

Відгук

офіційного опонента – доктора медичних наук, професора Боярчук Оксани Романівни, завідувача кафедри дитячих хвороб з дитячою хірургією Тернопільського національного медичного університету ім.І.Я.Горбачевського МОЗ України, на дисертаційну роботу Винницької Олени Андріївни «Особливості мутаційного статусу при гострій лімфобластній лейкемії в дітей», подану до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 35.600.057 створену згідно до наказу ректора Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького №1047-з від 23.03.2023 року на підставі рішення Вченої ради ЛНМУ імені Данила Галицького № 2-ВР від 22.03 .2023 із змінами (наказ №1386-3 № від 26.04.2023 року) з правом прийняття до розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 228 «Педіатрія»

1. Актуальність теми дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Винницької Олени Андріївни присвячена вирішенню актуального наукового завдання – удосконаленню моніторингу перебігу гострої лімфобластної лейкемії (ГЛЛ) у дітей, розробленого на підставі вивчення цитохімічних, імунофенотипових та молекулярно-генетичних змін у клітинах крові, пов'язаних з хворобою, що має суттєве значення для дитячої гематології та педіатрії.

Щороку в сіті реєструють більше 18 мільйонів нових випадків онкологічних захворювань та більше 9 мільйонів помирає. Гемобластози посідають одне з провідних місць у структурі онкопатології у дітей, на них припадає більше третини нових випадків пухлин щорічно. Одна з найбільш важливих характеристик захворювання та ефективності або неефективності лікування є смертність дітей від цього захворювання. І хоча ефективність лікування за останні роки значно покращилась і досягає до 80-90%, ризик розвитку рецидивів все ж залишається у 10-20% дітей.

Якщо врахувати, що захворюваність на гостру лімфобластну лейкемію зросла за останні 5 років більше, ніж у 7 разів, то актуальність вирішення проблеми підвищення ефективності персоналізованого лікування та можливостей прогнозування перебігу і виникнення рецидивів захворювання у дітей стає очевидною.

Наявність мінімальної залишкової хвороби та генні мутації, хромосомні аберації можуть бути чинниками виникнення рецидивів та несприятливого перебігу лейкемій. Тому для планування ефективних засобів ранньої діагностики та прогнозування перебігу даної патології, оптимального обсягу діагностичних, лікувальних та реабілітаційних заходів доцільно проводити молекулярно-генетичну діагностику ГЛЛ. З даного огляду визначається актуальність даної дисертаційної роботи, яка направлена на удосконалення моніторингу перебігу ГЛЛ і, відповідно, покращення ефективності лікування і, відповідно прогнозу і якості життя пацієнтів.

Вивчення прогностичної значимості імунофенотипових маркерів ГЛЛ та пошук стійких імуноцитогенетичних асоціацій набуває особливого значення в

останні роки і зумовлює важливість дослідження.

Певні проблеми, які дисертант піднімає у дослідженні, є маловивченими на сьогодні, зокрема питання діагностичного і прогностичного значення химерних генів *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML* у перебігу гострих лейкемій у дітей, механізми участі химерних протеїнів, іммуноцитогенетичні асоціації і їх роль в онкогенезі.

Усе вищезазначене окреслює актуальність та доцільність дисертаційного дослідження з вивчення молекулярно-генетичних змін у клітинах крові і іммунофенотипових маркерів ГЛЛ.

2. Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом наукових досліджень Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та складовою частиною науково-дослідних тем кафедри педіатрії і неонатології факультету післядипломної освіти: «Характеристика перинатальної патології, іммунопатологічних станів, впливу екзогенних чинників на стан здоров'я і якість життя дітей з різних груп ризику» (номер державної реєстрації: 0114U000108), «Вивчення впливу екологосоціальних та мікросоціальних чинників на розвиток патологічного стану у дітей шляхом удосконалення методів ранньої діагностики лікування та профілактики.» (№ державної реєстрації 0119U100141).

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота виконана на сучасному рівні з використанням адекватних методів дослідження. Вірогідність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків дисертаційної роботи визначається достатнім за обсягом матеріалом, зокрема, обстежено 105 дітей із вперше діагностованою ГЛЛ, які знаходились на лікуванні у гематологічних відділеннях низки лікарень України: Одеса, Харків, Чернівці, Рівне з 2016 до 2019 року.

Дослідження проведене з використанням загально-клінічного, лабораторного, інструментального і статистичного методів. Проводилось цитохімічне дослідження; іммунофенотипування бластних клітин методом проточної цитофлуориметрії; молекулярно-генетичне дослідження бластів.

Молекулярно-генетичні дослідження з визначенням генних гібридів проводилось за допомогою FISH-методу. Для виявлення рівня експресії злитих генів *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML* застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Отримані результати коректно проаналізовані із залученням сучасних методів статистичної обробки, що підтверджує їх обґрунтованість і достовірність. Для прогнозування виживання використовували метод Каплан-Майєра, для порівняння між групами - F-критерію Кокса.

Висновки дисертаційної роботи відповідають меті та завданням дослідження, базуються на його результатах, є аргументованими, мають теоретичне та практичне значення та являють собою логічне завершення

роботи в цілому.

4. Новизна одержаних результатів проведених здобувачем досліджень

Дисертантка вперше у вітчизняній медицині встановила роль мінімальної залишкової хвороби (MRD) як незалежного несприятливого прогностичного фактора розвитку рецидиву, що важливо враховувати під час розробки комплексної цитостатичної терапії.

Авторкою доведено, що у пацієнтів з рецидивом захворювання зустрічались імунофенотипові аберації, не властиві нормальним гемопоетичним клітинам. Врахування цього факту дозволить персоніфікувати цитостатичну хіміотерапію з метою попередження цих рецидивів. Встановлено, що наявність *AF4/MLL* та *BCR/ABL* химерних генів є найвищою групою ризику ГЛЛ.

Дисертанкою визначено, що значне зниження експресії онкогена *BCR/ABL* під час повної ремісії захворювання, що свідчить про ефективність вибраної терапії для досліджуваної групи хворих. Врахування цього факту дозволить спрогнозувати індивідуальну відповідь пацієнта на застосовану терапію.

5. Теоретичне значення результатів наукового дослідження

Дисертанткою науково обґрунтовані шляхи удосконалення перебігу ГЛЛ у дітей на підставі вивчення молекулярно-генетичних змін у клітинах крові. Обґрунтовано доцільність визначення наявності генних гібридів за допомогою FISH-дослідження, а також рівня експресії генів полімеразною ланцюговою реакцією.

6. Практичне значення одержаних результатів

Практична значимість дисертаційної роботи полягає наданні для практичної медицини важливих маркерів, які дозволяють спрогнозувати ризик виникнення рецидивів та персоніфікувати цитостатичну терапію для їх попередження. Наявність мінімальної залишкової хвороби вказує на ризик розвитку рецидиву, а певні молекулярно-генетичні транслокації (*BCR/ABL1* та *E2A/PBX1*) пов'язані з високою стійкістю до хіміотерапії, несприятливим перебігом, що вказує на потребу інтенсифікації терапії. Використання вказаних маркерів дозволить підвищити ефективність лікування ГЛЛ, покращити прогноз та якість життя пацієнтів.

Впровадження результатів дослідження в практику роботи служби охорони здоров'я проводилося на галузевому та регіональному рівнях. Результати досліджень впроваджені в роботу гематологічного відділення та інтенсивної хіміотерапії КНП ЛОР «Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр», м. Львів; онкогематологічне відділення КНП ІОР «Івано-Франківська обласна дитяча клінічна лікарня»; онкогематологічне відділення КНП РОР «Рівненська обласна дитяча лікарня»; гематологічне відділення КНПР ЧОР «Чернівецька обласна клінічна дитяча лікарня».

7. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях

Основні результати і наукові положення дисертації висвітлені автором у 10 наукових працях, у тому числі у 6-ти статтях у фахових виданнях України, 1 – в іноземних періодичних виданнях; 3 тез опубліковано у наукових збірниках, матеріалах наукових конференцій.

8. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота написана за традиційною схемою, викладена українською мовою на 162 сторінках машинописного тексту і складається з анотації (українською та англійською мовами), списку публікацій дисертанта за темою роботи, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 2-х розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 12 таблицями і 29 рисунками. Список літератури включає 148 найменувань (11 – кирилицею, 137 – латиною) та підтверджує глибину літературного пошуку й ознайомлення автора із сучасними науковими працями щодо предмету дослідження. За обсягом і структурою дисертаційна робота Винницької О. А. відповідає сучасним вимогам ДАК МОН України.

Анотація містить всі необхідні елементи відповідно до вимог.

У вступі автором аргументовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання дослідження, визначено предмет та об'єкт дослідження; методи дослідження; викладено погляд автора на наукову новизну і практичну значимість одержаних результатів. Відображено особистий внесок дисертанта, апробацію матеріалів дисертації та публікації з даної теми.

У розділі «Огляд літератури» автор показав вміння проводити науковий пошук, аналізувати результати наукових досліджень, виявляти недосліджені та дискусійні питання, що свідчить про широку професійну ерудицію та наукову зрілість дисертанта. Розділ викладений на 32 сторінках, складається з 4-х підрозділів, в яких розглядаються питання поширеності гострих лімфобластних лейкемій, дано клініко-епідеміологічну характеристику лімфобластних лейкемій, описано прогнозування ефективності терапії після рецидиву ГЛЛ та розкрито імунно-фенотипову діагностику та молекулярно-генетичний аналіз гострих лейкемій. В літературному огляді детально аналізується значення та роль комплексного підходу до стратифікації дітей з ГЛЛ та підкреслюється необхідність у визначенні нових чинників, що можуть впливати на прогноз перебігу ГЛЛ у дітей. Розділ викладений послідовно, добре читається, завершується двома загальними висновком, проте у них не достатньо відображено необхідність проведення подальшого дослідження наукової проблеми.

Розділі «Матеріали й методи дослідження» складається з двох підрозділів. В першому підрозділі автор надає характеристику хворих, у другому – описує методи дослідження. Дослідження включає 105 дітей із

вперше діагностованою гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ), які знаходились на лікуванні у гематологічних відділеннях різних областей України. Медіана віку пацієнтів становила 6 років. Дисертант детально описує терапію, що проводилась за програмою міжнародної групи BFM – ALLIC-BFM 2009, яка затверджена МОЗ України як галузевий стандарт у 2010 р. В другому підрозділі автор перераховує статистичні методи дослідження, які застосовувались у дисертаційному дослідженні.

Третій розділ «Загальна імунофенотипова характеристика бластних клітин» складається з трьох підрозділів, у яких автор викладає результати власних досліджень. Підрозділи присвячені аналізу результатів клініко-лабораторних особливостей прогнозу перебігу ГЛЛ у дітей, характеристиці бластних клітин при рецидиві ГЛЛ в обстежених дітей та аналізу імунофенотипової характеристики ГЛЛ у обстежених дітей.

В першому підрозділі дисертантка детально аналізує результати основних показників кісткового мозку та периферичної крові у дітей, хворих на ГЛЛ, на час встановлення діагнозу та під час первинної відповіді на індукційне лікування. Авторка проводить аналіз первинної відповіді дітей на терапію з розподілом хворих до терапевтичного ризику при застосуванні програми лікування ALL IC-BFM2009 і в кінці розділу аналізує клініко-лабораторні особливості прогнозу перебігу ГЛЛ у дітей. Проте, дисертанткою наводиться в основному лабораторна характеристика пацієнтів та узагальнення клінічних особливостей. Деякий цифровий матеріал тексту повторює дані таблиць.

У другому підрозділі третього розділу автор показує, що у 12 % дітей виявлена часткова резистентність до хіміопрепаратів, що проявлялося рецидивом захворювання. Детально аналізує показник виживання на основі кривих Каплан–Майєра і показує, що безрецидивне виживання дітей склало 85% протягом 6,6 років (80 міс) спостереження, тоді як безподійне виживання (в якості «події» був прийнятий факт смерті хворого від основного захворювання) становило 78,7 %. Аналіз безрецидивного виживання дітей з ГЛЛ залежно від віку показав, що найвище виживання хворих спостерігалось у дітей віком старше 12 років (144 міс.), у яких виживання до 46 міс було на рівні 100%. У дітей віком від 1 до 6 років (12-72 міс.) безрецидивне виживання становило 87% починаючи з 47 міс. після проведення курсу хімотерапії.

Автор наводить дані (в тому числі графічні) визначення мінімальної залишкової хвороби як незалежного критерію оцінки відповіді організму дитини на терапію і робить висновок, що у пацієнтів з повною ремісією на 33-ю добу лікування показник MRD знижується з 3,55 до 0,0% в той час, у пацієнтів, у яких в подальшому був виявлений рецидив захворювання, зниження MRD не досягало значень характерних для пацієнтів з ремісією. Автор робить висновок, що за даними рівня бластних клітин та показником MRD у кістковому мозку та крові можна передбачити ефективність лікування та можливий розвиток рецидивів ГЛЛ.

В останньому підрозділі третього розділу автор наводить результати імунофенотипової класифікації ГЛЛ у обстежених дітей та оцінку лінійності лімфобластів. В підрозділі показано, що у 85,7% дітей діагностовано В-лінійну

ГЛЛ, а у 14,3 %— Т-лінійну ГЛЛ. Автор робить висновок, що аналіз імунофенотипу бластних клітин КМ з використанням МКАТ допомагає визначити форму ГЛЛ, що дозволяє спрогнозувати перебіг захворювання.

Четвертий розділ дисертації «Молекулярно-генетична характеристика бластних клітин і перебіг гострої лімфобластної лейкемії» має 2 підрозділи. В ньому викладено аналіз клініко-лабораторних особливостей ГЛЛ у дітей залежно від виявлених молекулярно-генетичних транслокацій та описуються окремі молекулярно-генетичні транслокації у дітей з ГЛЛ. Дисертантка аргументовано доводить зв'язок кількості лейкоцитів в периферичній крові з видом хромосомної аберації і утворенням химерних генів в обстежених дітей.

Авторка наголошує, що однією з ознак лейкемій, є хромосомна транслокація з утворенням так званих химерних генів. Подальша експресія химерних генів призводить до синтезу химерних протеїнів, структурно-функціональні властивості яких змінені. Такі протеїни набувають онкогенних властивостей. Автор вказує, що хромосомні аберації мали місце у 22 % обстежених пацієнтів до проведення курсу хіміотерапії. В обстежених дітей найчастіше зустрічались хромосомні аберації в результаті транслокацій генів *TEL* і *AML* (21,5%), які кодують ядерні транскрипційні фактори, що відіграють лімітуючу роль в нормальному гемопоезі. Проведені молекулярно-генетичні дослідження в динаміці специфічного лікування показали, що у пацієнтів із виявленими рецидивами ГЛЛ ідентифікувалися хромосомні транслокації таких генів як *AF4/MLL*; *BCR/ABL*; *E2A/PBX1*. Автор робить дуже важливий висновок, що клітини пухлинного клону мають нестабільний геном, у результаті чого у химерних генах *AF4/MLL*, *BCR/ABL* та *E2A/PBX1* можуть відбутися мутації, які призводять до зміни конформації онкогенних білків, у результаті чого цитостатики втрачають здатність блокувати онкогени та посилену проліферацію клітин, які, у свою чергу, набувають резистентності до препарату. Тому, вкрай необхідним є своєчасне виявлення нечутливості пухлинних клітин при ГЛЛ до цитостатиків, що дозволить провести персоналізовану корекцію лікувальної тактики хворого.

Завершується четвертий розділ саме аналізом результатів експресії химерних генів *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML* в обстежених дітей. Автор встановила, що у пацієнтів з ГЛЛ спостерігалась найвища експресія в онкогена *BCR/ABL*, що вказує на його ключову роль у розвитку ГЛЛ у дітей. Розділ закінчується висновками та опублікованими матеріалами.

У розділі «Узагальнення й обговорення» проведено наукове аналіз сучасних джерел літератури та узагальнені власні дослідження. В розділі не проведено обговорення отриманих власних результатів у порівнянні з літературними джерелами, а в основному проводиться узагальнення джерел літератури і результатів власних досліджень.

Висновки ґрунтуються на отриманих результатах власного дослідження, є логічними, змістовними та достовірними. Вони віддзеркалюють основні результати дисертаційного дослідження та мають теоретичне і практичне значення.

Практичні рекомендації містять можливості використання важливих результатів дослідження в практичній медицині, зокрема, в дитячій гематології.

Список використаних джерел літератури представляє сучасні джерела фахових публікацій, в основному зарубіжні.

9. Практичне втілення результатів дисертації.

Запропоновані підходи до персоніфікації прогнозування рецидивів ГЛЛ та лікування дітей з ГЛЛ з використанням цитохімічних, імунофенотипових та молекулярно-генетичних маркерів можуть бути використані в якості доповнення до нормативних документів на різних організаційних рівнях та в роботі педіатричної служби при вдосконаленні профілактичних і лікувальних заходів при лімфобластних лейкозах у дітей.

10. Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача

Дисертаційна робота за змістом та оформленням відповідає існуючим вимогам. Однак дисертанці варто було б звернути увагу на певні недоліки:

1. В науковій новизні потрібно чіткіше виділити дані, які дисертант отримав вперше.

2. В розділі 2 повинно бути вказано про погодження дослідження комісією з біоетики, а також вказано про наявність інформованої згоди батьків.

3. В розділі 3, підрозділ 3.1 має назву «Клініко-лабораторні особливості прогнозу перебігу ГЛЛ у дітей», проте в підрозділі в основному висвітлено характеристику лабораторних даних, а клінічна характеристика хворих є лише узагальнена, без аналізу і цифрових даних. Клінічна характеристика пацієнтів була б бажаною у даному розділі.

4. Певні рисунки розділу 2 потребують підписів. В окремих рисунках і таблицях в розділах 3 і 4 є технічні помилки відображення даних, підписів.

5. Дані таблиць часто повторюються в тексті, без узагальнень.

6. У розділі «Узагальнення й обговорення» проведено здебільшого узагальнення власних результатів і літературних джерел із слабким акцентом на їх аналіз та порівняння отриманих результатів з результатами інших дослідників.

Наведені зауваження не зменшують наукової новизни, теоретичного і практичного значення отриманих автором результатів.

У ході рецензування дисертаційної роботи виникли запитання для дискусії:

1. Як на Вашу думку, чому пік захворюваності на ГЛЛ припадає на 2-5 років і чому в цьому віковому періоді досягаються кращі результати лікування?

2. Де проводилось визначення генних гібридів за допомогою FISH-дослідження, визначення рівня експресії генів? Яка була Ваша роль у цих дослідженнях?

3. Як на Вашу думку, на скільки відсотків можна покращити прогноз для життя хворих на ГЛЛ за рахунок визначення маркерів несприятливого перебігу та модифікації схем лікування?

11. Висновок щодо відповідності дисертації вимогам, які висуваються до наукового ступеня доктора філософії

Дисертаційна робота Винницької Олени Андріївни «Особливості мутаційного статусу при гострій лімфобластній лейкемії в дітей» оформлена згідно з вимогами до оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12.01.2017 р № 40; є завершеною самостійною науково-дослідною роботою, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу, яка полягає в удосконаленні моніторингу перебігу гострої лімфобластної лейкемії у дітей, на підставі вивчення цитохімічних, імунофенотипових та молекулярно-генетичних змін у клітинах крові, пов'язаних з хворобою, що має суттєве значення для педіатрії, зокрема, для дитячої онкогематології.

За актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, методичним рівнем, теоретичним і практичним значенням, обсягом виконаних досліджень дисертація відповідає вимогам, передбаченим пунктами 6-9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 року № 44, які висуваються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор, Винницька Олена Андріївна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 228 «Педіатрія» у галузі знань 22 «Охорона здоров'я».

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри дитячих хвороб
з дитячою хірургією Тернопільського
національного медичного університету
ім.І.Я.Горбачевського МОЗ України
доктор медичних наук, професор

О. Боярчук