

ВІДГУК

офіційного рецензента, кандидата біологічних наук, старшого дослідника
старшого наукового співробітника відділу функціональної онкогеноміки та прогресії
раку

Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

Завелевича Михайла Петровича

на дисертаційну роботу

Мушія Олександра Михайловича

«ІНТЕГРАТИВНИЙ АНАЛІЗ АРХІТЕКТОНІКИ КОЛАГЕНОВОЇ СТРОМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ЇЇ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ»

подану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія»

Актуальність роботи

Актуальність теми дисертації не викликає сумнівів, оскільки питання, які піднімаються дисертантом, перебувають на передовій досліджень у сучасній біології та теоретичній медицині. Останнім часом ми стали свідками відродження інтересу дослідників до ролі сполучної тканини в нормі та патології, а також зміни поглядів щодо ролі строми: від пасивного механічного елемента до активного компонента пухлини, що навіть певною мірою регулює властивості пухлинних клітин. Тому вивчення процесів, що відбуваються в позаклітинному матриксі, який є активним середовищем, що опосередковує реципрокні взаємодії між стромою та власне пухлинними клітинами, має не тільки теоретичне значення в плані вивчення механізмів такої взаємодії, а й практичне — для створення таргетних препаратів, які впливають не безпосередньо на пухлинні клітини, а на клітини строми та процеси взаємодії між стромою і паренхімою, що опосередковуються через позаклітинний матрикс. Вивченню структури одного з компонентів позаклітинного матриксу та молекулярних механізмів ремоделювання пухлинного мікрооточення і присвячено роботу, яка подається до захисту. Тому робота безсумнівно має як теоретичне, так і практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертація виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами: «Верифікація ключових патоморфологічних ознак пухлинного росту як інноваційних елементів штучного інтелекту в оптимізації технології діагностики раку молочної залози» (2021-2022, номер держреєстрації 0121U110569), «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022-2023, номер держреєстрації 0122U201203), «Особливості експресії та статус метилування генів ремоделювання стромального мікрооточення у тканині раку молочної залози» (2023-2024,

номер держреєстрації 0123U102991). Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії, одним з важливих напрямів досліджень якого є вивчення стромального компонента мікрооточення зляжисних новоутворень, зокрема його просторової цитоархітекτονіки.

Наукова обґрунтованість основних положень і висновків, сформульованих у дисертаційній роботі та їх достовірність

Достовірність і наукова обґрунтованість положень, викладених у дисертації, забезпечуються вибором моделей, відповідних поставленим завданням, ретельним плануванням досліджень, застосуванням широкого спектра методів, адекватних поставлених меті й завданням роботи, а також використанням відповідних методів статистичного аналізу отриманих даних. Формулювання мети та постановка задач є чіткими, і поставлені завдання виконані в повному обсязі. Висновки роботи відповідають меті та завданням дослідження, базуються на ретельному аналізі та узагальненні власних результатів і становлять обґрунтоване та логічне завершення проведеного дослідження. Отримані результати проілюстровано якісно виконаними графіками та мікрофотографіями. Зазначу, що робота вражає обсягом досліджених матеріалів і сучасним методичним рівнем. Значні обсяги вибірок досліджуваних матеріалів дозволили отримати результати з високим ступенем статистичної достовірності.

Таким чином, дисертаційна робота Мушія О.М. виконана відповідно до принципів належної наукової методології, а представлені на захист результати є обґрунтованими та відповідають вимогам, встановленим нормативними документами для присудження наукового ступеня доктора філософії.

Новизна представлених результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях

– Вперше розроблено та валідовано автоматизований алгоритм верифікації структурних параметрів колагенового матриксу зляжисних пухлин молочної залози, що базується на комплексному гістохімічному визначенні та цифровому аналізі.

– За допомогою зазначеного алгоритму визначено профілі просторової організації колагенового матриксу, характерні для зляжисних пухлин молочної залози на різних стадіях пухлинного процесу. Виявлені закономірності змін цих параметрів залежно від клініко-патологічних та молекулярно-біологічних характеристик пухлин дозволяють певним чином реконструювати ці зміни в процесі прогресії пухлинного росту.

– Ідентифіковано профіль експресії білків ремоделювання стромального мікрооточення та встановлено його зв'язок із просторовою організацією колагенової матриці.

Результати досліджень повністю відображені у 18 наукових працях, зокрема, 9 статтях, серед яких 3 статті у журналі, що належить до фахових видань із переліку,

затвердженого МОН України, 6 публікацій у виданнях, що індексуються наукометричними базами Scopus чи Web of Science, 8 тез конференцій та 1 методична рекомендація. Дві зі статей опубліковані в журналах, віднесених до категорії Q2. Опубліковані праці відповідають вимогам п.8 Порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44.

Практичне значення результатів дисертаційної роботи

Автоматизований алгоритм визначення комплексу структурних параметрів колагенового матриксу злоякісних пухлин молочної залози є перспективним для практичного застосування як додатковий об'єктивний інструмент цифрової патології з діагностичними та прогностичними цілями. Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі, вже почали впроваджуватися в мережі онкологічних закладів, про що свідчать акти впровадження, наведені в додатку до дисертації, а також випуск методичних рекомендацій. Матеріали дослідження, викладені у дисертації та публікаціях за темою дисертації, а також створені регресійні моделі можуть скласти підґрунтя для подальшої розробки автоматизованих систем підтримки прийняття клінічних рішень із застосуванням штучного інтелекту.

Пріоритетні дані щодо експресії білків ремоделювання позаклітинного матриксу в залежності від особливостей статусу пухлин та перебігу пухлинного процесу є важливими для формування масивів даних для можливої подальшої розробки засобів, які впливають не на пухлинні клітини безпосередньо, а на клітини стромы та процеси взаємодії між стромою і паренхімою, які опосередковуються через позаклітинний матрикс

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертацію викладено на 201 сторінці; вона складається з анотації, списку робіт здобувача за темою, вступу, 6 розділів (зокрема огляду літератури, матеріалів і методів, 3 розділів власних досліджень та узагальнення і аналізу отриманих результатів), висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 136 найменувань, а також 2 додатків. Робота ілюстрована 16 таблицями та 61 рисунком.

Власне експериментальні дослідження складаються з двох великих взаємопов'язаних фрагментів, кожен з яких відображений відповідно у викладенні огляду літератури, розділі «Матеріали і методи» та, власне, у результатах і їх обговоренні. По-перше, це кількісні характеристики колагенової матриці зі створенням автоматизованого алгоритму інтегрованої оцінки цих параметрів. А по-друге, це вивчення низки параметрів структурно-молекулярного профілю пухлинного мікрооточення з акцентом на особливості функціонування генів, залучених до ремоделювання стромального мікрооточення. Останнє свідчить про функціональний стан мікрооточення та його зміни під час прогресування пухлинного процесу. При цьому детально досліджені зміни всіх цих параметрів залежно від клініко-патологічних характеристик пухлин.

У меті дослідження йдеться лише про характеристики колагенового матриксу з наголосом саме на колаген, хоча її можна було б і розширити, зважаючи на реальний обсяг досліджень щодо ремоделювання пухлинного мікрооточення, що й відображено у сформульованих завданнях дослідження.

В огляді літератури у стислому вигляді подано опис основних положень сучасної концепції динамічної взаємодії стромі і паренхіми в пухлинах (думаю, що це стосується не лише раку молочної залози), проаналізовано зміни в поглядах на строму пухлини та висвітлено сучасні аспекти цієї проблеми. Може, тільки спочатку варто було б дати узагальнювальне визначення ремоделювання позаклітинного матриксу та стромального ремоделювання.

Розглянуто основні білки ремоделювання колагенового матриксу, експресія яких також була предметом дослідження в цій роботі. Також докладно подано відомості про колагени як структурний елемент мікрооточення. Розглянуто й мікроРНК, які можуть бути залучені до регуляції експресії генів, що стосуються ремоделювання позаклітинного матриксу. Таким чином, у огляді подано інформацію щодо всіх компонентів подальшого дослідження. Літературу, що стосується предмета досліджень, проаналізовано вичерпно. Розділ свідчить про глибоке розуміння дисертантом досліджуваної проблеми

У розділі «Матеріали і методи» наведено детальні дані щодо клініко-патологічних характеристик пухлин, які слугували матеріалом для дослідження, а також дані щодо вибірки хворих. Описано всі методи дослідження, а також методи біоінформатичного аналізу. Результати досліджень викладено в трьох наступних розділах. Зазначу, що вдало обрано стиль викладення результатів, де наведено детальне пояснення алгоритму дослідження та деталізовано його етапи з поясненням, чому саме застосовано ті чи інші методи. Обраний формат дозволяє навести детальні пояснення, які безсумнівно у подальшому стануть у пригоді дослідникам. Всі обрані для розрахунків параметри колагенового матриксу пояснюються ілюстративними матеріалами.

Проведено значний обсяг досліджень щодо зв'язку між клінічними параметрами та просторовою організацією колагенового каркасу. На основі проведеного кластерного аналізу досліджувані зразки були віднесені до трьох кластерів залежно від комбінації морфометричних характеристик. Доведено наявність зв'язку між певним набором кількісних характеристик колагенових волокон і клініко-морфологічними параметрами пухлинного процесу. Що було особливо показовим – це визначення змін кількісних показників колагенового матриксу у разі метастазування до регіонарних лімфовузлів та віддаленого метастазування. Виявлені ті кількісні характеристики колагенових волокон, які достовірно відрізнялися у разі прогресування пухлинного процесу. Важливим (і таким, що наводить на роздуми) є спостереження щодо змін деяких показників, зокрема коефіцієнта прямолінійності у первинних пухлинах у разі віддаленого метастазування.

У наступному розділі розглянуто результати досліджень профілю експресії генів колагенів і білків ремоделювання колагенового матриксу. Експериментальним даним передуює біоінформатичний аналіз експресії колагенів та білків ремоделювання стромы з метою (як зазначає автор) оцінки діагностичного та прогностичного потенціалу експресії цих білків. Наведені дані з експресії колагенів та білків ремоделювання стромы, одержані на клінічному матеріалі, деталізують відомості щодо такої експресії, характерні для пухлин хворих із різними клініко-патологічними характеристиками, і є певною мірою доповненням інформації, що міститься в базах даних. А саме, показані достовірні відмінності в експресії досліджуваних білків для деяких підгруп, які при аналізі для більш узагальнених категорій у базах даних нівелюються.

На основі біоінформатичного аналізу були ідентифіковані мікроРНК, які, ймовірно, залучені до регуляції експресії генів мікрооточення, а також відібрані мікроРНК для подальшого експериментального дослідження. Далі було досліджено експресію обраних мікроРНК залежно від стадії пухлинного процесу, ступеня диференціювання пухлинних клітин, молекулярного підтипу тощо. Виявлено три мікроРНК, експресія яких достовірно відрізняється в тканині раку молочної залози в певних підкатегоріях пухлин.

Завершують роботу розділи обговорення результатів і висновки. Цікавим та корисним є підрозділ, у якому аналізуються різні методичні підходи до аналізу колагенової стромы пухлин молочної залози, хоча там є деякі повтори з матеріалом, наведеним у огляді літератури. Отримані автором результати підтвердили, що прогресування раку молочної залози супроводжується якісною перебудовою просторової організації колагенового матриксу. Результати дисертаційного дослідження порівнюються з даними інших дослідників щодо змін параметрів організації колагенової матриці в злоякісних пухлинах молочної залози. Проведене порівняння підтверджує необхідність орієнтуватися на комплексну характеристику колагену більше ніж на окремі кількісні характеристики. У вигляді таблиць наведені кореляційні матриці між показниками організації колагенової матриці та клініко-патологічними характеристиками, а також між показниками експресії генів, які досліджувались та показниками організації колагенової матриці, отриманими на основі експериментальних даних автора. Тільки до таблиць треба додати пояснення щодо того, що там виділено різними кольорами, і, може, деє спростити організацію таблиць, аби головне відразу впадало в око. Важливо, що в тексті обговорення на основі отриманих кореляцій зроблено відповідні припущення щодо того, які біологічні процеси можуть пояснювати ті чи інші асоціації між дослідженими параметрами. Автор наводить у вигляді узагальнювальної схеми інтегровану модель зв'язку між змінами параметрів організації колагенового матриксу і експресією білків ремоделювання стромального мікрооточення з одного боку та морфометричними і клініко-патологічними характеристиками раку молочної залози, з іншого. Особливий інтерес

становлять побудовані множинні регресійні моделі, які в подальшому можуть забезпечити інтегральне оцінювання морфологічних і молекулярних характеристик пухлинної стромы злоякісних пухлин молочної залози.

Висновки логічно впливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Дискусійні положення, зауваження щодо змісту дисертації та запитання до дисертанта

Загалом, робота справляє гарне враження. У ній логічно викладено результати дослідження, отримані на високому методологічному рівні, супроводжувані якісним ілюстративним матеріалом. Матеріал викладено науковим стилем української літературної мови. Поодинокі зауваження щодо оформлення не зменшують високої оцінки дослідження.

Так, зокрема, в таблицях 4.1, 6.1 та 6.2 заголовки рядків мають бути українською мовою. До таблиць 6.1 та 6.2 треба додати пояснення щодо того, що там виділено різними кольорами. В низці таблиць десяткові знаки відділяються крапкою замість коми. У деяких рисунках можна було б вилучити англійські написи, які дублюють підписуний підпис.

У розділі щодо біоінформатичного аналізу бракує узагальнювального висновку щодо проаналізованих з баз даних показників експресії, який слугував би переходом до наведених даних власних досліджень на клінічному матеріалі.

Краще замість датасети писати масиви або ряди даних.

Слід зазначити, що поодинокі стилістичні огріхи були виправлені на етапі попередньої роботи з текстом дисертації.

У порядку дискусії хотілося б обговорити деякі загальні питання, що впливають із матеріалів цього дисертаційного дослідження.

– Який зв'язок між даними біоінформатичного аналізу щодо експресії досліджуваних генів на рівні білка та власними даними з експериментального визначення такої експресії? Як пояснюються розбіжності, виявлені для деяких категорій, між експериментальними даними та відповідними витягами з баз даних?

– Як співвідносяться H-score та оптична щільність в разі визначення експресії білків за даними імуногістохімічного аналізу і чому в одних випадках застосовували один показник, а в інших – другий? І зокрема, як пояснити протилежно спрямовані зміни H-score та оптичної щільності при порівнянні тих самих категорій пухлин?

– Методологічно не зовсім зрозуміло, як мікроРНК, ідентифіковані та обрані для аналізу за даними біоінформатичного аналізу, вважаються такими, що експресуються саме в стромі.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційне дослідження Мушія Олександра Михайловича «Інтегративний аналіз архітектоніки колагенової строми 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 роботою, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами і розв'язують важливу наукову задачу – обґрунтування молекулярно-біологічних та морфометричних критеріїв дезорганізації колагенового каркасу як інформативних чинників агресивності перебігу раку молочної залози. За актуальністю, методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробацією 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 її автор заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 — «Біологія».

Офіційний рецензент:
кандидат біологічних наук,
старший дослідник,
старший науковий співробітник
відділу функціональної геноміки та прогресії раку
ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України

Михайло ЗАВЕЛЕВИЧ