

УТВЕРЖДАЮ

Директор ГУ «РНПЦ радиационной
медицины и экологии человека»



А.В. Рожко

«25» января 2024 года

ОТЗЫВ

оппонирующей организации ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»
на диссертационную работу Вшивковой Ольги Сергеевны
«Аберрации гена транскрипционного фактора IKZF1 при В-линейных острых лимфобластных лейкозах», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови (биологические науки).

В соответствии с п. 42 главы 6 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий», утвержденного Указом Президента Республики Беларусь 17.11.2004 №560 (в редакции Указа Президента Республики Беларусь 02.06.2022 №190), п.п. 38, 44, 45 «Положения о совете по защите диссертаций», утвержденного Постановлением Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь 22.02.2005 №19 (в редакции постановления Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь 19.08.2022 №2), на основании решения совета по защите диссертаций Д 03.11.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» от 29.12.2023 г. в соответствии с приказом директора государственного учреждения «Республиканский научный практический центр радиационной медицины и экологии человека» (далее – ГУ «РНПЦ РМиЭЧ») от 17.01.2024 № 38-од, проведено расширенное заседание Ученого совета (научное собрание, протокол №1) при участии членов Ученого совета ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», сотрудников лабораторий эпидемиологии, радиационной защиты, клинических исследований, отраслевой лаборатории научно-диагностических исследований, сотрудников отделения аллергологии и иммунопатологии, гематологического и эндокринологического отделений ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» по обсуждению диссертации Вшивковой Ольги Сергеевны «Аберрации гена транскрипционного фактора IKZF1 при В-линейных острых лимфобластных лейкозах», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови (биологические науки).

Председатель научного собрания: заместитель директора (по научной работе) ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», д.м.н., профессор Виктор Михайлович Мицура.

Эксперт по диссертации: Силин Аркадий Евгеньевич, биолог лаборатории клеточных технологий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», кандидат биологических наук, доцент.

Секретарь заседания: Наталия Николаевна Веялкина, ученый секретарь ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», кандидат биологических наук.

Заседание состоялось 24 января 2024 года в 12.00. На заседании присутствовало 31 человек, из них: докторов медицинских наук – 2, кандидатов медицинских наук – 18, кандидатов биологических наук – 6, кандидат технических наук – 1, кандидат сельскохозяйственных наук – 1, без степени – 3. На научном собрании О.С. Вшивковой представлен доклад по диссертации, содержащий основные результаты исследования. Соискателю заданы вопросы, на которые получены полные ответы. Диссертация выполнена соискателем в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» под руководством к.б.н. Мелешко Александра Николаевича.

В выступлении эксперта по диссертации Силина А.Е., биолога лаборатории клеточных технологий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», к.б.н., доцента были изложены основные положения проекта отзыва диссертации, в котором отражены следующие разделы.

Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите

Диссертационная работа Вшивковой Ольги Сергеевны «Аберрации гена транскрипционного фактора IKZF1 при В-линейных острых лимфобластных лейкозах» полностью соответствует паспорту специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови, а именно п. 2 «Этиопатогенез, лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний крови и кроветворных органов (наследственных и приобретенных, у взрослых и детей): гемобластозы, анемии и депрессии кроветворения, гемостазиопатии (молекулярно-биологические, генетические, цитогенетические, морфологические, биохимические, биофизические, иммунологические, вирусологические, статистические и другие методы исследований)» утвержденного приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 4 июля 2018 г. № 161, отрасли – «биологические науки», по которым она представлена к защите.

Научный вклад соискателя в решение научной задачи с оценкой его значимости

Диссертационная работа Вшивковой О.С. вносит вклад в решение проблемы лабораторной диагностики первичного В-линейного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) и предлагает эффективные методы выявления

аберраций гена транскрипционного фактора IKZF1, значимых при прогнозировании риска развития рецидивов у пациентов с данным заболеванием.

Соискателем представлен аналитический обзор литературы, в котором детально описаны структура и свойства предмета исследования, функции гена IKZF1 в норме и при наличии aberrаций, а также существующие диагностические подходы и актуальные проблемы, связанные с предметом и объектом исследования.

Содержащиеся в работе результаты собственных исследований автора являются новыми и оригинальными.

Автором впервые проведена идентификация и количественный анализ изоформ гена IKZF1 в лейкозных клетках и моноклеарных клетках доноров костного мозга, и установлено, что для пациентов с В-ОЛЛ характерна повышенная экспрессия только трех коротких изоформ.

Впервые разработан способ определения aberrаций гена IKZF1, представляющий собой количественную оценку уровня экспрессии трех клинически значимых коротких доминантно-негативных изоформ в единой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР).

Впервые в Республике Беларусь автором показано, что aberrации IKZF1 при В-ОЛЛ являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива для пациентов группы стандартного риска с преобладанием ранних рецидивов.

Помимо новизны практического характера, автором проведены фундаментальные эксперименты, которые, помимо полученных в диссертации результатов, имеют широкий потенциал для дальнейших исследований. А именно, в экспериментах *in vitro* впервые продемонстрировано, что для лейкозных клеточных линий K562^{Ik6} и Nalm-6^{Ik6}, aberrантно экспрессирующих короткую изоформу Ik 6, характерно снижение чувствительности к воздействию ингибитора тирозинкиназ (иматиниба) и увеличение чувствительности к воздействию глюкокортикоидов (преднизолон и дексаметазон), при этом процессы, задействованные в модификации лекарственной устойчивости в двух типах лейкозных клеточных линий, отличаются.

Соискателем проведена валидация разработанного метода количественной оценки уровня экспрессии трех клинически значимых коротких доминантно-негативных изоформ IKZF1 в единой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР), что позволило определить его диагностическую специфичность, чувствительность и эффективность. Рассчитана экономическая эффективность применения метода, которая

выражается в экономии средств на лечения пациента в случае предотвращения рецидива заболевания.

Целесообразность лабораторной диагностики aberrаций гена IKZF1 научно обоснована: доказано, что у пациентов детского и молодого взрослого возраста с В-ОЛЛ наличие aberrаций IKZF1 связано с замедлением темпа регрессии минимальной остаточной болезни, повышением частоты и риска развития рецидивов в 1,6 раза, с преобладанием ранних рецидивов в период от 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза. При этом, для пациентов группы стандартного риска aberrации IKZF1 являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива, тогда как для второго и последующих рецидивов маркер не имеет прогностической значимости.

Также показано, что aberrации гена IKZF1 могут быть использованы в качестве дополнительного маркера для отслеживания минимальной остаточной болезни.

Таким образом, научные результаты, выносимые на защиту, обладают высокой степенью новизны и научной значимости.

Конкретные научные результаты, их новизна и практическая значимость, за которые соискателю может быть присуждена ученая степень кандидата биологических наук

На основании результатов выполненных исследований в соответствии с научными положениями, выносимыми на защиту, получены принципиально новые результаты, представляющие научную ценность, а именно:

1. Впервые проведена идентификация и количественный анализ изоформ гена IKZF1 в лейкозных клетках и моноклеарных клетках доноров костного мозга, и установлено, что для пациентов с В-ОЛЛ характерна повышенная экспрессия только трех коротких изоформ.

2. Впервые разработан способ определения aberrаций гена IKZF1, представляющий собой количественную оценку уровня экспрессии трех клинически значимых коротких доминантно-негативных изоформ в единой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.

3. В экспериментах *in vitro* впервые продемонстрировано, что для клеточных линий K562^{Ik6} и Nalm-6^{Ik6}, aberrантно экспрессирующих короткую изоформу Ik 6, характерно снижение чувствительности к воздействию ингибитора тирозинкиназ (иматиниба) и увеличение чувствительности к воздействию глюкокортикоидов (преднизолон и дексаметазон), при этом повышение активности процессов репарации двойных разрывов и смещение клеточного цикла в сторону синтетической фазы свойственно только для линии K562^{Ik6}.

4. Впервые показано, что аберрации IKZF1 при В-ОЛЛ являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива для пациентов группы стандартного риска с преобладанием ранних рецидивов.

Научная значимость результатов диссертации подтверждается публикациями полученных результатов в отечественных и зарубежных научных изданиях.

Практическая значимость: в результате исследований, выполненных автором диссертационной работы, разработаны методы определения аберраций гена IKZF1, представляющие собой количественную оценку уровня экспрессии трех клинически значимых коротких доминантно-негативных изоформ в единой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР) и мультиплексную полимеразную цепную реакцию для выявления делеций гена IKZF1, проведен сравнительный анализ методов, в том числе с существующими коммерческими методами. Проведена апробация собственных методов, в результате которой метод определения трех коротких доминантных изоформ рекомендован как наиболее чувствительный и специфичный в отношении определения аберраций IKZF1. Внедрение метода в ГУ «РНПЦ ДОГиИ» позволило повысить эффективность диагностики первичных В-ОЛЛ у пациентов детского и молодого взрослого возраста на республиканском уровне оказания медицинской помощи.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Диссертация Вшивковой О.С. «Аберрации гена транскрипционного фактора IKZF1 при В-линейных острых лимфобластных лейкозах» по своему объему, оформлению, новизне и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь к кандидатским диссертациям.

Для достижения поставленной в диссертационной работе цели, автором самостоятельно выполнены научные исследования, требующие высокой научной и профессиональной подготовки. Для реализации поставленных в диссертационной работе задач применен широкий спектр современных высокочувствительных методов цитогенетического, молекулярно-генетического анализа и геномной инженерии, которые позволили получить объективные и актуальные данные. Исследование выполнено на достаточном для проведения анализа и формулирования выводов количестве материала (319 образцов костного мозга пациентов с В-ОЛЛ). В диссертации применены современные методы статистического анализа результатов.

Обоснованность и достоверность результатов представленной диссертационной работы обеспечивается правильностью выбора методик

исследования и их разнообразием. В работе присутствуют как фундаментальные выводы, так и практические, применимые в организациях здравоохранения Республики Беларусь для диагностики острых лимфобластных лейкозов.

Диссертационная работа Вшивковой О.С., свидетельствует о том, что соискатель умеет правильно планировать и выполнять научные исследования, глубоко анализировать полученные результаты, а также литературные сведения, формулировать обоснованные выводы и заключения.

Уровень апробации результатов диссертационного исследования высокий – результаты доложены на ведущих международных конгрессах дальнего зарубежья и Российской Федерации. Соискатель является автором и соавтором 21 публикации, из них 5 статей, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований по отрасли наук.

Таким образом, диссертационная работа Вшивковой О.С. является законченным, самостоятельно выполненным научным трудом с достаточным уровнем апробации, основные положения которого опубликованы в открытой печати, а результаты внедрены в лабораторную практику, что свидетельствует о высокой научной квалификации соискателя, которая соответствует искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови.

Конкретные рекомендации по практическому использованию результатов диссертационного исследования

Практическое использование результатов диссертационной работы Вшивковой О.С. подтверждается инструкцией по применению «Метод определения внутригенных делеций в гене IKZF1 при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых» (№ 068-0519), утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 17.05.2019 г.

Представленные в диссертации результаты внедрены в работу государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

Экономическая и социальная значимость результатов диссертации заключается в улучшении качества оказания медицинской помощи в Республике Беларусь пациентам с В-ОЛЛ.

Таким образом, анализ представленной работы позволяет сделать положительное заключение о научной, практической и экономической значимости результатов диссертационного исследования, внедрение которых будет способствовать решению важной научной проблемы – повышению

эффективности диагностики пациентов с В-ОЛЛ путем применения современных, высокоэффективных методов выявления aberrаций гена транскрипционного фактора IKZF1, с целью прогнозирования риска и предупреждения рецидивов у пациентов с данным заболеванием.

Вопросы и замечания по диссертационной работе

В процессе анализа диссертации Вшивковой О.С. существенных замечаний, влияющих на научно-практическую значимость работы и ее общую положительную оценку, не возникло. При чтении диссертации возник ряд вопросов:

1) В диссертационной работе имеются стилистические неточности. Так, например, для описания одного и того же понятия используются термины «фактор» и «маркер», которые не всегда равнозначны.

2) В Положении 1, выносимом на защиту, приводится характеристика разработанного метода ОТ-ПЦР, для которого указаны точные показатели диагностической чувствительности и специфичности, приведен коэффициент вариации в процентах. Далее автор утверждает, что метод экономически эффективен. При этом показатель экономической эффективности не приведен. Что диссертант понимает под экономической эффективностью и может ли эта эффективность быть выражена численно? Если да, то логично было бы привести данные по экономической эффективности в соответствующем Положении.

3) В тексте диссертации встречается фраза «скорость репарации», тогда как процессы репарации не оценивались в динамике, проводилась оценка лишь уровня экспрессии основных генов, ответственных за репарацию двойных разрывов. Более корректным в тексте диссертации и в докладе было бы использовать термин «процесс (-ы) репарации».

4) Aberrации IKZF1 являются значимым фактором прогнозирования первого рецидива, но не являются таковым при втором и последующих рецидивах. Как автор может это объяснить?

5) Может ли соискатель объяснить почему aberrации IKZF1 являются независимым маркером прогнозирования рецидива только в группе пациентов стандартного риска в отличие от групп промежуточного и высокого. С чем это может быть связано для конкретной группы риска?

Указанные вопросы касаются лишь отдельных аспектов работы и не влияют на общую высокую оценку диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Вшивковой Ольги Сергеевны «Aberrации гена транскрипционного фактора IKZF1 при В-линейных острых лимфобластных лейкозах», представленная на соискание ученой степени кандидата

биологических наук, соответствует специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови.

Диссертационная работа является самостоятельно выполненной научно-исследовательской работой, посвященной комплексному изучению aberrаций гена транскрипционного фактора IKZF1, а именно их значения в диагностике и прогнозировании течения В-клеточных острых лимфобластных лейкозов, разработке методов диагностики клинически значимых aberrаций исследуемого гена.

Выполнению работы предшествовал глубокий анализ литературных источников с обоснованной формулировкой цели и задач исследования. Исследование проведено на высоком научном и методическом уровне с использованием современных и объективных методов: применен широкий спектр современных высокочувствительных методов цитогенетического, молекулярно-генетического анализа и генной инженерии, которые позволили получить объективные и актуальные данные. Исследование выполнено на достаточном для проведения анализа и формулирования выводов количестве материала (319 образцов костного мозга пациентов с В-ОЛЛ). В диссертации применены современные методы статистического анализа результатов.

Доказательность научных положений и выводов свидетельствует о высокой научной и профессиональной квалификации автора. Оформление диссертационной работы соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь.

Актуальность, научная новизна, научно-методический уровень и объем проведенной работы, а также практическая значимость полученных результатов соответствуют требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пункты 20 и 21 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, утвержденного Указом Президента Республики Беларусь № 560 от 17 ноября 2004 года (с дополнениями и изменениями согласно Указу Президента Республики Беларусь от 02.06.2022 г. №190).

В работе присутствуют как фундаментальные, так и практические научно обоснованные результаты, применимые для повышения эффективности первичной диагностики В-ОЛЛ в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь, оказывающих специализированную медицинскую помощь.

Таким образом, Вшивкова Ольга Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови за:

1. идентификацию и полуколичественный анализ продуктов альтернативного сплайсинга (изоформ) гена IKZF1, установление их

взаимосвязи с различными типами делеций IKZF1 и разработку методов выявления aberrаций IKZF1, значимых при прогнозировании риска развития рецидивов у пациентов с В-ОЛЛ;

2. изучение в экспериментах *in vitro* биологических особенностей системы репарации, клеточного цикла и химиочувствительности лейкозных клеточных линий с aberrантной экспрессией коротких изоформ IKZF1;

3. доказательство неблагоприятного прогностического значения aberrаций IKZF1 у пациентов с В-ОЛЛ группы стандартного риска и обоснование целесообразности выявления aberrаций на этапе первичной диагностики с целью стратификации на группы прогноза рецидива В-ОЛЛ.

Отзыв обсужден и одобрен на расширенном заседании Ученого совета ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», 24 января 2024 года, протокол № 1 в соответствии с приказом директора от 17.01.2024 № 38-од.

Вшивкова О.С. выступила с докладом, состоялась дискуссия, на все заданные соискателю вопросы были получены исчерпывающие ответы.

Отзыв принят открытым голосованием членов заседания, имеющих ученые степени.

В голосовании приняли участие 28 человек, в том числе: докторов медицинских наук – 2, кандидатов медицинских наук – 18, кандидатов биологических наук – 6, кандидат технических наук – 1, кандидат сельскохозяйственных наук – 1.

Результаты голосования: «за» – 28; «против» – нет, «воздержались» – нет.

Председатель научного собрания –
заместитель директора по научной работе
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», д.м.н., профессор

 В.М. Мицура

Эксперт –
биолог лаборатории клеточных технологий
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», к.б.н., доцент

 А.Е. Силин

Секретарь заседания –
ученый секретарь
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», к.б.н.

 Н.Н. Веялкина

Подписи Мицуры В.М., Силина А.Е., Веялкиной Н.Н. удостоверяю.

Начальник отдела кадров ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ» Мурашкина Л.В.

