

## ВІДГУК

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу Сипко Тетяни Сергіївни

«Особливості формування цитогенетичних ефектів у лімфоцитах онкологічних хворих за умов дистанційної променевої терапії при різних обсягах та режимах опромінення»,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

### **Актуальність обраної теми дисертації.**

Променева терапія є ефективним методом лікування онкологічної патології. Дослідження в галузі радіаційної цитогенетики, до якої належить виконана робота, дозволяють з'ясувати закономірності і механізми променевих реакцій в пухлинних та здорових тканинах, що потрапляють в зону терапевтичного опромінення при її застосуванні. Однією з основних проблем, що розроблюються в радіаційній генетиці, є залежність індукованого ефекту від дози іонізуючого випромінювання. Тому **тема дисертаційної роботи** Т.С. Сипко, що присвячена встановленню особливостей формування цитогенетичних ефектів у лімфоцитах периферичної крові онкологічних хворих за умов дистанційної променевої терапії при різних обсягах та режимах опромінення, **є актуальною** як з наукової, так і з практичної точки зору, що може сприяти вдосконаленню методів променевої терапії.

Дисертаційну роботу виконано в межах двох планових науково-дослідних робіт Національної академії медичних наук України на базі лабораторії радіаційної цитогенетики Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»: «Порівняльний аналіз динаміки цитогенетичних ефектів у онкологічних хворих під час променевої гамма-терапії  $^{60}\text{Co}$  на апараті РОКУС-АМ та мегавольтної фотонної терапії на лінійному прискорювачі» (2013–2015 рр., № держреєстрації 0113U000049) та «Визначення особливостей реалізації цитогенетичних ефектів променевої терапії у пацієнтів з різними обсягами та режимами опромінення» (2016–2018 рр., № держреєстрації 0116U001003).

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

Наукові положення, викладені в дисертаційній роботі, є науково обґрунтованими і базуються на хорошому знанні здобувачем наукової літератури з радіаційного хромосомного мутагенезу та результатах власних досліджень, отриманих автором з застосуванням класичних методів цитогенетичних досліджень. Дисертація присвячена вдосконаленню біологічного супроводу променевої терапії шляхом встановлення й порівняння цитогенетичних ефектів в лімфоцитах периферичної крові онкологічних хворих з різними локалізаціями пухлин, на різних етапах терапевтичного опромінення з низькою лінійною передачею енергії на апараті РОКУС-АМ ( $\gamma$ -випромінювання  $^{60}\text{Co}$ ) та на лінійному прискорювачі електронів Clinac 600C (фотони з енергією 6 MeV). При її виконанні автором здійснено цитогенетичне обстеження 103 онкологічних хворих у трьох варіантах досліду: перед проведенням терапевтичного опромінення, в середині та в кінці променевої терапії. Кров 30 онкологічних хворих використана при дослідженні й моделюванні локальності радіаційного впливу на цитогенетичні ефекти у лімфоцитах периферичної крові людини у експерименті *ex vivo*. Загалом при виконанні дисертаційної роботи проаналізовано 56150 метафазних пластинок. Великий обсяг виконаних досліджень і застосування адекватних методів статистичної обробки отриманих даних **свідчать про репрезентативність результатів дисертаційної роботи.**

За результатами досліджень встановлено, що за дії обох джерел опромінення в лімфоцитах периферичної крові всіх обстежених осіб спостерігали зростання частоти радіаційно-індукованих аберацій хромосом порівняно з показниками до початку променевого лікування. Сумарна частота цитогенетичних маркерів дії радіації (дицентричних та кільцевих хромосом) у онкогінекологічних хворих та хворих на рак легені в середині та в кінці курсу опромінення на апараті РОКУС-АМ перевищувала відповідний показник при опроміненні на лінійному прискорювачі електронів Clinac 600C. Вказані результати стали обґрунтованою підставою для висновку про те, що генотоксичний вплив на лімфоцити периферичної крові людини терапевтичного  $\gamma$ -опромінення  $^{60}\text{Co}$  перевищував цитогенетичний ефект, спричинений лінійним прискорювачем електронів. При виконанні досліджень встановлено залежність

цитогенетичних показників у лімфоцитах периферичної крові осіб, які отримували терапевтичне опромінення, від локалізації пухлин: частота аберацій хромосомного типу у онкогінекологічних хворих перевищувала відповідні показники у хворих на рак легені та у осіб з пухлинами голови та шиї.

Висновки дисертації обґрунтовані, вони закономірно впливають з проведених досліджень і узагальнюють отримані результати.

### **Достовірність і новизна отриманих результатів.**

Достовірність отриманих результатів забезпечена коректним підходом до формування груп спостереження, використанням сучасних, адекватних меті і завданням методів цитогенетичних досліджень та статистичного аналізу. До цитогенетичного обстеження були залучені пацієнти з онкологічною патологією, які не проходили попереднього променевого лікування. Сформовані групи були максимально подібними за віком обстежених осіб та умовами проведення променевої терапії (разова осередкова доза становила 1,8 - 2 Гр, сумарна осередкова доза – 40 - 44 Гр), але розрізнялись джерелами терапевтичного випромінювання (апарат РОКУС-АМ,  $\gamma$ -випромінювання  $^{60}\text{Co}$ ); лінійний прискорювач електронів Clinac 600C, фотонне випромінювання) та локалізацією онкологічної патології (гінекологічної, легені, голови і шиї).

При виконанні дисертаційної роботи застосовано класичне рівномірне забарвлення хромосом, що дозволило адекватно виявити нестабільні аберації хромосомного типу (в тому числі, дицентричні хромосоми, які є маркерами дії радіації і рекомендовані до використання ВООЗ і МАГАТЕ при проведенні біологічної дозиметрії променевих уражень). Важливим є застосований в роботі контроль відбору для цитогенетичного аналізу метафазних пластин, які знаходились в першому післярадіаційному мітотичному поділі, що був проведений з використанням флуоресцентного-плюс-Гімза забарвлення препаратів метафазних хромосом.

Застосовані в роботі методичні підходи забезпечили коректність і достовірність отриманих результатів та дали можливість вперше в одному дослідженні порівняти цитогенетичні ефекти у лімфоцитах периферичної крові онкологічних хворих з різними локалізаціями пухлин впродовж дистанційної

променевої  $\gamma$ -терапії  $^{60}\text{Co}$  на апараті РОКУС-АМ та фотонної терапії на лінійному прискорювачі Clinac 600C. Були отримані нові дані щодо зростання середньої частоти аберацій хромосом, аберацій хромосомного типу та зміни рівня аберацій хроматидного типу і геномних порушень зі збільшенням дози опромінення впродовж променевої терапії у хворих з онкогінекологічною патологією, раком легені, голови та шиї. Вперше встановлено більший генотоксичний вплив на лімфоцити периферичної крові онкологічних хворих  $\gamma$ -опромінення  $^{60}\text{Co}$  порівняно з цитогенетичним ефектом, спричиненим лінійним прискорювачем електронів. Вперше показано зростання частоти радіаційно-неспецифічних пошкоджень (аберацій хроматидного типу у хворих на рак легені та поліплоїдних клітин у онкогінекологічних хворих) впродовж курсу променевої терапії.

Вперше розроблено спосіб моделювання локального опромінення соматичних клітин людини з використанням змішаної культури опромінених *ex vivo* і неопромінених лімфоцитів периферичної крові в пропорції 1:9, що може бути застосовано для подальшого вивчення локального опромінення організму людини на цитогенетичному рівні.

#### **Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.**

Отримані при виконанні дисертаційної роботи результати щодо індукції цитогенетичних ефектів у лімфоцитах периферичної крові онкологічних хворих при проходженні терапевтичного опромінення з низькою лінійною передачею енергії мають теоретичне значення для вивчення мішеневих та немішеневих цитогенетичних ефектів радіаційного впливу.

В прикладному аспекті результати роботи можуть бути використані для моніторингу цитогенетичного статусу онкологічних хворих впродовж променевого лікування. За результатами роботи отримано патент на корисну модель «Спосіб визначення надмірного опромінення у онкологічних хворих під час фракціонованої променевої терапії» (№ 107824 від 24.06.2016 р.).

Результати дослідження включено до курсу радіаційної медицини на кафедрі радіології та радіаційної медицини Харківського національного медичного університету.

**Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому.** Дисертація Т.С. Сипко побудована відповідно до вимог ДАК МОН України. Робота представлена на 180

сторінках машинописного тексту (з них 134 – основного тексту), ілюстрована 21 таблицею та 12 рисунками і має традиційну структуру: вступ; огляд літератури; опис матеріалів та методів досліджень; сім розділів результатів власних досліджень; розділ аналізу та узагальнення результатів дослідження; висновки; список використаних літературних джерел (містить 118 найменувань, з яких 33 кирилицею і 85 латиницею) та два додатки.

У вступі викладено мету та п'ять завдань досліджень; охарактеризовано наукову новизну та практичне значення результатів роботи; вказано на зв'язок роботи з виконанням двох науково-дослідних робіт (з 2013 по 2018 роки), в одній з яких автор була відповідальним виконавцем; визначено об'єкт та предмет дослідження; висвітлено особистий внесок здобувача в науковому дослідженні; перераховано наукові форуми (вісім в Україні, шість міжнародних), де доповідались та обговорювались результати дисертації.

В першому розділі «Огляді літератури» викладено підходи і методи цитогенетичних досліджень, що застосовуються для реєстрації радіаційного впливу на непухлинні клітини при променевій терапії, наведено їх основні результати, які супроводжуються аналізом та критичною оцінкою автора; викладено дані щодо вивчення впливу опромінення від джерел з різною лінійною передачею енергії на нормальні клітини; акцентовано увагу на методологічних особливостях проведення цитогенетичних досліджень при променевій терапії та визначено наукові проблеми, що потребують подальшого вирішення. Розділ дисертації свідчить про **достатньо повне використання в роботі** та хороше знання автором **наукової літератури** щодо **сучасного рівня** досліджень в галузі радіаційної цитогенетики, що було впроваджено при виконанні дисертаційної роботи з вивчення особливостей формування цитогенетичних ефектів у лімфоцитах онкологічних хворих за умов дистанційної променевої терапії.

У другому розділі «Матеріали та методи дослідження» викладено підходи до формування й характеристика груп осіб, які були обстежені при її виконанні, наведено характеристику джерел випромінювання, що використовувались для променевої терапії онкологічних хворих, та методику опромінення крові в умовах *ex vivo*. Описано використані автором методи цитогенетичних досліджень, що є

класичними. Наведено обсяг виконаних досліджень та статистичні методи обробки отриманих результатів. Представлена інформація вказує на те, що **робота проведена на хорошому методичному рівні**, а дисертант володіє сучасними методами цитогенетичного та статистичного аналізу, які було застосовано при її виконанні.

У розділах 3 – 9 дисертаційної роботи наведено результати власних досліджень. Викладення методично правильно починається з вивчення цитогенетичних ефектів у лімфоцитах крові обстежених осіб перед початком променевої терапії, що встановило у них підвищений рівень аберацій хромосом і пошкоджень хромосомного типу порівняно з показниками контролю.

При виконанні дисертаційної роботи автором порівняно цитогенетичні ефекти у онкологічних хворих з різними локалізаціями пухлин за дистанційної променевої  $\gamma$ -терапії  $^{60}\text{Co}$  на апараті РОКУС-АМ та фотонної терапії на лінійному прискорювачі Clinac 600C. Дослідження рівня радіаційно-індукованих цитогенетичних пошкоджень у лімфоцитах крові онкологічних впродовж гамма-терапії  $^{60}\text{Co}$  на апараті РОКУС-АМ показало вищий рівень дицентриків і кілець із супутніми парними фрагментами у групі онкогінекологічних хворих порівняно з групою хворих на рак легенів в середині курсу і після завершення променевої терапії.

Застосування терапії з використанням лінійного прискорювача електронів Clinac 600C для лікування онкологічних хворих також індукувало більш високий рівень цитогенетичних пошкоджень у лімфоцитах крові онкогінекологічних хворих порівняно з хворими на рак легенів і пацієнтами з пухлинами голови та шиї. При обох видах променевої терапії встановлено збільшення частоти пошкоджень на одну аберантну клітину у осіб з онкогінекологічною патологією.

Визначено рівні цитогенетичних пошкоджень хромосомного типу в лімфоцитах крові онкологічних хворих при променевій терапії залежно від локалізації пухлин та встановлено зростання рівнів цитогенетичних пошкоджень зі збільшенням площі, що зазнала опромінення.

Показано, що рівень аберацій хроматидного типу у онкогінекологічних хворих та пацієнтів з пухлинами голови і шиї не зазнавав статистично значущих змін протягом променевої терапії в той час, як у хворих на рак легенів зареєстровано підвищення частоти аберацій хроматидного типу впродовж променевого лікування.

Зміна частоти геномних порушень у досліджуваних групах мала флуктуаційний характер, за винятком рівня поліплодних клітин, що зростав у онкогінекологічних хворих протягом всього курсу опромінення.

В експерименті з опроміненням лімфоцитів крові осіб з онкологічною патологією *ex vivo* в дозі 2 Гр показано, що зростання рівня аберацій хромосом не залежало від локалізації пухлин. Зареєстровано статистично значуще підвищення рівня дицентричних хромосом в лімфоцитах, що були опромінені на лінійному прискорювачі електронів Clinac 600C, порівняно з гамма-терапією  $^{60}\text{Co}$  на апараті РОКУС-АМ. Моделювання локального опромінення людини виконано з використанням змішаної культури опромінених *ex vivo* і неопромінених лімфоцитів периферичної крові в пропорції 1:9 та показана здатність цієї моделі виявляти факт опромінення та його локальність.

Розділ 10 дисертаційної роботи «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» присвячено аналізу, узагальненню отриманих результатів щодо формування цитогенетичних ефектів у лімфоцитах онкологічних хворих за умов дистанційної променевої терапії при різних обсягах та режимах опромінення та їх обговоренню порівняно з даними досліджень інших авторів.

Кожен розділ дисертації завершується висновками, що узагальнюють отримані результати. Після висновків зазначено наукові праці дисертанта, де опубліковані відповідні результати. Всі опубліковані праці представлено у списку використаних джерел.

Робота завершується обґрунтованими висновками, що відповідають меті та завданням дисертаційної роботи.

**Автореферат відповідає змісту дисертації. Отримані в дисертаційній роботі результати повністю опубліковані** в семи наукових статтях (з них – чотири у фахових наукових виданнях, внесених до переліку МОН України; одна – в науковому виданні України, що входить до наукометричної бази Scopus; дві – в інших фахових виданнях); 22-х тезах доповідей, одному нововведенні, одному інформаційному листі та одному патенті на корисну модель. Перелік опублікованих дисертантом наукових праць наведено у Додатку А дисертаційної роботи.

Принципових зауважень до дисертаційної роботи немає, хоча **при її рецензуванні виникли деякі зауваження та побажання.**

1. Інформацію щодо кількості проаналізованих у кожному досліді, варіанті/точці дослідження клітин варто було б представити у розділі «Матеріали і методи досліджень», а не лише в таблицях результатів досліджень розділів 3-9, що сприяло б формуванню кращого уявлення про дизайн дослідження та об'єм виконаної роботи на всіх етапах цитогенетичних досліджень.

2. Щодо дизайну досліджень, то, на мою думку, кращому сприйняттю і розумінню динаміки зміни отриманих в дисертаційній роботі результатів сприяло б порівняння частоти цитогенетичних показників у обстежених осіб до променевої терапії, на її початковому етапі, в середині та в кінці курсу терапевтичного опромінення. В дисертації ж представлення результатів початкового етапу променевого лікування винесено з цього ряду на користь порівняння цитогенетичного ефекту від застосованих в роботі джерел іонізуючого випромінювання.

3. Результати досліджень представлені лише середньогруповими частотами аберацій хромосом, індукованими в лімфоцитах периферичної крові людини впродовж променевої терапії, проте відсутні дані щодо цитогенетичних показників у окремих осіб, що, на мою думку, збіднює дисертаційну роботу і не дозволяє оцінити індивідуальну радіочутливість обстежених осіб.

4. Вважаю некоректним вільне використання в роботі фізичного терміну «швидкість» (для прикладу: «швидкість зростання середньої частоти Диц» (стор. 78) «швидкість накопичення хромосомних аберацій..» (стор. 88), «швидкість приросту рівня Диц ...» (стор. 150) при описі і порівнянні частоти цитогенетичних показників у обстежених осіб на етапах променевої терапії, адже швидкість відповідає відношенню переміщення (у нашому випадку зміни показника) до проміжку часу, за який ця зміна відбулась, що не брахувалось при виконанні дисертаційної роботи.

5. Робота містить такі незначні недоліки як стилістично невдало сформульовані речення, русизми, орфографічні помилки.

**При рецензуванні дисертаційної роботи виникли такі запитання.**

1. Чи брали до уваги при формуванні груп для цитогенетичного обстеження інформація про:



- стадію розповсюдження онкологічної патології?
- площу/об'єм частини тіла, що були опромінені при проходженні курсу променевої терапії, адже локалізація пухлини може не корелювати з цим показником?

2. Чим, на думку автора, спричинений вищий рівень аберацій хромосом у осіб з онкологічною патологією до проведення променевої терапії, порівняно з лабораторним контролем?

3. Як можна пояснити різноспрямовані результати, отримані в дослідженні *in vivo* (більший генотоксичний вплив терапевтичного гамма опромінення на лімфоцити периферичної крові людини, порівняно з мегавольтним опроміненням) та в експерименті *ex vivo* – (протилежні дані)? Яке джерело терапевтичного випромінювання спричиняє більший пошкоджуючий вплив на лімфоцити периферичної крові людини?

4. Як відомо, в неопромінених клітинах організму, що зазнав локального опромінення, відбувається розвиток радіаційно-індукованого ефекту свідка, що в майбутньому може спричинити вторинну онкологічну патологію. З цього приводу цікавими є результати щодо відсутності зростання частоти аберацій хроматидного типу у осіб з онкогінекологічною патологією і пухлинами голови та шиї впродовж променевої терапії порівняно з даними, отриманим при обстеженні хворих на рак легені, у яких частота таких аберацій збільшилась. Чи маєте Ви пояснення такої відмінності?

5. Як саме отримані у дисертаційній роботі результати можна використати для вдосконалення біологічного супроводу променевої терапії онкологічних хворих?

Усі зазначені недоліки та питання, які виникли в процесі рецензування, не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення.

### **Висновок**

Дисертація Сипко Тетяни Сергіївни «Особливості формування цитогенетичних ефектів у лімфоцитах онкологічних хворих за умов дистанційної променевої терапії при різних обсягах та режимах опромінення» є закінченою науково-дослідною роботою, в якій отримані нові науково обґрунтовані

експериментальні результати щодо цитогенетичних ефектів терапевтичного опромінення у лімфоцитах периферичної крові онкологічних хворих, що є суттєвими для розвитку радіаційної цитогенетики. За актуальністю, новизною отриманих результатів, науковою і практичною значущістю, обсягом виконаних досліджень, дисертація відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. зі змінами, внесеними Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 р., № 1159 від 30 грудня 2015 р., № 567 від 27 липня 2016 р., № 943 від 20 листопада 2019 р., № 607 від 15 липня 2020 р., які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор Сипко Тетяна Сергіївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Завідувачка лабораторії цитогенетики  
Інституту експериментальної радіології  
Державної установи «Національний науковий  
центр радіаційної медицини Національної  
академії медичних наук України»,  
доктор медичних наук,  
старший науковий співробітник

 – О. В. Шеметун

