



ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Лозинського Ростислава Юрійовича

«Діагностичне та прогностичне значення хромосомних аномалій і мутації *JAK2V617F* при мієлофіброзі»,

що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.31 – гематологія і трансфузіологія.

1. Актуальність теми

Сучасним напрямком терапії гематологічних хворих є індивідуалізація лікування, що стимулює пошук молекулярних, молекулярно-цитогенетичних і цитогенетичних маркерів, які характеризують прогресування пухлинного процесу та прогноз перебігу захворювання. Актуальність дисертаційної роботи Лозинського Р.Ю. зумовлена тим, що направлена на вирішення проблеми оцінки діагностичного та прогностичного значення аномалій каріотипу та мутації *JAK2V617F* при рідкісному, хронічному мієлопроліферативному захворюванні – мієлофіброзі. Не зважаючи на великі успіхи в діагностиці цього захворювання, ціла низка питань залишається не вирішеною. На сьогодні суперечливими є відомості про взаємозв'язок при мієлофіброзі клінічного перебігу, цитогенетичних аномалій зі специфічними генними мутаціями. Об'єднання даних щодо індивідуальних клінічних характеристик хворих і генетичних особливостей уражених клітин крові та кісткового мозку може допомогти встановити, які саме прогностичні чинники корелюють із перебігом захворювання. Наявність генетичних відмінностей між кров'ю і кістковим мозком є суперечливим питанням, однак його вирішення є важливим для достовірнішої оцінки перебігу мієлофіброзу, враховуючи кращу доступність крові для діагностичних процедур. Поширення генетичної інформації та впровадження генетичних методів дослідження в гематологію, відкривають перспективи своєчасного застосування оптимальних схем терапії, що сприяє підвищенню якості

лікування. У межах нашої країни цей аспект досліджень ще не отримав широкого розповсюдження, хоча необхідність його впровадження вже давно настала. Саме цій актуальній і важливій науковій проблемі у гематології присвячена дисертація Р.Ю. Лозинського.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота відповідає плану науково-дослідних робіт, які виконувались протягом 2009-2013 рр. у ДУ "ІІКТМ НАМН": «З'ясувати нові прогностичні фактори перебігу BCR-ABL негативних хронічних мієлопроліферативних неоплазій і розробити принципи їх ризик адаптованої терапії» № державної реєстрації 0114u003143; «Механізми еволюції хронічної мієлоїдної лейкемії внаслідок взаємодії генетично змінених субстратних клітин з окремими регуляторними ланками організму хворих», № державної реєстрації 0111u001426; «Розробити комплекс діагностичних та лікувальних заходів для забезпечення спеціалізованої медичної допомоги хворим на злоякісні пухлини крові» № державної реєстрації 0109u000462.

3. Достовірність та ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Достовірність та обґрунтованість викладених у дисертації наукових положень, перш за все, забезпечена достатнім обсягом первинного експериментального матеріалу, ретельним аналізом результатів клінічних досліджень, використанням демографічної та медичної документації, а також застосуванням сучасних молекулярних, цитогенетичних, молекулярно-цитогенетичних досліджень у комплексі з цитологічними, на зразках біологічного матеріалу: культурах клітин периферичної крові, кісткового мозку, венозної крові із використанням гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора за оригінальною методикою. Висновки узгоджуються з метою та задачами дослідження, достатньо обґрунтовані, правомірні, оскільки впливають із змісту дисертації, базуються на аналізі та узагальненні отриманих власних даних і є логічним завершенням роботи.

4. Новизна та практичне значення результатів

Новизна наукової роботи полягає в тому, що в результаті глибокого, ретельного аналізу та узагальнення власних даних цитологічного, цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень дисертант на великому клінічному матеріалі хворих на мієлофіброз, довів що цитогенетичні аномалії в крові або кістковому мозку хворих на це захворювання пов'язані з коротшим загальним виживанням, а серед аномалій окремих хромосом найчастіше спостерігається моносомія хромосоми 7 – у 8,8 % хворих, та трисомія хромосоми 8 – у 7,0 %. У результаті проведеної роботи вперше було встановлено, що найчастіше серед усіх аномалій каріотипу в клітинах крові та кістковому мозку хворих на мієлофіброз виявляється поліплоїдія, а в поєднанні з поліплоїдними наборами хромосом інші хромосомні аномалії траплялися достовірно частіше, ніж без поліплоїдії.

Лозинський Р.Ю. вперше запропонував проведення цитогенетичного дослідження стимульованої *in vitro* Г-КСФ крові в хворих із сухим пунктятом кісткового мозку та наявністю не менше 12% незрілих мієлоїдних клітин-попередників у лейкоцитарній формулі, оскільки при використанні цього підходу виявлено хромосомні аномалії в 50% хворих, із них у 80 % - прогностично несприятливі за DIPSS-Plus. У роботі дисертант обґрунтовано запропонував використання комбінації цитогенетичного дослідження крові, кісткового мозку та молекулярно-генетичного визначення мутації гена *JAK2* для виявлення клональних маркерів з метою уточнення діагнозу різних неоплазій мієлоїдного паростка кровотворення згідно з рекомендаціями ВООЗ 2008 року.

Важливе практичне значення роботи полягає у використанні периферичної крові в частини хворих на мієлофіброз для проведення цитогенетичного аналізу, що дозволило зменшити кількість і складність інвазійних процедур, полегшити моніторинг прогресування захворювання та прогнозування його подальшого перебігу.

Важливим науковим і практичним здобутком цієї роботи є підтвердження доцільності проведення цитогенетичного дослідження крові в

динаміці через кожні 6-12 місяців для виявлення випадків прогресування захворювання і вчасного призначення паліативної терапії або аlogenної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, так і високої чутливості методу якісного визначення мутації *JAK2V617F*.

На підставі дослідження кола характерних маркерних ознак, що асоціюються з мієлофіброзом, дисертантом створено теоретичні передумови для подальшого опрацювання системи прогнозування перебігу захворювання.

5. Оцінка наукової та літературної якості, складу матеріалу і стилю написання дисертації та автореферату

Дисертація оформлена із дотриманням існуючих правил, побудована за традиційним стилем і складається із вступу, огляду літератури, трьох розділів власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, що налічує 214 найменувань, з яких 187 - іноземних авторів.

Вступ написаний відповідно до вимог, які встановлені для дисертаційних робіт. Переконливо обґрунтована актуальність проведеного дослідження, сформовано мету та 5 задач дослідження.

І розділ – огляд літератури структурований, складається з трьох підрозділів. У ньому представлені сучасні підходи до діагностики мієлофіброзу серед інших захворювань мієлоїдного паростка кровотворення, наведено нові ефективні системи прогнозування перебігу цього захворювання та висвітлено роль цитогенетичних аномалій та мутацій генів *JAK2*, *MPL* та *CALR*. У цілому, огляд охоплює велику кількість даних літератури із питань, що поставлені для вирішення. Зібрана інформація вичерпна, докладна, детально викладена. Здійснений дисертантом аналіз даних літератури свідчить, що систематизовані дослідження щодо генетичних аспектів мієлофіброзу не проводились.

У розділі 2 – «Матеріали та методи дослідження» дисертант дає загальне уявлення про документацію, що була використана у роботі, характеризує клінічний матеріал, який склав основу всього дослідження – 67

хворих на мієлофіброз, які погодилися взяти участь у дослідженні, та архівні дані – ретроспективний аналіз медичної документації 138 хворих. Аналізувалися вікові, статеві, загально-клінічні характеристики пацієнтів: спадковий анамнез, конституційні симптоми, динаміка змін загального аналізу крові з лейкограмою, пальпаторні відхилення, наявність ускладнень, а також дані інструментальних обстежень внутрішніх органів. Автор зупиняється на характеристиці біологічного матеріалу, на якому проводилися молекулярно-генетичні та цитогенетичні дослідження. Детально представлені застосовані методи дослідження: клінічний, генеалогічний та лабораторні - молекулярно-генетичний, молекулярно-цитогенетичний і цитогенетичні, а отримані результати оцінені з використанням методик статистичного аналізу. Вважаю, що кількість використаного матеріалу достатня для проведення запланованих досліджень, а обрані методичні підходи адекватні поставленим задачам.

Висвітлення результатів власних досліджень починається з розділу 3, який складається з трьох підрозділів. У підрозділах логічно, чітко і аргументовано на основі адекватно підібраних методів клінічних і генетичних досліджень та статистичного аналізу приведені статево-вікові характеристики хворих на мієлофіброз, наведені результати цитологічного та гістологічного дослідження кісткового мозку, основні ускладнення перебігу хвороби, супутня патологія та сімейний анамнез. Велику увагу Лозинський Р.Ю. приділив особливостям вибору дози терапевтичних засобів, результатам терапії хворих на мієлофіброз, оцінці виживання і характеристиці померлих пацієнтів.

Особливо слід відмітити підрозділ дисертації присвячений вивченню взаємозв'язку цитогенетичних аномалій із перебігом мієлофіброзу з використанням оригінальних методик лабораторної діагностики і вдалим підтвердженням отриманих результатів за допомогою найсучасніших молекулярно-цитогенетичних методів. Результати дослідження представлено у вигляді інформативних таблиць і наочних рисунків, якісних

мікрофотографій хромосом, їх проаналізовано та порівняно з даними світової літератури. У третьому підрозділі роботи висвітлено прогностичне значення молекулярно-генетичних аномалій у виживанні пацієнтів із мієлофіброзом та встановлено частку хворих із мутацією *JAK2V617F* при первинному мієлофіброзі серед обстеженої групи хворих. У роботі достовірно підтверджено вищу частоту прогностично несприятливих за DIPSS-Plus цитогенетичних аномалій у хворих із мутацією *JAK2V617F*.

У результаті кожного з трьох фрагментів досліджень отримані інформативні дані, які можуть слугувати об'єктивними критеріями для проведення якісної діагностики і адекватного лікування хворих на мієлофіброз. У останньому розділі роботи проведено остаточний аналіз та узагальнення отриманих результатів. Підводячи підсумки отриманих даних, дисертант детально вдається у подробиці того, що висвітлювалось у інших розділах. Проводячи паралелі між результатами власних досліджень та відомостями, що існують у доступній світовій літературі, Р.Ю. Лозинський, обговорює їх із власним ставленням до них, коментарями, критичною думкою щодо певних положень. Важливим здобутком роботи є запропоновані автором алгоритми діагностики і лікування хворих на мієлофіброз.

Робота викладена логічно, професійно і грамотно. Дисертант показав справжню обізнаність у всіх питаннях, що порушені у роботі.

Принципових зауважень до роботи немає. Сім чітко сформульованих висновків логічно витікають із змісту дисертації.

За матеріалами дисертації видано 22 публікації, з яких 9 представлені у провідних наукових фахових журналах, затверджених ДАК України, у 12 тезах доповідей на з'їздах і конференціях та одержано один патент на корисну модель. Особливо цінним є особиста участь Лозинського Р.Ю. на численних вітчизняних і міжнародних престижних наукових форумах, в тому числі на основі грантів Європейської гематологічної асоціації (ЕНА) – у Лондоні і Мілані.

У цілому робота заслуговує на позитивну оцінку.

6. Відповідність автореферату змісту дисертації. Основні положення, що виносяться на захист та найважливіші результати досліджень, знайшли відображення у авторефераті дисертації. Автореферат представлено інформативно, його зміст повністю відповідає суті дисертації.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі побажання.

Пропозиція щодо проведення цитогенетичного дослідження крові в динаміці через кожні 6-12 місяців для виявлення випадків прогресування захворювання потребує подальшого уточнення щодо точного визначення термінів моніторингу, оскільки передбачає впровадження ряду коштовних, хоч і малоінвазивних заходів в клінічну практику.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли наступні занитання.

1. Автором запропоновано проведення цитогенетичного дослідження стимульованої *in vitro* Г-КСФ крові в хворих із сухим пунктатом кісткового мозку та наявністю не менше 12% незрілих мієлоїдних клітин-попередників у лейкоцитарній формулі. Чи розглядали Ви тестування ефективності даного показника порівняно з іншими можливими рівнями незрілих мієлоїдних клітин-попередників у лейкоцитарній формулі за допомогою, наприклад, розрахунку площі під кривою.

2. В своїй роботі Ви використовували ВООЗ класифікацію мієлоїдних неоплазій 2008 року, на Вашу думку чи слід очікувати нової інтерпретації результатів від переосмислення отриманих даних в контексті класифікації ВООЗ 2016 року і нових критеріїв встановлення діагнозів, що нещодавно опубліковані.

3. В деяких випадках, коли хворим паралельно проводилося цитогенетичне дослідження периферичної крові та кісткового мозку, каріотип клональних клітин, отриманих із різних джерел, відрізнявся. Чим це можна пояснити?

4. Ви вказуєте, що у переважної більшості хворих на МФ встановлено факт співіснування нормального та патологічного кровотворення. Чи були в такому разі ознаки, що в якомусь випадку в Вашій вибірці кровотворення було представлено тільки патологічним клоном. Чи можливо це поза контекстом термінального фіброзу або трансформації в гостру лейкемію?

5. У дослідженні виявлена вища частота мутацій гену *JAK2V617F* в групі хворих із несприятливими цитогенетичними аномаліями. Чи проводився окремий аналіз частоти таких аномалій при порівнянні випадків пост-поліцитемічного мієлофіброзу з випадками первинного та пост-тромбоцитемічного мієлофіброзу, оскільки ці дві групи будуть відрізнятися саме частотою представлення мутації *JAK2V617F*?

6. Також було встановлено, що за наявності мутації *JAK2V617F* відсоток хворих залежних від трансфузій достовірно менший, ніж серед хворих без цієї мутації. Чи не зумовлено це тим, що в групу хворих з мутацією попадали пацієнти з пост-поліцитемічним мієлофіброзом?

7. Чи існували особливості перебігу мієлофіброзу, який характеризувався наявністю або аномалій хромосоми 5 та/або аномалій хромосоми 7 щодо розвитку вторинної гострої лейкемії.

7. Висновок.

Дисертаційна робота Лозинського Ростислава Юрійовича «Діагностичне та прогностичне значення хромосомних аномалій і мутації *JAK2V617F* при мієлофіброзі», є закінченою, самостійно виконаною науково-дослідною роботою, у якій на підставі систематизованого комплексного дослідження, виконаного на великому за об'ємом матеріалі з використанням клінічного, цитогенетичних, молекулярно-цитогенетичного та молекулярно-генетичного методів запропоновано теоретичне узагальнення та нове

вирішення науково-практичної задачі діагностичного та прогностичного значення аномалій каріотипу та мутації *JAK2V617F* при мієлофіброзі.

На підставі зазначеного вважаю, що за актуальністю теми, обсягом використаних у дослідженні матеріалів та методичних підходів для вирішення поставлених задач, вагомістю внеску отриманих даних у фундаментальні знання з мієлофіброзу та цінністю щодо можливості застосування у практиці, дисертація Лозинського Р.Ю. «Діагностичне та прогностичне значення хромосомних аномалій і мутації *JAK2V617F* при мієлофіброзі», відповідає вимогам п. 11 та п. 13 постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 “Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, які ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор, Лозинський Р.Ю., заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.31 – гематологія і трансфузіологія.

Офіційний опонент

завідувач відділу медичної генетики

Інституту експериментальної радіології

Державної установи «Національний центр
радіаційної медицини НАМН України»

доктор медичних наук



С.В. Клименко

