

РЕЦЕНЗІЯ
офіційного рецензента
на дисертаційну роботу
МУШІЯ ОЛЕКСАНДРА МИХАЙЛОВИЧА
на тему

**«ІНТЕГРАТИВНИЙ АНАЛІЗ АРХІТЕКТОНІКИ КОЛАГЕНОВОЇ
СТРОМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ЇЇ
РЕМОДЕЛЮВАННЯ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ»,
представлену до захисту на здобуття ступеня доктора філософії з
галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія»**

Актуальність теми

Необхідність виконання цієї роботи зумовлена тим, що стромальний компонент раку молочної залози тривалий час залишався менш формалізованою частиною патоморфологічної характеристики пухлини. Колагенові волокна зазнають структурної перебудови під впливом протеолітичних ферментів, їхніх інгібіторів і лізилоксидази, однак діагностична цінність конкретних геометричних параметрів колагену досі потребує системного вивчення.

У дисертації поставлено актуальне завдання — встановити, які морфометричні та молекулярні ознаки ремоделювання колагенового матриксу асоційовані з агресивністю пухлинного процесу. Використання стандартизованого цифрового аналізу, зіставлення із клініко-патологічними показниками та побудова регресійних моделей посилюють прикладний потенціал дослідження. Отже, тема відповідає сучасним запитам експериментальної онкології, морфологічної діагностики та біомедичної інформатики.

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

Роботу виконано відповідно до тематичного плану Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Дисертаційні дослідження входили до НДР № 0121U110569 (2021–2022) з верифікації патоморфологічних ознак для оптимізації діагностики раку молочної залози; № 0122U201203 (2022–2023) з розроблення та валідації технології комплексного лікування пацієнток молодого віку; № 0123U102991 (2023–2024), присвяченої експресії та метилуванню генів ремоделювання стромального мікрооточення. Наведені відомості підтверджують інституційну й тематичну відповідність дисертації.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів

Дисертація містить нове концептуальне узагальнення: агресивність раку молочної залози відображається не одним ізольованим стромальним маркером, а взаємопов'язаною системою просторових і молекулярних ознак. Автором розроблено алгоритм, що перетворює гістологічне зображення колагену на набір об'єктивних числових параметрів, придатних для статистичного моделювання.

Встановлено, що звуження і вкорочення волокон у поєднанні зі зростанням їх щільності та стромально-паренхіматозного співвідношення характеризує більш поширений і метастатичний процес. Уперше для дослідженої вибірки визначено предикторну роль ширини, довжини та щільності волокон і TSR, а морфометричний профіль зіставлено з MMP1, MMP8, TIMP3, LOX та окремими мікроРНК. Одержані результати поглиблюють уявлення про функціональну неоднорідність строми раку молочної залози.

Практичне значення одержаних результатів

Практичне значення дисертації полягає не лише у визначенні окремих маркерів, а у створенні сумісного набору морфометричних ознак, придатних для машинного опрацювання. Оскільки параметри волокон є числовими, їх

можна інтегрувати з клініко-патологічними даними та використати для побудови прогнозних моделей.

Запропонована методика може слугувати прототипом додаткового інструмента цифрової патології. Вона дозволяє стандартизовано оцінювати колагенову складову і виділяти зразки з ознаками більш агресивного перебігу. Водночас автор коректно розглядає ці результати як основу для наступного етапу — зовнішньої валідації, визначення порогових значень та оцінки клінічної ефективності перед широким упровадженням.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій

Доказова база роботи побудована за принципом методичної тріангуляції: архітекtonіку колагену оцінено морфологічно та цифрово, активність ремоделювання — імуногістохімічно, а регуляторний рівень — методом RT-qPCR і біоінформатичними підходами. Це дозволяє перевіряти однакові біологічні припущення різними типами даних.

Репрезентативність забезпечують клінічно охарактеризовані когорти, група доброякісних пухлин і додаткова вибірка з метастатичними подіями. Використані методи контролю якості та адекватний статистичний інструментарій, включно з множинною регресією, відповідають меті дослідження. Окремі запропоновані критерії потребують зовнішньої валідації, що є природним наступним етапом і не зменшує достовірності встановлених у дисертації закономірностей.

Вірогідність положень роботи додатково підтримується тим, що автор перевіряв незалежний внесок морфометричних ознак у регресійних моделях, а не обмежився парними зіставленнями. Разом з тим дисертація коректно окреслює межі екстраполяції результатів, пов'язані з ретроспективним характером матеріалу та необхідністю незалежного підтвердження прогностичних порогів.

Особистий внесок здобувача

Авторська частка О. М. Мушія чітко простежується від формування дослідницького питання до представлення результатів. Здобувач опрацював фахову літературу, виконав добір і структурування клінічного матеріалу, стандартизував цифрове опрацювання гістологічних зображень та провів масив морфометричних вимірювань. Ним самостійно здійснено статистичний аналіз і підготовлено узагальнення щодо зв'язку колагенового матриксу з агресивністю пухлини.

У роботах, опублікованих у співавторстві, здобувач брав безпосередню участь у формуванні ідеї, аналізі результатів, підготовці рисунків і таблиць та написанні рукописів. Клінічне забезпечення і спеціалізовані лабораторні етапи виконувалися у співпраці з відповідними фахівцями. Запозичень результатів співавторів без належного визначення внеску в дисертації не заявлено.

Повнота опублікування результатів дисертації та внесок здобувача у публікації зі співавторами

Кількісні та змістові показники публікацій підтверджують належне оприлюднення дисертаційних результатів. Дев'ять статей репрезентують завершені етапи дослідження, а вісім конференційних публікацій засвідчують їх фахову апробацію. Шість статей індексуються в Scopus та/або Web of Science, три надруковано у наукових фахових виданнях України. Методичні рекомендації підтверджують цінність практичної складової, висвітленої у результатах дисертації.

Особливий внесок здобувача у колективні праці полягає у розробленні цифрового алгоритму, проведенні основного масиву морфометричних вимірювань, статистичному аналізі та синтезі морфологічних і молекулярних даних. Автором підготовлено графічні матеріали, сформульовано інтерпретаційні положення й брав участь у написанні рукописів та відповідях на зауваження. Оприлюднені роботи достатньо повно відображають зміст дисертації.

Аналіз структури роботи та загальна оцінка дисертації

Структура дисертаційної роботи підпорядкована логіці комплексного дослідження колагенового компонента пухлинного мікрооточення при раку молочної залози. Спочатку автором визначено теоретичні передумови роботи, далі сформовано відповідну методичну базу, після чого послідовно досліджено морфометричні, молекулярні та епігенетичні характеристики колагенової стромы. Завершальним етапом стало інтегрування отриманих результатів і побудова прогностичних моделей. Така послідовність забезпечує змістову єдність усіх структурних частин дисертації.

Робота включає анотації, перелік умовних позначень, вступ, шість розділів, висновки, список використаних джерел і два додатки. Текст дисертації містить достатню кількість таблиць і рисунків, за допомогою яких систематизовано результати цифрової морфометрії, молекулярно-біологічних досліджень, біоінформатичного аналізу та статистичного моделювання.

У *вступній частині* здобувач розглядає ремоделювання колагенової стромы як одну з важливих складових прогресування раку молочної залози. Актуальність теми обґрунтовано з позицій сучасних уявлень про пухлинне мікрооточення, у якому позаклітинний матрикс безпосередньо впливає на інвазію, метастазування та формування терапевтичної резистентності. Мета і завдання роботи сформульовані чітко та логічно узгоджуються з її подальшою структурою. Належним чином представлено наукову новизну, практичну цінність, особистий внесок здобувача й апробацію одержаних результатів.

Перший розділ формує теоретичну основу проведеного дослідження. У ньому узагальнено відомості щодо ролі пухлинної стромы у розвитку злоякісних новоутворень, функцій білків ремоделювання позаклітинного матриксу та значення колагенового каркаса у визначенні біологічної поведінки пухлини. Окремий аналітичний блок присвячено генетичній та епігенетичній регуляції формування архітекτονіки колагенової стромы. Представлений

матеріал засвідчує ґрунтовне опрацювання здобувачем сучасної літератури та дозволяє чітко простежити передумови для проведення власного дослідження.

Другий розділ містить характеристику клінічного матеріалу та детальний опис методичного забезпечення роботи. Дослідження виконано із залученням матеріалу 120 хворих на рак молочної залози та 30 пацієнток із фіброаденомою. Застосовано гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, біоінформатичні й статистичні методи. Вагоме місце посідає цифрове оцінювання просторової організації колагену, у межах якого проаналізовано близько 1,4 млн волокон. Поєднання класичних морфологічних методів із сучасними засобами комп'ютерної обробки зображень та RT-qPCR дозволило одержати різноплановий і взаємодоповнювальний фактичний матеріал.

Третій розділ присвячено визначенню морфометричних ознак дезорганізації колагенової стромы. Автором запропоновано алгоритм аналізу просторової організації колагенової матриці та підтверджено його інформативність під час дослідження тканини раку молочної залози. Встановлено, що прогресування пухлинного процесу супроводжується закономірними змінами геометричних і просторових характеристик колагенових волокон. Зі збільшенням розміру пухлини відзначалося зменшення їхньої довжини та ширини на тлі зростання щільності стромального компонента. Окремо визначено морфометричні особливості пухлин із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів і віддаленими метастазами.

Зміст *четвертого* розділу спрямований на встановлення молекулярних чинників, здатних зумовлювати виявлену реорганізацію колагенової матриці. Дослідженню у власному клінічному матеріалі передувало біоінформатичний аналіз діагностичного та прогностичного значення фібрилярних колагенів і білків ремоделювання стромы. Надалі встановлено особливості експресії COL1A1, COL3A1, MMP-1, MMP-8, TIMP-3 та LOX залежно від клініко-патологічних характеристик раку молочної залози. Одержані дані демонструють, що просторова перебудова колагенових волокон формується

внаслідок порушення узгодженості між процесами їх синтезу, деградації, інгібування протеолізу та ферментативного зшивання.

П'ятий розділ розширює дослідження до рівня епігенетичної регуляції пухлинної стромы. На основі аналізу декількох незалежних транскриптомних наборів даних визначено потенційні мікроРНК-регулятори генів позаклітинного матриксу. Встановлено, що їхні гени-мішені пов'язані з організацією колагенового матриксу, фокальною адгезією, міжклітинними контактами та ключовими сигнальними шляхами пухлинного прогресування. Експериментальна перевірка дозволила встановити клінічні асоціації miR-26b-5p, miR-100-5p та miR-142-3p, що свідчить про перспективність цих мікроРНК як складових комплексної оцінки біологічних властивостей пухлини.

У **шостому** розділі результати попередніх етапів зіставлено між собою та розглянуто в контексті сучасних уявлень про біологію пухлинної стромы. Автором продемонстровано взаємозв'язок між молекулярним профілем ремоделювання та морфометричними характеристиками колагенових волокон. Узагальнення цих даних стало основою для створення інтегрованої моделі, у якій менш агресивний перебіг захворювання характеризується збереженням довгих і ширших колагенових волокон та збалансованою експресією білків ремоделювання, тоді як агресивні пухлини відзначаються потоншенням, укороченням і ущільненням волокон, підвищенням MMP-1, MMP-8 і LOX та зниженням TIMP-3.

Завершальним результатом дослідження є побудова математичних моделей для оцінювання клінічно значущих характеристик пухлинного процесу. Інтеграція морфометричних і молекулярних параметрів створює підґрунтя для подальшого розроблення системи прогнозування метастатичного потенціалу раку молочної залози. Запропонований підхід має перспективу практичного використання після валідації в незалежних клінічних вибірках.

Висновки сформульовано відповідно до завдань дисертації та підтверджено результатами власних досліджень. Загалом робота справляє враження цілісного та методично завершеного дослідження, у якому

морфологічний, молекулярний і математичний рівні аналізу об'єднано для розкриття закономірностей ремоделювання колагенової стромы при раку молочної залози.

Відсутність або наявність порушень академічної доброчесності

У процесі рецензування проведено оцінку дотримання принципів академічної доброчесності та проаналізовано офіційний звіт. Матеріали перевірки дають підстави констатувати відсутність академічного плагіату. Відомостей, що свідчили б про фабрикацію, фальсифікацію чи неправомірне використання результатів співавторів, не встановлено.

Зауваження:

- У методичному розділі доцільно було б навести більш деталізовану схему критеріїв відбору ділянок пухлини для цифрової морфометрії, зокрема щодо виключення зон некрозу, крововиливів та артефактів.
- На окремих рисунках із результатами цифрової сегментації бажано було б збільшити масштаб графічних накладень, що полегшило б візуальне оцінювання правильності розпізнавання колагенових волокон.

Питання:

- 1) Як ви контролювали правильність автоматичної сегментації колагенових волокон програмами CurveAlign і CT-FIRE?
- 2) Як можна пояснити зменшення довжини та ширини колагенових волокон у пухлинах із метастазами?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які передбачені для здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD)

Дисертаційне дослідження Мушія Олександра Михайловича «Інтегративний аналіз архітекtonіки колагенової стромы та молекулярно-біологічних маркерів її ремоделювання при раку молочної залози»,

представлене на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія», є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами і сприяють вирішенню важливої наукової задачі медицини – встановити, які морфометричні та молекулярні ознаки ремоделювання колагенового матриксу асоційовані з агресивністю пухлинного процесу.

За методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробації на наукових конференціях дисертаційне дослідження відповідає наказу МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» від 12 січня 2017 р. №40 та положенню Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (зі змінами, внесеними згідно із постановою Кабінету Міністрів України №341 від 21.03.2022р. та постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023р.), а його автор заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний рецензент:

с.н.с. відділу цитоморфології та
молекулярно-біологічних маркерів
пухлинного росту
Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
кандидат біологічних наук

Сергій ГОГОЛЬ