

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук,
професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу

ПАВЛОВОЇ АННИ ОЛЕКСАНДРІВНИ

«РОЛЬ МАКРОФАГАЛЬНОГО ТА МАСТОЦИТАРНОГО СТРОМАЛЬНО-ІМУННОГО МІКРООТОЧЕННЯ В ОЦІНЦІ СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ»

подану на здобуття ступеня доктора філософії
у галузі знань 09 «Біологія»
за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертації

Основною причиною несприятливого прогнозу найбільш поширеного новоутворення у жінок - раку молочної залози, залишаються висока біологічна гетерогенність цієї форми раку, розвиток віддалених метастазів, формування резистентності до лікування та значна варіабельність клінічного перебігу захворювання. Тому, актуальним є пошук уніфікованих інтегральних маркерів захворювання, що базуються на вивченні пухлинного мікрооточення, зокрема таких клітинних компонентів як пухлино-асоційовані макрофаги, мастоцити, фібробласти, ендотеліальні клітини а також гуморальних, до яких належать компоненти позаклітинного матриксу, цитокіни, фактори росту та регуляторні некодуючі РНК. Особливий інтерес останніми роками привертає зв'язок експресії SPP1 з пухлино-асоційованими макрофагами, що розглядається як один із механізмів формування імуносупресивного мікрооточення та прогресування пухлинного процесу. Формування архітекtonіки пухлинного мікрооточення також суттєво залежить від балансу про- та антизапальних цитокінів IL-6 та IL-10, відповідно. Інтегративний аналіз імунної інфільтрації, матрицелюлярних генів та цитокінового спектра у поєднанні з дослідженням епігенетичної архітекtonіки пухлини відкриває можливості для верифікації патогенетичних статусу пухлини, що детермінує агресивний фенотип РМЗ, і створює надійне наукове підґрунтя для розробки та валідації інноваційних підходів до персоналізованого лікування хворих.

Виходячи з актуальності тематики дослідження за мету було поставлено: ідентифікувати клітинні та молекулярні патерни стромально-імунного мікрооточення, асоційовані зі ступенем злоякісності раку молочної залози, що було деталізовано в поставлених авторкою завданнях, основні із яких наступні:

- Вивчити рівень інфільтрації та функціональну активність мастоцитів та макрофагів у тканині РМЗ.

- Вивчити профіль циркулюючих та пухлинно-асоційованих цитокінів IL-6 та IL-10, а також регуляторних мікроРНК — miR-155-5p, miR-18a-5p, miR-26a-5p — у хворих на РМЗ з урахуванням вмісту клітин імунної компоненти мікрооточення пухлини.
- Ідентифікувати патерн молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів імунної компоненти мікрооточення для оцінки ступеня злоякісності РМЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Дисертація виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України за темами: «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022-2023, номер держреєстрації 0122U201203), та «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2024-2028, номер держреєстрації 0118U005468).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та їх достовірність

Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних високотехнологічних методів експериментальної та клінічної онкології, молекулярної біології, морфофункціональної оцінки клітинного та гуморального мікрооточення пухлини, рівня експресії про- та антизапальних цитокінів в пухлинному мікрооточенні та на системному рівні хворих на РМЗ з дотриманням правил належної клінічної та лабораторної практики біоетичного комітету. Отримані результати проаналізовано за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам для підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи.

Новизна наукових положень і результатів

На підставі комплексного морфологічного, молекулярно-біологічного, біоінформативного дослідження вперше ідентифіковано характерні ознаки комунікації клітинних, молекулярно-генетичних та епігенетичних компонентів стромально-імунного мікрооточення, асоційовані зі ступенем злоякісності РМЗ. Доведено зв'язок топології та функціональної активності мастоцитів з такими показниками злоякісності РМЗ як категорія T та N, ступінь диференціювання і

молекулярний підтип новоутворень. Найбільшу кількість М2-поляризованих макрофагів зафіксовано у РМЗ високого ступеня злоякості базального молекулярного підтипу.

Вперше виявлено та систематизовано кореляційні зв'язки між молекулярно-морфологічною таксономією МС і просторовою архітектонікою експресії ОРН у стромально-паренхіматозній компоненті пухлини, що дозволило обґрунтувати їхню роль у детермінації ступеня злоякості РМЗ. Висока експресія ОРН у стромальному компартменті асоціюється зі збільшенням загального пулу МС у хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфовузлів, низьким ступенем диференціювання пухлини та її агресивними молекулярними підтипами, тоді як у паренхіматозному компартменті за наявності метастазів — прямо корелює виключно з інтенсивністю інтратуморальної інфільтрації тканинними базофілами РМЗ.

Обґрунтовано роль епігенетичних чинників у регуляції функціонального стану клітин мікрооточення РМЗ.

Розширено та доповнено наукові уявлення про паракринну та матрикс-опосередковану комунікацію у пухлинному мікрооточенні РМЗ за участю мастоцитів і макрофагів. Вперше охарактеризовано цілісну систему взаємодії цих клітинних популяцій на основі трирівневого профілювання, що включає оцінку циркулюючих цитокінів (IL-6 та IL-10), тканинну експресію матрицелюлярних генів на рівні мРНК і білка, та їх специфічні регуляторні мікроРНК – miR-155-5p, miR-18a-5p.

Практичне значення отриманих результатів

В рамках представленого дисертаційного дослідження обґрунтовано доцільність комплексного визначення показників інфільтрації пухлинно-асоційованими макрофагами і МС, експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК та білка, цитокінів IL-6 та IL-10, а також регуляторних мікроРНК (miR-155-5p, miR-18a-5p) для поглибленої характеристики біології пухлинної клітини та оцінки ступеня злоякості новоутворень.

Дослідження запропонованої панелі маркерів стромально-імунного мікрооточення дозволяє розширюють науково-практичні підходи до високоточного прогнозу клінічного перебігу РМЗ, стратифікації хворих за ризиком локорегіонарного та метастатичного прогресування з урахуванням ступеня злоякості новоутворень, що забезпечує вчасну корекцію схем терапії, покращує віддалені результати лікування і показники виживаності цього контингенту хворих.

Для адресного інформування спеціалістів-онкологів та лікарів практичної ланки охорони здоров'я про шляхи та способи імплементації створених панелей біомаркерів з колективом співаторів дисертанткою видано методичні рекомендації «Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку

молочної залози». Отримані результати можуть бути використані під час подальших фундаментальних і прикладних досліджень, спрямованих на вивчення механізмів формування пухлинного мікрооточення, пошук нових молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів агресивності РМЗ, а також при розробці комплексних прогностичних моделей перебігу захворювання.

Повнота викладення результатів у наукових публікаціях

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, зокрема 5 статей у наукових журналах, що індексуються міжнародними наукометричними базами Scopus та Web of Science, 1 методичні рекомендації та 7 тез доповідей міжнародних наукових конференцій. Особистий внесок здобувачки в публікаціях з колективом співавторів та науковим керівником включає виконання переважної частини експериментів, збір, обробку й аналіз даних, підготовку ілюстрацій та участь у написанні рукописів. При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається авторка. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Відсутність порушень академічної доброчесності

У дисертації використані ідеї та результати інших авторів супроводжуються бібліографічними посиланнями. Спільно виконані дослідження і внесок колег зазначено у вступі та публікаціях. За результатами ознайомлення з текстом підстав для висновку про порушення академічної доброчесності не виявлено.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.

Дисертацію викладено на 192 сторінках машинописного тексту. Робота складається з анотації, списку наукових праць здобувача за темою дисертації, вступу, 7 розділів (зокрема огляду літератури, матеріалів і методів, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження), висновків, списку використаних джерел та додатка. Список використаних джерел містить 133 найменування, переважна кількість яких датується за останні 5 років. Робота ілюстрована 15 таблицями та 58 рисунками.

У *вступі* обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет, наведено методи, наукову новизну, практичне значення, особистий внесок, публікації та структуру роботи.

В розділі «Огляд літератури» висвітлено сучасний стан проблеми, детально охарактеризовано маркери пухлинного прогресування, про що йде мова в наступних підрозділах, які можна згрупувати за клітинними та гуморальними показниками, такими як «стромально-імунне мікрооточення за перебігу раку молочної залози», роль мастоцитів та макрофагів в пухлинному мікрооточенні, експресія про- та антизапальних цитокінів в прогресуванні РМЗ.

При цьому авторкою було детально проаналізовано досить велику кількість нових, переважно закордонних, публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Даний розділ доречно структурований, містить сучасні дані світової літератури щодо існуючих маркерних молекул, характерних для патофізіології раку молочної залози.

Важливим є висвітлення ролі прогностичного значення мастоцитів, яке може залежати від їх просторової локалізації, ступеня зрілості й дегрануляції, а також спектра медіаторів, що вивільняються. Також обговорюється роль однією з найчисленніших популяцій імунних клітин у мікрооточенні солідних новоутворень різного гістогенезу. Вони можуть походити з циркулюючих моноцитів, рекрутованих до пухлинної тканини, та з резидентних тканинних макрофагів. ТАМ беруть участь у механізмах вродженого й адаптивного імунітету, а їх фенотип і функціональна активність визначаються сукупністю локальних сигналів. Ґрунтовно описано про- та антизапальний фенотип експресованих інтерлейкінів, які можуть бути прямо чи опосередковано залучені в прогресування РМЗ, особливо за тричі негативної форми новоутворення (прогестерон, естроген та HER2/neu).

Розділ *Матеріали та методи дослідження* побудовано за традиційною схемою і налічує імунологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні методи, а також надано клініко-патологічну характеристику хворих на рак молочної залози, післяопераційний матеріал яких було досліджено. Проведення дослідження на клінічному матеріалі хворих було схвалено Вченою радою та Комісією з питань біоетики Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Роботу виконували відповідно до положень Гельсінської декларації та принципів Належної клінічної практики. Усі пацієнтки надали письмову інформовану згоду на використання біологічного матеріалу для проведення наукового дослідження. Біоінформатичний аналіз проводили для комплексної оцінки експресії досліджуваних молекулярних маркерів, ідентифікації генів-мішеней регуляторних мікроРНК, визначення їх функціональних взаємозв'язків та вивчення асоціацій із клініко-патологічними характеристиками і показниками виживаності хворих на РМЗ із застосуванням сучасних біоінформатичних платформ та відкритих баз даних. Морфологічне дослідження пухлинної тканини проводили із використанням загальногістологічних методів. Рівень інфільтрації та функціональну активність МС визначали гістохімічним методом

із використанням толуїдинового синього. Експресію ON, OPN, CD163 та CD68 у тканині раку молочної залози оцінювали імуногістохімічним методом.

Власні результати дослідження здобувачки представлені чотирма розділами, де надані ґрунтовні характеристики клітинних компонентів пухлинного мікрооточення, таких як інфільтрація та функціонування мастоцитів та макрофагів у новоутвореннях молочної залози, охарактеризовано цитокіновий профіль та епігенетична регуляція пухлинного мікрооточення та проведено аналіз рівня експресії матрицелюлярних генів у регуляції стромально-імунного мікрооточення РМЗ.

Важливими здобутками, зафіксованими в дослідженні було проведення порівняльного аналізу кількісних показників експресії маркерів CD68 (M1 макрофагів), що дозволило встановити достовірне зростання кількості загальних макрофагів у пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від стадії пухлинного процесу та зростання рівня інфільтрації CD68⁺ макрофагів вдвічі у зразках тканини РМЗ пацієнток із II стадією захворювання, порівняно із пухлинами I стадії, що вказує на прогностично-діагностичний маркер стадійності новоутворення. Також показано, що інтенсивність інфільтрації макрофагами також залежала від ступеня диференціювання пухлини. Зокрема, у зразках низькодиференційованого РМЗ рівень CD163⁺ M2-макрофагів був у 3,6 раза вищим порівняно з високодиференційованими карциномами.

Варто зазначити, що результати власних досліджень здобувачки якісно підтверджені графічним та ілюстративним матеріалом зі статистичною обробкою матеріалу, що базується на великій вибірці проаналізованих зразків від 134 хворих на РМЗ I–II стадій, які проходили лікування у Комунальному некомерційному підприємстві «Київський міський клінічний онкологічний центр» упродовж 2019–2022 рр та 30 пацієнток із фіброаденомою (ФА) молочної залози, який використовували як групу порівняння.

У **Розділі Аналіз та узагальнення результатів** обговорено та підсумовано, що рак молочної залози є біологічно гетерогенним захворюванням, перебіг якого визначається не лише молекулярними властивостями злоякісно трансформованих клітин, а й характером їх взаємодії з імунними, стромальними та гуморальними компонентами ТМЕ. Проведено порівняльний аналіз зі світовими науковими дослідженнями щодо залучення інфільтрованих клітинних компонентів в мікрооточенні РМЗ та експресії про- та антизапальних цитокінів в злоякісний фенотип та прогресування новоутворення.

Представлені **Висновки** відповідають Metі та завданням поставленим здобувачкою дисертаційного дослідження, що дозволяє сформувати комплексне уявлення про стромально-імунне мікрооточення РМЗ як інтегровану систему взаємодії імунних клітин, матрицелюлярних білків, цитокінів та регуляторних мікроРНК, асоційовану з агресивністю пухлинного процесу. Встановлено, що особливості інфільтрації пухлинно-асоційованими макрофагами і мастоцитами, експресія OPN, ON, цитокінів та регуляторних мікроРНК є взаємопов'язаними компонентами пухлинного мікрооточення, які відображають біологічні особливості перебігу захворювання.

Основний текст викладено українською мовою, якісним науковим стилем, матеріал подано логічно та послідовно. Водночас у тексті наявні окремі граматичні, термінологічні й технічні неточності, а деякі формулювання потребують редакційного уточнення. Ці недоліки не впливають на достовірність результатів.

Зауваження щодо змісту та оформлення, питання до здобувача

Дисертація справляє позитивне враження, а наведені зауваження не знижують її наукової цінності. Вони стосуються меж інтерпретації та можливих способів посилення доказової бази, а саме:

- У меті та 5 завданні дисертаційного дослідження варто було б додати: *Ідентифікувати патерн молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів імунної компоненти мікрооточення для оцінки ступеня злоякісності РМЗ та розробки інноваційних підходів персоналізованої терапії хворих*
- У науковій новизні, на мій погляд, надто категорично звучить **вперше** «проведено» «виявлено», оскільки пухлинному мікрооточенню присвячено достатню кількість експериментально-клінічних досліджень...А от «обгрунтовано роль» та «розширено і доповнено» виглядало б краще
- Наприкінці розділу «Огляд літератури» наведено Резюме, в якому в стислому вигляді йде мова щодо показників, які в подальшому досліджувались в дисертаційній роботі, однак не наголошено про ті аспекти, які є суперечливими або ж невідомими, і, відповідно, вивчались здобувачкою.
- Достатньо ґрунтовно і послідовно описані матеріали та методи дослідження, однак виникло незначне питання чи досліджували Ви концентрацію IL-6 та IL-10 в сироватці крові хворих на РМЗ протягом періоду лікування, зокрема в доопераційний та післяопераційний період для моніторингу за цими показниками?
- Як Ви можете пояснити те, що у тканині РМЗ кількість мастоцитів була вищою, ніж у фіброаденомах, тоді як індекс їх дегрануляції, навпаки, був меншим?
- Чому для характеристики макрофагального компонента пухлинного мікрооточення Ви використовували одночасно маркери CD68 і CD163 та яку додаткову інформацію дало визначення їх співвідношення?
- Як Ви інтерпретуєте відсутність зв'язку індексу зрілості мастоцитів з їх кількістю, локалізацією та ступенем дегрануляції? Чи свідчить це про відносну незалежність цих характеристик?
- Яке біологічне значення, на Вашу думку, може мати виявлена у частині клітин РМЗ ядерна локалізація експресії OPN і чому вона частіше ідентифікувалась у новоутвореннях з більш агресивним фенотипом?

Висновок

Дисертаційна робота Павлової Анни Олександрівни «Роль макрофагального та мастоцитарного стромально-імунного мікрооточення в оцінці ступеня злоякісності раку молочної залози» є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому отримано нові клініко-експериментально обґрунтовані дані про клітинні та гуморальні маркери прогресування РМЗ з різними клінічними стадіями.

За актуальністю, науковою новизною, обсягом досліджень, методичним рівнем, достовірністю результатів, теоретичним і практичним значенням, повнотою публікацій та оформленням дисертація відповідає Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України № 40 від 12 січня 2017 року (зі змінами), і «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженому постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами), а Павлова Анна Олександрівна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Людмила ГАРМАНЧУК