

**Голові спеціалізованої вченої ради ДФ 26.155.002
в Інституті експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України
доктору біологічних наук, старшому науковому співробітнику
в.о. завідувача лабораторії проблем метастатичного мікрооточення
Ганусевич Ірині Іванівні**

ВІДГУК

**Офіційного опонента – доктора біологічних наук, старшого наукового
співробітника, завідувача науково-дослідної лабораторії
експериментальної онкології Національного інституту раку
Храновської Наталі Миколаївни
на дисертацію Поліщук Альони Станіславівни на тему: «Імуноцитохімічна
характеристика деяких форм В-клітинних неходжкінських лімфом в стадії
лейкемізації», подану до захисту на здобуття ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091-Біологія**

Актуальність обраної теми дисертації.

Неходжкінські лімфоми (НХЛ) - гетерогенна група пухлин, що виникають з різного типу клітин лімфоїдної тканини і розрізняються за рядом клінічних, цитоморфологічних, імунологічних та молекулярно-генетичних ознак. Починаючи з 1941 року, класифікація НХЛ була і залишається предметом численних дискусій. Новоутворення лімфоїдної тканини класифікували із застосуванням цілого ряду схем, серед яких найбільш широко прийнятими є: Rappaport, R.F. Dorfman, Кільська, Британська, Lukes-Collins, ВООЗ. Деякі класифікації базувалися на морфологічних особливостях та клінічних характеристиках лімфом, сучасні – на вивченні різних етапів диференціювання клітин, наголошуючи на важливості інтегрованого гістологічного, імуногістохімічного (ІГХ), а в деяких випадках і молекулярно-генетичного дослідження пухлинного субстрату. У останній редакції

класифікації пухлин кровотворної і лімфоїдної тканин ВООЗ 2017 р. наряду з морфологічними та імунофенотиповими ознаками трансформованих лімфоїдних тканин, велика увага приділяється цитогенетичним та молекулярно-генетичним характеристикам субстратних клітин.

Слід зазначити особливу складність диференційної діагностики групи морфологічно подібних периферичних В-клітинних лімфом. Складність диференційної діагностики суттєво збільшується у випадках, коли неможливо проведення біопсії лімфатичного вузла або отримання матеріалу із екстранодальних осередків ураження, при виявленні залишкової хвороби та рецидиві захворювання. Разом з тим, клінічна практика вимагає точного нозологічного діагнозу. В таких випадках актуальності набувають цитоморфологічне, цитохімічне та імунофенотипове дослідження патологічних лімфоїдних клітин периферичної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ). Залучення в пухлинний процес КМ та циркуляція патологічних клітин в ПК відбувається з різною частотою при більшості імуноморфологічних варіантах В-клітинних лімфом. В цих випадках циркулюючі патологічні клітини можуть бути використані в якості субстрату для проведення діагностичних досліджень.

Враховуючи вищезначене, можна констатувати, що дисертаційна робота Поліщук А. С. присвячена вирішенню актуальної задачі онкогематології – обґрунтуванню доцільності застосування комплексного підходу для детальної характеристики деяких форм В-клітинних НХЛ в стадії лейкемізації з метою їх диференційної діагностики.

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

Дисертаційна робота виконана у відділі онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами науково-дослідних робіт: «Цитоморфологічна та імуноцитохімічна характеристика лейкозів у післячорнобильський період» (2015 – 2017 рр.; номер державної реєстрації 0114U004390), «Вивчення ензимоцитохімічних та імуноцитологічних особливостей кровотворних клітин-попередників при різних формах гемобластозів» (2015 – 2019 рр.; номер

державної реєстрації 0115U002969), «Дослідження структури гемобластозів у післячорнобильський період в групах населення України, постраждалих внаслідок дії іонізуючої радіації» (2018 – 2020 рр.; номер державної реєстрації 0117U004978).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертантка поставила за мету визначити критерії та розробити алгоритм лабораторної діагностики деяких форм В-клітинних НХЛ в стадії лейкемізації. Об'єктом дослідження служили лімфоїдні клітини ПК та КМ (мазки та суспензії мононуклеарів) пацієнтів з В-НХЛ, а також хворих на гострі лейкози, мієлодиспластичний синдром (МДС). Предмет дослідження - морфологічні та цитохімічні ознаки пухлинних клітин, антигени поверхневих мембран лімфоїдних клітин хворих на різні форми пухлин лімфоїдної тканини.

Наукові положення та висновки дисертації є достовірними та в достатній мірі обґрунтованими. Це зумовлено використанням комплексу адекватних поставленим завданням сучасних методів дослідження, таких як морфологічний, цитохімічний та імуноцитохімічний, які дозволили всебічно охарактеризувати патологічні клітини при В-НХЛ.

Робота логічно побудована, об'єм проведених досліджень є більш, ніж достатнім для виконання поставлених задач та формулювання висновків.

Дисертантка зробила вичерпний огляд сучасних літературних даних щодо підходів до класифікації пухлин лімфоїдної тканини в історичному розрізі, охарактеризувала патогенетичні особливості та цитогенетичні аномалії при різних формах НХЛ. Широке використання дисертанткою статей в англomовних журналах дає підстави вважати, що в огляді всебічно окреслені факти, відомі для світової науки, та виявлений ряд невирішених проблем.

Кожен розділ власних досліджень присвячений комплексному дослідженню характеристик субстратних клітин при окремих формах В-НХЛ: 1- хронічному лімфолейкозі/лімфомі (ХЛЛ) з малих лімфоцитів та моноклональному В-клітинному лімфоцитозі (МВЛ); 2 – нозологічних формах

лімфопроліферативних захворювань з характерними відростками в цитоплазмі лімфоїдних клітин - лімфома маргінальної зони селезінки (ЛМЗС), волосковоклітинний лейкоз (ВКЛ), лімфома червоної пульпи селезінки (ЛЧПС), ВКЛ-В; 3 - лімфомі з клітин мантиї (ЛКМ) та бластоїдному варіанті ЛКМ; 4 - дифузній В-великоклітинній лімфомі (ДВВКЛ).

На підставі одержаних даних був розроблений комплекс діагностичних критеріїв та підходів для диференційної діагностики різних форм НХЛ. Загалом, поставлені задачі дослідження розкриті у повному обсязі. Діагностичні розробки лягли в основу практичних рекомендацій, які були широко впроваджені у практику.

Достовірність та наукова новизна одержаних результатів.

Вперше на підставі комплексного дослідження цитоморфологічних, цитохімічних та імунофенотипових характеристик пухлинних клітин ідентифіковано діагностичні критерії та підходи до лабораторної діагностики деяких форм В-клітинних неходжкінських злоякісних лімфом на стадії лейкемізації.

Доповнено дані про цитоморфологічні та імунофенотипові ознаки лімфоїдних клітин ПК та КМ при ряді В-клітинних лімфопроліферативних захворюваннях на стадії лейкемізації, зокрема, при ЛЧПС, ВКЛ, ВКЛ-В, бластоїдному варіанті БВ-ЛКМ. Характерною цитоморфологічною ознакою патологічних клітин при ЛМЗС, ВКЛ, ВКЛ-В, та ЛЧПС є наявність специфічних виростів в цитоплазмі пухлинних клітин. Доведено, що субстратні клітини при БВ-ЛКМ за цитоморфологічними характеристиками подібні до бластів, а спектр експресованих на поверхневих мембранах антигенів відповідає зрілим В-лімфоцитам.

Результати досліджень імуноцитохімічних характеристик дозволили поглиблено охарактеризувати цитохімічні та імунофенотипові особливості клітин ПК та КМ у пацієнтів з МВЛ.

На основі вивчення цитоморфологічних, цитохімічних і імунофенотипових ознак субстратних клітин при різних формах В-клітинних

лімфопроліферативних захворювань запропоновані критерії диференційної діагностики В-клітинного В-ХЛЛ, лімфоми з малих лімфоцитів (ЛМЛ) та МВЛ. На основі порівняльного аналізу цитоморфологічних, цитохімічних і імунофенотипових ознак різних типів трансформованих лімфоїдних клітин розроблені критерії диференційної діагностики ЛМЗС, ВКЛ, В-клітинної лімфоми/ лейкозу селезінки неklasифікованої: ЛЧПС, та ВКЛ-В. Вперше за допомогою вивчення цитоморфологічних, цитохімічних і імунофенотипових ознак лімфоїдних клітин розроблені критерії диференційної діагностики ЛКМ та БВ-ЛКМ в стадії лейкемізації.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

Практичне значення дисертаційної роботи Поліщук А.С. не викликає сумніву, оскільки розроблені методичні підходи до діагностики пухлин лімфоїдної тканини впроваджені у практику роботи 17 закладів охорони здоров'я, що засвідчено відповідними актами. Показано, що діагностичний комплекс, який складається з цитоморфологічних, цитохімічних та імунофенотипових досліджень, можна застосовувати з метою диференційної діагностики деяких форм В-клітинних неходжкінських злоякісних лімфом в стадії лейкемізації, застосовуючи в якості субстрата патологічні клітини КМ та ПК.

Обґрунтовано доцільність застосування комплексного підходу до дослідження характерних ознак пухлинних клітин з метою більш детальної характеристики деяких форм В-клітинних НХЛ в стадії лейкемізації.

Результати досліджень, що висвітлені в даній роботі, можуть бути використані як основа для створення лекційних матеріалів для лікарів—онкологів, гематологів, фахівців з лабораторної медицини, студентів вищих навчальних закладів медичного та біологічного спрямування.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на: І з'їзді Української асоціації цитопатологів «Актуальні питання сучасної цитологічної діагностики в Україні» (Київ, 2017 р.), XIV Міжнародній науковій

конференції студентів і молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки» (Київ, 2018 р.), X International students and young scientists seminar dedicated to the World Cancer Day (Київ, 2019 р.), науково-практичній конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 2019 р.), науково-практичній конференції «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку» (Київ, 2019 р.), науково-практичній конференції для лікарів-гематологів, онкологів і спеціалістів лабораторної медицини «Інноваційні технології лабораторної діагностики в онкогематології» (Київ, 2019 р.), науково-практичній конференції, з міжнародною участю «Ефективність, якість та доступність сучасної лабораторної медицини в Україні» (Київ, 2020 р.).

Повнота викладу результатів в опублікованих працях.

За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, зокрема 6 статей, 3 з яких у фахових наукових виданнях рекомендованих МОН України та однієї в науковому виданні держави, що входить до Європейського Союзу, 3 науково-методичні посібники, 2 патенти на корисну модель та 7 тез у збірниках наукових конференцій та з'їздів.

Оцінка змісту дисертації.

Дисертація є багатоплановим науковим дослідженням, у якому поєднані аргументованість наукових досліджень, статистичне узагальнення і аналіз одержаних результатів, з обґрунтованими висновками і рекомендаціями.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню цитоморфологічних, цитохімічних та імунофенотипових характеристик лімфоїдних клітин крові та кісткового мозку для виявлення розповсюдження патологічного процесу в організмі, проведенню диференційної діагностики та встановленню діагнозу у випадках неможливості проведення біопсії лімфатичного вузла чи отримання матеріалу із екстранодальних осередків ураження.

Дисертантка продемонструвала складність процесу диференційної діагностики та дієвість розроблених діагностичних підходів на окремих прикладах, коли за рядом причин неможливо однозначно прийти до висновку

про тип пухлини та виставити кінцевий діагноз за допомогою стандартних підходів. Особливо цінний матеріал був одержаний при дослідженні рідкісних та нових нозологічних форм В-ХЛЛ.

Дисертація має стандартну структуру та складається з анотації, вступу, розділу огляду літератури, який складається з 4 підрозділів, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів результатів досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновків, практичних рекомендацій, список використаних джерел (135 найменувань, з них кирилицею - 41, латиницею - 94 , додаток, який містить акти впровадження розробок у практичну медицину, та додаток із переліком власних публікацій здобувача за темою дисертації. Текст супроводжується 36 рисунками і 24 таблицями.

Структура дисертації повністю відповідає окресленим цілям і завданням дослідження. Аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушення автором вимог академічної доброчесності. Дисертація Поліщук А.С. містить посилання на згадані автором у тексті джерела інформації в разі використання ідей, розробок, тверджень, відомостей. Дисертантом дотримано вимоги норм законодавства про авторське право; надано повну і достовірну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методики досліджень.

Анотація не містить інформації, яка була би відсутня в дисертації. Анотація та текст дисертації оформлено відповідно до вимог діючого Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів».

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.

Загалом, позитивно оцінюючі дисертаційну роботу Поліщук А.С., варто зазначити, що наявні окремі зауваження та дискусійні питання:

1. Було би доцільно підкреслити в роботі важливість проблеми диференційної діагностики лімфом у тих випадках, коли матеріал первинної пухлини не доступний, а в якості пухлинного субстрату використовуються патологічні лімфоїдні клітини з ПК та КМ. Зокрема, навести відсоток таких випадків.

2. У розділі «Матеріали та методи» описаний метод імунофенотипування лімфоїдних клітин за допомогою методу проточної цитометрії. Разом з тим, у розділах результатів досліджень не представлені дані, одержані за допомогою цього методу.
3. У роботі є наступні висновки про наявність кореляційного зв'язку: *«Результати досліджень демонструють кореляційний зв'язок МВЛ з мієлодиспластичним синдромом (МДС), гострим мієлоїдним лейкозом (ГМЛ) та ХЛЛ»* та *«В нашій роботі ми також намагались продемонструвати кореляційний зв'язок МВЛ з МДС, ГМЛ та ХЛЛ»*. Разом з тим, результати кореляційного дослідження у дисертаційній роботі не представлені.
4. Метою роботи було визначити діагностичні критерії та розробити алгоритми диференційної діагностики В-клітинних лімфом. Отримані результати доцільніше було би узагальнити у вигляді блок-схем та представити їх у підрозділі «Практичні рекомендації».
5. Анотація дисертації перевантажена даними літератури, натомість необхідно зосередитися на результатах власних досліджень.
6. Висновки необхідно скоротити та конкретизувати.
7. У класифікації ВООЗ пухлин лімфоїдної тканини (редакція 2017 р.) виокремлені нові нозологічні форми пухлини. Наголошення дисертанткою на значимості розроблених нею критеріїв та підходів для діагностики нових та недостатньо вивчених нозологічних форм В-ХЛЛ, значно посилило би новизну та практичну значимість дисертаційної роботи.
8. Не кожен підрозділ завершується узагальненням одержаних результатів.
Натомість, такі узагальнення значно полегшили би сприйняття матеріалу дисертації.
9. Програма Excel не вважається придатною для статистичної обробки даних.
Потрібно використовувати валідовані програми для статистичної обробки.
10. Обговорення містить великий об'єм опису одержаних результатів, натомість акцент мав би бути на критичному аналізі одержаних даних у співставленні з даними літератури

11. Доцільно включити 5-ту задачу, яка дозволила фінально вирішити мету роботи – визначити критерії та розробити алгоритми діагностики В-ХЛЛ з використанням патологічних лімфоїдних клітини з ПК та КМ в якості пухлинного субстрату.

12. У дисертаційній роботі зустрічається текст, який потребує стилістично правки:

Стор. 69 - *«В пацієнтів, у яких на протязі 12 місяців спостерігали значне збільшення кількості лімфоцитів в периферичній крові, виявлена експресія CD11c. При залученні в патологічний процес багатьох органів на поверхневих мембранах субстратних клітин спостерігалась експресія антигену CD11b».*

Стор. 91 - *«При вивченні препаратів периферичної крові та кісткового мозку у пацієнтів з даною патологією ЛЧПС виникають значні труднощі в трактуванні отриманих результатів. Можливо саме тому ЛЧПС діагностується менше ніж в 1% випадків всіх лімфом. При спленектомії та подальшому гістологічному та імуногістохімічному вивченні препаратів видаленої селезінки частота захворювання збільшується до 10%».*

Стор. 53 – *«Фактично в сучасному світі на перше місце виходить необхідність міждисциплінарної співпраці, багатопараметричного тестування та оцінки адекватності зразка як вимог до оптимальних результатів».*

Стор. 53 - *«Безсумнівно, існують ситуації, коли навіть попередній діагноз можна поставити лише з великими труднощами. Такі випадки, однак, не властиві лише цитологічним зразкам, і ця морфологічна неоднозначність є частиною причини, чому допоміжне тестування (зокрема дослідження імунофенотипування та результатів цитохімічних реакцій) вважається обов'язковим при діагностиці лімфопроліферативних порушень. Важливо підкреслити, що допоміжні дослідження суттєво керуються первинною цитологічною оцінкою зразка, що також забезпечує основу для правильної інтерпретації результатів допоміжних досліджень».*

13. Висновок *«Диференційний діагноз ДВКЛ необхідно проводити із: метастазами злоякісних анонімних пухлин в кістковому мозку; лімфомою Ходжкіна; плазмоклітинною лімфомою; лімфомою Беркітта спорадичного типу; бластоїдним варіантом лімфоми з клітин мантийної зони»* неможливо зробити на основі 4 поодиноких клінічних випадках. Особливо це стосується диференційної діагностики ДВКЛ та метастазів злоякісних анонімних пухлин в кістковому мозку.

14. Не завжди зрозуміло, з якого джерела – КМ або ПК походили досліджувані патологічні клітини.

15. У якості недоліка дисертаційної роботи можна зазначити відсутність результатів досліджень КМ з підрахунком мієлограм.

16. Чи був встановлений діагноз В-ХЛЛ у хворих за допомогою стандартних підходів - з використанням матеріалу ураженого лімфатичного вузла або екстранодальних осередків ураження?

17. Чи досліджували Ви кореляцію характеристик патологічних клітин у ПК, КМ та у біопсійному матеріалі лімфатичного вузла або екстранодальних осередків ураження?

18. Як Ви підтверджували правильність поставленого діагнозу В-ХЛЛ за допомогою розроблених підходів, особливо у діагностично складних випадках?

19. Чи є доцільність комплексного дослідження характеристик субстратних клітин у КМ та ПК при гістологічно, імуногістохімічно та цитогенетично верифікованому діагнозі?

Загальний висновок та оцінка дисертації.

Дисертаційна робота Поліщук Альони Станіславівни на тему: «Імуноцитохімічна характеристика деяких форм В-клітинних неходжкінських лімфом в стадії лейкемізації» є самостійним, завершеним науковим дослідженням.

Актуальність обраної теми дослідження, обґрунтованість наукових положень та висновків і рекомендацій, їх вірогідність, достовірність та наукова новизна одержаних результатів, повнота їх викладу в опублікованих працях

свідчать про наукову самостійність автора, високий рівень виконання дослідження.

Одержані дисертанткою результати забезпечують розв'язанню актуального наукового завдання в галузі науки 091 Біологія.

Дисертаційна робота Поліщук А.С. на тему «Імуноцитохімічна характеристика деяких форм В-клітинних неходжкінських лімфом в стадії лейкемізації» відповідає спеціальності 091 – Біологія та вимогам Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. (зі змінами і доповненнями від 3 квітня 2019 р. № 283), п. 10 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167, а її автор – Поліщук Альона Станіславівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент –

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник,

завідувач науково-дослідної лабораторії

експериментальної онкології

Національного інституту раку

Н.М. Храновська

