчастіше виявляли у пацієнтів з В-ХЛЛ – у 73,33 % осіб», а далі «у пацієнтів з лімфоною Беркітта аномалії цих же хромосом були присутні у всіх з 10 обстежених хворих».

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли наступні запитання.

1. Чи серед обстежених пробандів із зрілими В-клітинними новоутвореннями вам траплялися сімейні випадки аналогічних захворювань, або ж нагромадження у сім'ях інших злоякісних неоплазій, якщо ні, то що

відомо з літературних джерел про генетичну схильність до розвитку лімфоїдних новоутворень?

2. Чи були виявлені розбіжності при виявленні структурних чи кількісних перебудов хромосом у плані прогнозування перебігу захворювань порівняно з відомими даними літератури?

3. У наведеній вами схемі алгоритму проведення молекулярно-цитогенетичних досліджень у хворих на зрілі В-клітинні новоутворення з анеуплоїдій вказані лише трисомії хромосоми 12. Яке прогностичне (позитивне чи негативне) значення найбільш частих анеуплоїдій, в тому числі моносомій інших хромосом, а також полісомій, які вам вдалося виявити у цих хворих під час виконання роботи порівняно з відомими даними літератури?

У загальному, робота викладена логічно, професійно і грамотно. Дисертант показав справжню обізнаність у всіх питаннях, що заторкувалися в дисертації. Принципових зауважень до роботи немає, є лише незначні недоліки, зокрема стилістичні, орфографічні помилки, невдало сформульовані фрази, а також ті, що були вже відзначені в ході 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. Дисертаційна робота Сітько Валентини Віталіївни «Визначення молекулярно-цитогенетичних маркерів для зрілих В-клітинних новоутворень у геномі субстратних клітин задля удосконалення діагностичних та прогностичних критеріїв» є завершеною науково-дослідною роботою, в якій запропоновано систему молекулярно-цитогенетичних досліджень, що полягає у встановленні частоти та спектру аномалій хромосом пухлинних клітин зрілих В-клітинних новоутворень. Отримані дані є вагомим внеском у фундаментальні дослідження щодо генетичних особливостей виникнення зрілих В-клітинних новоутворень та прогресії пухлинного процесу, а також мають практичне значення, оскільки

розроблений алгоритм молекулярно-цитогенетичних досліджень може бути використаний для надання допоміжних діагностичних та прогностичних

оцінок цієї патології. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, новизною, теоретичним значенням та практичною цінністю, глибиною та обсягом проведених досліджень цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», що ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор, Сітько В.В., заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика (біологічні науки).

Офіційний опонент

доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник

відділення діагностики спадкової патології

Львівського ДУ «Інститут спадкової патології

НАМН України»

М.Р.Лозинська

