

## **Відгук**

**офіційного опонента на дисертаційну роботу**

**Полубень Лариси Олександрівни**

**«Молекулярно-генетичні особливості Ph- негативних  
мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників  
аварії на Чорнобильській АЕС»,**

що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата  
медичних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Дисертаційна робота Полубень Лариси Олександрівни присвячена вивченню молекулярно-генетичних особливостей хронічних Ph-негативних - мієлопроліферативних неоплазій (МПН) у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС, та ідентифікуванню додаткових молекулярних маркерів і патогенетичних елементів розвитку цих захворювань. Незважаючи на те, що пройшло вже більше 33 років з дня аварії, її наслідки простежуються і досі. Дослідження осіб, які зазнали дії іонізуючої радіації (ІР), вказують на збільшення частоти виникнення гематологічних захворювань і серед них, зокрема, зростання кількості Ph-негативних МПН. Чим це обумовлено, в чому полягають відмінності, як їх можна використовувати у практичній медицині? У своїй роботі дисертантка зробила спробу це оцінити, і можна впевнено заявити, що це їй вдалось.

Мієлопроліферативні неоплазії – клональні патологічні процеси, що виникають внаслідок трансформації гемопоетичної стовбурової клітини і характеризуються проліферацією однієї чи декількох ліній мієлопоезу. В центрі уваги даної роботи були хворі на спонтанні та радіаційно-асоційовані МПН (Ph-негативні). Тобто, поряд з таким широкомасштабним скануванням хворих з МПН (української популяції), що було зроблено вперше, оцінювався також внесок чинників аварії на Чорнобильській АЕС на частоту, особливості перебігу захворювання, визначення варіантів нуклеотидних послідовностей, проводився пошук додаткових молекулярних маркерів та патогенетичних механізмів розвитку і еволюції цих захворювань.

Для виконання запланованої теми автори провели велику попередню роботу по формуванню груп хворих на МПН (Ph-негативні), які мали, або не мали відповідний анамнез. Крім того, треба було розробити і перевірити, з використанням різних підходів, специфічність і ефективність молекулярно-біологічних протоколів. При виконанні роботи були отримані базові дані щодо впливу чинників аварії на перебіг мієлопроліферативних неоплазій. Вперше

було визначено частоти основних мутацій генів MPL та CALR та випадків, негативних за основними мутаціями тріади (JAK2, MPL, CALR), при радіаційно-асоційованих МПН (Ph-негативні) і вперше в Україні – при спонтанних МПН (Ph-негативні). Вперше були визначені варіанти нуклеотидних послідовностей, виникнення яких могло бути обумовлено дією IP. Вперше ідентифіковані маркери розвитку захворювання у випадках негативних за основною тріадою (JAK2, MPL, CALR) при радіаційно-асоційованих та вперше в Україні - при спонтанних МПН (Ph-негативні). Це наводить на думку про те, що деяка частка таких МПН може бути обумовлена саме патогенетичним поєднанням різних SNP.

Одержані важливі дані щодо патогенетичних механізмів розвитку Ph-негативних МПН. Встановлено, що порушення транскрипції ДНК та епігенетичного регулювання, додатково до канонічного патогенетичного шляху, відіграє ключове значення у розвитку та еволюції радіаційно-асоційованих Ph-негативних МПН.

#### Ступінь обґрунтованості та достовірності положень дисертації.

Робота Полубень Л.О. виконана на високому рівні із застосуванням сучасних клініко-гематологічних, молекулярно-генетичних (повноекзомне секвенування, мішеневе секвенування генів кандидатів, гібридизація геному до оліго та однонуклеотидних проб, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі). Висока чутливість застосованих методів, відповідна статистична і програмна обробка свідчать про достовірність результатів роботи. Висновки ґрунтуються на значному обсязі експериментальних досліджень проведених автором. Автором самостійно проведений патентно-інформаційний пошук, розроблені основні теоретичні і практичні положення, методичні підходи до виконання завдань.

Дисертаційна робота Полубень Лариси Олександрівни побудована за стандартною схемою, викладена на 163 сторінках друкованого тексту та складається із «Анотації», «Вступу», «Огляду літератури» - розділ 1, «Об'єкт і методи дослідження» - розділ 2, «Результати власних досліджень» - розділ 3 (4 підрозділи), а також «Аналіз та узагальнення результатів дослідження», «Висновків», «Переліку посилань» (167 посилань) і «Додатків». Робота містить 9 рисунків та 20 таблиць. Дисертаційна робота написана у науковому стилі українською мовою.

**Вступ.** Чітко обґрунтована тема дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами, сформульована мета і конкретні задачі досліджень, а також наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення. Дисертацію виконано у відділі медичної генетики (керівник - д. мед. н.,

проф. С.В. Клименко) ІЕР ННЦРМ НАУМН України за темою: “Молекулярно-генетичні особливості Ph-негативних мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС” (2017-2019 рр., № держреєстрації 0117U000625), відділі гематології/онкології ВІДМС, Гарвардської медичної школи, Бостон, Массачусетс, США (керівники - доктор П. Френкель та доктор, проф. С. Балк) у співпраці з доктором М. Линдалом із Хебрю університету (Єрусалим, Ізраїль), доктором Д. Неуберг із Дана-Фарбер Гарвардського центру раку (Бостон, Массачусетс, США). Надано інформацію про апробацію результатів досліджень, які були представлені на вітчизняних та закордонних конференціях.

**Розділ 1. Огляд літератури.** Охоплює велику кількість літературних джерел. Він складається із чотирьох підрозділів. У **підрозділі 1.1** автор розглядає сучасну класифікацію мієлопроліферативних неоплазій, наводить показники поширеності класичних Ph-негативних МПН у світі та в Україні, розглядає особливості патогенезу Ph-негативних МПН, обґрунтовує необхідність використання сучасних методичних підходів, що розширюють розуміння патогенезу Ph-негативних МПН та поліпшують їх діагностику.

У **підрозділі 1.2** дається загальна характеристика молекулярно-генетичних пошкоджень при Ph-негативних МПН, описано основні мутації, що обумовлюють розвиток різних нозологічних форм Ph-негативних МПН, підкреслено важливість JAK2 активації внутрішньоклітинного сигналіngu, клініко-гематологічні особливості перебігу в залежності від наявності різних мутацій генів JAK2, MPL, CALR.

У **підрозділі 1.3** розглядаються молекулярно-генетичні зміни, які зустрічаються при різних гематологічних неоплазіях та не обмежені класичними Ph-негативними МПН. Описано зміни генів, залучених до внутрішньоклітинного сигналювання, пухлинної супресії, регулювання метилювання ДНК, модифікації гістонів, транскрипції ДНК, дозрівання РНК та сплайсингу. Це є, мабуть, вузловий підрозділ літогляду. Це саме та частина наших знань про патогенез Ph-негативних МПН, яка, поруч з класичною тріадою (JAK2, MPL, CALR), дає змогу пояснити особливості виникнення і перебігу цих захворювань, свідчить про різноманітність причинно-наслідкових подій у розвитку мієлопроліферативних неоплазій. Порухення збалансованості в геномі у хворих на хронічні Ph-негативні МПН (підрозділ 1.4) може також бути однією з причин їх розвитку. Порівняльна гібридизація геному до оліго та одонуклеотидних проб дозволяє точніше визначати зміни, які не завжди виявляються у цитогенетичних дослідженнях. В цьому підрозділі Лариса Олександрівна наводить дані щодо

впливу Чорнобильської аварії на розвиток Ph-негативних МПН, акцентує увагу ролі інших (у порівнянні з класичними) змін нуклеотидних послідовностей. Підрозділи літературного огляду змістовні і лаконічні. Вони добре освітлюють стан розробок, свідчать про глибоке розуміння автором проблематики дослідження. Доречно, хіба що, було б доповнити ілюстративним матеріалом.

**Другий розділ** дисертаційної роботи присвячений **об'єктам і методам досліджень**. Автор розглядає радіаційно-асоційовані та спонтанні Ph-негативні МПН як об'єкт досліджень, а мутації генів, зміни збалансованості у геномі хворих – як предмет дослідження. Наведено дані щодо 281 хворих із діагнозом Ph-негативних МПН, з них 90 хворих на радіаційно-асоційовані та 191 пацієнтів із спонтанними Ph-негативними МПН. Описано критерії діагностики Ph-негативних МПН ВОЗ 2016 для хворих на підтипи МПН (СП, ЕТ, та ПМФ). Методична частина роботи представлена широким спектром сучасних молекулярно-біологічних методів, що включала отримання ДНК, визначення мутацій генів JAK2, MPL, CALR1-го типу, CALR2-го типу, визначення змін збалансованості геному, повноекзомне секвенування, мішеневе секвенування генів кандидатів, статистичні методи. Хочу підкреслити, що, хоча частина цієї роботи виконувалась у співробітництві з колегами за кордоном, на їх обладнанні, детальний опис методів, трактування результатів свідчить про добру обізнаність авторки та її професіоналізм. Статичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням різних статистичних програм.

**Третій розділ роботи “Результати власних досліджень”** представлено в чотирьох підрозділах. В **підрозділі 3.1** охарактеризовано демографічні та клінічні показники у хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні Ph-негативні МПН. Загалом, проаналізовано історії хвороб 281 пацієнта. Представлені дані щодо віку, статі хворих, проведено їх розподіл за підтипами. Проаналізовано клініко-гематологічні показники хворих, розвиток тромботичних ускладнень, частоту лейкомічної трансформації. В підрозділі описано використання шкали MPN-SAF-TSS, як універсального інструменту оцінки обтяжливих симптомів МПН і наведені відповідні дані.

**Підрозділ 3.2** присвячений дослідженню частоти основних мутацій генів JAK2, MPL, CALR у хворих та їх зв'язок з показниками аналізу крові. Вражає великий об'єм роботи по діагностиці та клінічній характеристиці пацієнтів. Визначені відмінності за частотою основних мутацій JAK2, MPL, CALR серед хворих на радіаційно-асоційовані МПН, у порівнянні із хворими на спонтанні

МПН. Показані закономірності асоціації результатів аналізу крові із мутаціями генів JAK2 та CALR у хворих на ЕТ та ПМФ.

**Третій** підрозділ присвячений дослідженням **геномних змін** у хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні Ph-негативні МПН.

**В підрозділі 3.3.1** наведені результати повноекзомного секвенування ДНК для 30 хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні Ph-негативні МПН. Визначені попередньо відомі та нові міссенс та нонсенс варіанти нуклеотидних послідовностей оцінювали відповідно до стандартів. Для класифікації варіантів використовували різні бази даних. Описано широкий спектр молекулярно-генетичних змін. Хворі на радіаційно-асоційовані Ph-негативні МПН (ПМФ) мають більше патогенних та ймовірно патогенних варіантів нуклеотидних послідовностей, ніж хворі на спонтанні Ph-негативні МПН. Додатково до основних мутацій класичної тріади (JAK2, MPL, CALR) визначались патогенні та ймовірно патогенні варіанти, які у хворих на радіаційно-асоційовані та спонтанні Ph-негативні МПН відрізнялись за деякими генами.

Ще одним підходом для досягнення мети досліджень була робота по змінам збалансованості геному у хворих ПМФ (**підрозділ 3.3.2**). Вона була проведена водночас із повноекзомним секвенуванням для тієї ж групи хворих. Хворі на радіаційно-асоційовані та спонтанні МПН не відрізнялись за частотами змін збалансованості в геномі.

Важливою частиною експериментальної роботи є **підрозділ 3.3.3**, де досліджено варіанти генів-кандидатів, які можуть бути залученими до розвитку Ph-негативних МПН, негативних за основними мутаціями JAK2, MPL, CALR. Інтегруючи результати повноекзомного секвенування у комбінації із змінами збалансованості в геномі у хворих на ПМФ, автор ідентифікувала 309 генів, мутованих принаймні в одному випадку. Надалі було проведено мішеневе секвенування. Одночасно було проведено секвенування у здорових осіб і проаналізовано гени, залучені у різних сполученнях.

**В підрозділі 3.4.** наводяться варіанти нуклеотидних послідовностей, виникнення яких спровоковано дією ІР. Зазначені варіанти не зустрічались серед хворих на спонтанні Ph-негативні МПН та здорових осіб із групи контролю без радіаційного анамнезу. Аналізується їхня функціональна значимість та можлива причетність до розвитку МПН.

Результати експериментальних досліджень досить детально обговорюються в підрозділі **“Аналіз та узагальнення результатів дослідження”**, де Лариса Олександрівна підсумовує і аналізує отримані результати. Слід зазначити, що із такого великого об’єму інформації їй, на мою

думку, вдалося виділити варіанти нуклеотидних послідовностей, що притаманні для Ph-негативних МПН.

Великий об'єм експериментального матеріалу обумовив використання додатків. Їх в роботі – 6, в них наведена інформація про варіанти генних послідовностей, ідентифікованих у хворих за допомогою повноекзомного секвенування, мішеневого секвенування, тощо.

Важливо, що результати експериментів одразу підсумовуються в таблицях, рисунках, порівнюються з результатами авторів з інших країн.

Зауважень до експериментальної частини немає.

Безумовно, вагомою стороною роботи є її практична значимість. Сформовано панель мішеневого секвенування із 309 генів, визначено варіанти нуклеотидних послідовностей, виникнення яких могло бути обумовлено дією ІР. Вони, потенційно, можуть використовуватися у якості маркерів зв'язку захворювання із дією опромінення в анамнезі. Хоча, ця частина потребує ще подальшого доопрацювання.

Загалом, проведена робота є значною за своїм обсягом, трудомісткою як з точки зору використаних методичних підходів (деякі з них апробуються вперше в нашій державі), так і необхідності обробки великих масивів даних. Основні висновки дисертаційної роботи аргументовані і відповідають представленому експериментальному матеріалу. Матеріали дисертації повністю відтворені в публікаціях автора (5 статей, 2 тез) серед них Am. J. of Nematol. (ІР 5,3), знайшли належне висвітлення на наукових форумах (додаток Е). Автореферат повністю розкриває зміст дисертаційної роботи та повноту опублікованих по темі даних.

В процесі роботи над відгуком виникло декілька дискусійних запитань, на які хотілося б почути відповідь Лариси Олександрівни:

1. Ваша дисертація має певне практичне значення. При тому різноманітні виявлені мутації – наскільки на Вашу думку, це може бути використане для діагностики та лікування? Які з цих маркерів Ви вже намагаєтесь використовувати у своїй практиці?
2. Як Ви бачите подальший розвиток цієї тематики в нашій державі?

Дисертаційна робота Полубень Лариси Олександрівни добре оформлена і чітко написана літературною мовою, окремі похибки стилістичного і

технічного характеру, як і низка питань і зауважень дискусійного плану, не знижують її науково-практичну значимість.

Підсумовуючи, вважаю, що дисертаційна робота Полубень Лариси Олександрівни «Молекулярно-генетичні особливості Rh- негативних мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС» за своєю актуальністю, об'ємом, новизною отриманих результатів, науково-практичною значимістю безумовно відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор Полубень Лариса Олександрівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.15 — генетика.

Офіційний опонент, завідувач  
відділу молекулярної генетики  
Інституту молекулярної біології  
і генетики НАН України, д.б.н.

Телегєєв Г.Д.

