

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, провідного наукового співробітника відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

ГЕРАЩЕНКО ГАННИ ВОЛОДИМИРІВНИ

на дисертаційну роботу

МУШІА ОЛЕКСАНДРА МИХАЙЛОВИЧА

«Інтегративний аналіз архітектоніки колагенової стромы 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 теми

Рак молочної залози (РМЗ) залишається одним із найбільш поширених злоякісних новоутворень у жінок, а його клінічний перебіг визначається не лише молекулярними властивостями пухлинних клітин, але й характером їх взаємодії з компонентами пухлинного мікрооточення. Особливе місце у формуванні такого мікрооточення належить позаклітинному матриксу та, насамперед, колагеновій стромі, яка тривалий час розглядалася переважно як структурний каркас пухлини. Нині накопичено значний обсяг даних, що свідчить про активну участь колагенового матриксу в регуляції проліферації, міграції та інвазії пухлинних клітин, епітеліально-мезенхімального переходу, формуванні метастатичного потенціалу, імунній відповіді та чутливості пухлин до терапії.

Ремоделювання колагенового матриксу при раку молочної залози супроводжується змінами його кількості, просторової організації, щільності, орієнтації та ступеня поперечного зшивання волокон. Такі перебудови можуть змінювати механічні властивості пухлинної тканини, активувати механочутливі сигнальні шляхи та створювати сприятливі умови для інвазивного росту і метастазування. Водночас архітектоніка колагенової стромы формується в результаті складної взаємодії пухлинних клітин, пухлино-асоційованих фібробластів, ферментів ремоделювання позаклітинного матриксу та

регуляторних молекул, що контролюють синтез, деградацію й організацію колагену.

Попри значний прогрес у вивченні пухлинного мікрооточення, морфологічні особливості колагенової строми та молекулярно-біологічні механізми її ремоделювання нерідко аналізуються окремо. Такий підхід не дозволяє повною мірою встановити функціональні зв'язки між структурною організацією матриксу та активністю молекулярних регуляторів стромального ремоделювання. Тому особливої актуальності набуває інтегративний аналіз, який поєднує кількісну та просторову характеристику колагенових волокон із визначенням експресії молекулярно-біологічних маркерів, асоційованих із синтезом, деградацією, зшиванням і механічною перебудовою позаклітинного матриксу.

Встановлення взаємозв'язків між архітектонікою колагенової строми, молекулярними характеристиками пухлини та клініко-морфологічними ознаками раку молочної залози може поглибити розуміння механізмів формування інвазивного фенотипу пухлини. Виявлення характерних стромальних патернів і молекулярних маркерів їх формування потенційно може мати прогностичне значення, сприяти уточненню стратифікації пухлин за біологічною агресивністю та визначенню нових мішеней для терапевтичного впливу на пухлинне мікрооточення. Таким чином, комплексне дослідження структурної та молекулярної перебудови колагенової строми є актуальним напрямом сучасної онкології та може сприяти розвитку персоналізованих підходів до оцінки перебігу РМЗ.

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

Представлена дисертація має безпосередній зв'язок із плановою науковою діяльністю ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Її результати одержано під час виконання трьох НДР: верифікації патоморфологічних ознак пухлинного росту для розробки технологій штучного інтелекту (0121U110569, 2021–2022); розроблення і валідації комплексного лікування раку молочної залози у пацієнток молодого віку (0122U201203, 2022–2023); а також оцінці експресії та

метилування генів ремоделювання стромального мікрооточення (0123U102991, 2023–2024). Зміст дисертації узгоджується із завданнями зазначених тем, а особистим напрямом здобувача був інтегративний аналіз колагенового каркаса пухлини та пов'язаних із ним молекулярних показників.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів

Наукова новизна дослідження полягає у комплексному поєднанні кількісного аналізу архітекtonіки колагенової строми з оцінкою молекулярно-біологічних механізмів її ремоделювання при раку молочної залози. Вперше розроблено та апробовано алгоритм об'єктивної цифрової оцінки структурної організації колагенового матриксу за допомогою CurveAlign/CT-FIRE та ImageJ із застосуванням гістохімічної візуалізації по забарвленню Маллорі, комп'ютерної сегментації та морфометричного аналізу. На великому масиві колагенових волокон (понад 1,4 млн волокон), проведеного на матеріалі 120 карцином і 30 фіброаденом, встановлено специфічний морфометричний профіль строми РМЗ, що характеризується змінами довжини, ширини, прямолінійності, щільності та просторової орієнтації волокон. Доведено зв'язок цих параметрів зі ступенем місцевого поширення пухлини та метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів, а також визначено найбільш інформативні характеристики колагенового матриксу, пов'язані з агресивністю пухлинного процесу.

Автори створили власний послідовний алгоритм аналізу гістологічного зображення: фарбування препарату пухлини за Маллорі з наступними кроками; цифрова мікрофотографія, виділення стромального компонента, створення монохромної маски, обробка зображення CT-FIRE/CurveAlign для окремих волокон, ImageJ для площі строми й пухлини, перерахунок параметрів у фізичні одиниці, розрахунок щільності та пухлино-стромального співвідношення (TSR), статистичний аналіз.

Новими є результати інтегративного аналізу структурних характеристик колагенової строми та експресії молекулярних регуляторів її ремоделювання. Встановлено особливості експресії MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX залежно від

клініко-патологічних характеристик РМЗ та їх асоціації з морфометричними параметрами колагенових волокон, а також виявлено зв'язки експресії регуляторних мікроРНК (miR-26b-5p, miR-100-5p і miR-142-3p) із клініко-біологічними характеристиками раку молочної залози та перебігом пухлинного процесу. Вперше побудовано багатофакторні регресійні моделі, які показали, що ширина, довжина і щільність колагенових волокон та показник TSR можуть виступати незалежними предикторами розміру пухлини та регіонарного метастазування. Сукупність отриманих результатів дозволила сформувати інтегроване уявлення про молекулярно-морфологічне ремоделювання колагенової стромы як складову прогресування РМЗ.

Практичне значення одержаних результатів

Практичне значення одержаних результатів полягає у розвитку сучасного напряму цифрової патогістології шляхом впровадження об'єктивного кількісного аналізу архітекtonіки колагенової стромы раку молочної залози. Розроблений алгоритм комп'ютерної сегментації та морфометричної оцінки колагенового матриксу дозволяє стандартизувати визначення параметрів просторової організації волокон, зменшити суб'єктивність традиційної візуальної оцінки гістологічних препаратів та використовувати кількісні характеристики стромы як додаткові критерії агресивності пухлинного процесу. Встановлені прогностично значущі показники — зокрема ширина і щільність колагенових волокон та індекс TSR — можуть бути використані для подальшого створення цифрових морфометричних моделей оцінки ризику регіонарного метастазування та інтеграції таких підходів у системи комп'ютерної підтримки прийняття рішень у патоморфології.

Водночас результати роботи мають практичне значення для розвитку молекулярної онкології, оскільки визначені особливості експресії MMP1, MMP8, TIMP3, LOX та регуляторних мікроРНК доповнюють морфологічну характеристику пухлинної стромы молекулярними показниками її ремоделювання. Поєднання цифрових морфометричних параметрів із молекулярно-біологічними маркерами створює підґрунтя для комплексної

стратифікації хворих за ризиком прогресування РМЗ і для подальшої розробки персоналізованих прогностичних моделей. Такий інтегративний підхід сприяє формуванню нового рівня оцінки пухлинного мікрооточення, в якому цифрова патогістологія та молекулярна онкологія розглядаються як взаємодоповнювальні компоненти сучасної прецизійної онкології.

Результати дослідження можуть бути використані в освітньому процесі під час викладання онкобіології, патоморфології та біоінформатики для формування сучасних уявлень про пухлинне мікрооточення, цифровий аналіз гістологічних зображень і молекулярні механізми ремоделювання строми.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій дисертаційної роботи забезпечується чітко сформульованими метою і завданнями дослідження, адекватністю обраних методичних підходів та комплексним характером аналізу. У роботі поєднано гістоморфологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, біоінформатичні, цифрові морфометричні, статистичні та математичні методи, що дозволило дослідити ремоделювання колагенової строми РМЗ на структурному, молекулярному та регуляторному рівнях. Застосування взаємодоповнювальних методів забезпечило багаторівневу верифікацію отриманих результатів та їх біологічно обґрунтовану інтерпретацію.

Достовірність одержаних даних підтверджується достатнім обсягом дослідженого клінічного матеріалу, стандартизованою методологією цифрового аналізу та значним масивом кількісних морфометричних даних. Розроблений алгоритм було апробовано на 120 зразках тканини РМЗ і 30 зразках фіброаденом із аналізом близько 1,4 млн колагенових волокон, що суттєво підвищує статистичну надійність оцінки архітекtonіки строми та мінімізує вплив суб'єктивного фактора. Використання кореляційного аналізу, а також лінійних і логістичних регресійних моделей дозволило не лише встановити асоціативні

зв'язки, але й визначити незалежні предиктори клінічно значущих характеристик пухлинного процесу.

Сформульовані рекомендації не виходять за межі фактичного матеріалу. Автор розрізняє встановлені асоціації та перспективи клінічного застосування, наголошуючи на необхідності подальшої зовнішньої валідації. Така обережність інтерпретації, разом із використанням контрольних груп і багатофакторного аналізу, свідчить про належний рівень наукової доброчесності та обґрунтованості висновків.

Наукові висновки логічно випливають із отриманих експериментальних результатів і узгоджуються з поставленими завданнями дослідження. Виявлені зв'язки морфометричних характеристик колагенової стромы з клініко-патологічними параметрами РМЗ, а також асоціації експресії MMP1, MMP8, TIMP3, LOX і регуляторних мікроРНК із перебігом пухлинного процесу підтверджують обґрунтованість запропонованих підходів до комплексної оцінки пухлинного мікрооточення. Сукупність застосованих методів, статистична значущість установлених закономірностей і внутрішня узгодженість результатів дають підстави вважати сформульовані наукові положення, висновки та практичні рекомендації достовірними й належно обґрунтованими.

Особистий внесок здобувача

Провідна роль у виконанні дисертації належить О. М. Мушію. Особистий внесок здобувача полягає у безпосередній участі в усіх основних етапах виконання дисертаційного дослідження. Автором самостійно опрацьовано сучасні джерела літератури за темою роботи, проаналізовано клініко-патологічні характеристики хворих на рак молочної залози, сформовано репрезентативну вибірку та відповідну колекцію пухлинної тканини. Спільно з науковим керівником визначено концептуальний напрям дослідження, сформульовано його мету і завдання та здійснено інтерпретацію отриманих результатів.

Вагомою складовою особистого внеску здобувача є розроблення та практичне тестування алгоритму цифрової верифікації структурних порушень

колагенового матриксу в новоутвореннях молочної залози. Мушій О.М. безпосередньо брав участь у роботі з гістологічним матеріалом, цифровому аналізі архітектоніки колагенової стромы, опрацюванні одержаних даних та встановленні їх зв'язку з клініко-патологічними і молекулярно-біологічними характеристиками пухлинного процесу. Сукупність виконаних досліджень дала змогу визначити молекулярно-біологічні критерії дезорганізації колагену як інформативні ознаки перебігу РМЗ.

Результати особисто виконаних досліджень здобувачем узагальнено, статистично опрацьовано та представлено у наукових публікаціях і доповідях на вітчизняних та міжнародних наукових форумах. За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць, у тому числі 9 статей, 8 тез доповідей і методичні рекомендації, що свідчить про належну апробацію та представлення основних результатів роботи науковій спільноті.

Повнота опублікування результатів дисертації та внесок здобувача у публікації зі співавторами

Основні положення та результати дисертаційної роботи достатньо повно відображені у наукових публікаціях здобувача. За темою дисертації оприлюднено дев'ять статей, із яких шість представлені у міжнародних наукометричних базах Scopus або Web of Science, а три — у вітчизняних фахових виданнях. Опубліковано вісім матеріалів конференцій, що документують апробацію результатів, а також методичні рекомендації для клінічних онкологів.

Аналіз переліку праць свідчить, що в них послідовно відтворено методичну розробку, основні морфометричні закономірності та молекулярні асоціації. У наукових працях, виконаних у співавторстві, особистий внесок О.М. Мушія є суттєвим і безпосередньо пов'язаним із виконанням дисертаційного дослідження. Здобувач брав участь у роботі з гістологічним та клінічним матеріалом, проведенні лабораторних досліджень, розробленні методологічних підходів, біоінформатичному та статистичному аналізі, узагальненні та інтерпретації отриманих результатів, а також у підготовці текстів наукових публікацій. Зокрема, у роботах, присвячених цифровому аналізу організації

колагену, експресії COL1A1, матриксних металопротеїназ та мікроРНК, особистий внесок здобувача охоплював як експериментальну частину, так і статистичне опрацювання та підготовку рукописів, що дозволяє вважати представлені в дисертації результати належним чином апробованими та особисто опрацьованими автором.

Аналіз структури роботи та загальна оцінка дисертації

Дисертаційна робота має логічно побудовану структуру, що відповідає меті та завданням дослідження. Робота викладена на 201 сторінці та складається з анотації, списку опублікованих праць здобувача, вступу, шести розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Викладення основного матеріалу та висновків завершується на сторінці 167; список використаних джерел подано зі сторінки 136, додатки А і Б розпочинаються на сторінках 186 і 198. Табличний і графічний матеріал є інформативним, органічно інтегрованим у текст та відображає основні етапи статистичного, морфометричного й молекулярного аналізу.

У вступі здобувач визначає колагенову строму як функціонально значущу складову пухлинного мікрооточення, перебудова якої може відображати та водночас підтримувати прогресування раку молочної залози. Обґрунтування актуальності спирається на необхідність об'єктивного кількісного оцінювання колагенової архітекτονіки та встановлення її зв'язку з молекулярними механізмами ремоделювання матриксу. Поставлені завдання охоплюють усі рівні проблеми — від розроблення способу морфометричного аналізу до створення прогностичних моделей.

Перший розділ присвячений аналізу сучасних уявлень про роль пухлинної строми, колагенового матриксу та молекулярних механізмів його ремоделювання у прогресуванні злоякісних новоутворень. Автор аналізує вплив пухлинної строми на ріст, інвазію та метастазування, характеризує основні групи білків ремоделювання позаклітинного матриксу і розглядає колаген як структурну основу механічних та сигнальних взаємодій у пухлині. Важливо, що огляд літератури не обмежується описом структури матриксу, а охоплює низку

генетичних й епігенетичних механізмів регуляції його перебудови. Це формує належне теоретичне підґрунтя для експериментальних розділів.

Методологію роботи представлено у другому розділі. Наведено характеристику клінічного матеріалу та детально описано гістоморфологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, біоінформатичні, цифрові морфометричні та статистичні методи дослідження. Особливістю роботи є поєднання аналізу клінічного матеріалу з цифровою морфометрією, імуногістохімічним визначенням білків, оцінюванням експресії мРНК та мікроРНК, біоінформатичним пошуком і математичним моделюванням. Досліджено матеріал 120 хворих на рак молочної залози та 30 пацієнток із фіброаденомою. Кількісний аналіз близько 1,4 млн колагенових волокон дозволив зменшити вплив суб'єктивного морфологічного оцінювання та забезпечив достатню статистичну потужність для подальших зіставлень.

Розділи власних досліджень послідовно відображають основні етапи реалізації поставлених завдань: від розроблення алгоритму цифрової оцінки архітекtonіки колагенової матриці та визначення її морфометричного фенотипу до аналізу експресії колагенів, білків ремоделювання позаклітинного матриксу та регуляторних мікроРНК. Так, третій розділ формує перший, морфометричний рівень власного дослідження. Здобувачем створено послідовний алгоритм цифрового аналізу колагенової матриці й визначено систему параметрів, придатних для характеристики її просторової організації. Порівняльний аналіз продемонстрував суттєві відмінності між колагеновою стромою доброякісних і злоякісних новоутворень молочної залози. У межах групи раку молочної залози встановлено зв'язки морфометричних показників із розміром і стадією пухлини, ступенем злоякісності та молекулярно-біологічними характеристиками.

Особливо значущими є результати аналізу метастатичного статусу. Показано, що ураження регіонарних лімфатичних вузлів та наявність віддалених метастазів супроводжуються змінами не окремої характеристики, а цілісного просторового профілю колагенової стромы. Таким чином, морфометричні

показники розглядаються в роботі як взаємопов'язана система, здатна відображати біологічну агресивність пухлинного процесу.

У четвертому розділі автор зосереджується на молекулярних механізмах формування виявленого морфометричного фенотипу. Біоінформатичний етап дозволив попередньо оцінити клінічне значення фібрилярних колагенів та білків ремоделювання строми. Після цього у власному клінічному матеріалі проаналізовано експресію COL1A1, COL3A1, MMP-1, MMP-8, TIMP-3 і LOX. Встановлені асоціації підтверджують, що агресивність перебігу раку молочної залози пов'язана з комплексною зміною системи ремоделювання матриксу. Підвищення протеолітичної та зшивальної активності на тлі зниження її інгібування створює умови для формування більш щільної та структурно зміненої колагенової мережі.

П'ятий розділ доповнює цю модель епігенетичним компонентом. У результаті *in silico* аналізу визначено мікроРНК, потенційно залучені до регуляції генів позаклітинного матриксу. Функціональне збагачення їхніх генів-мішеней вказало на зв'язок із колагеновим матриксом, фокальною адгезією, TGF- β -, HIF-1-залежними та іншими сигнальними шляхами. Перевірка експресії відібраних мікроРНК у клінічному матеріалі дала змогу встановити їхні асоціації з метастатичним статусом, розміром пухлини, стадією та молекулярним підтипом. Ці результати дозволяють розглядати мікроРНК як одну з регуляторних ланок молекулярно-морфологічної перебудови строми.

Шостий розділ присвячено узагальненню отриманих результатів та формуванню інтегрованої моделі молекулярно-морфологічної перебудови колагенової строми РМЗ. У ньому здобувач зіставляє результати всіх попередніх етапів і формулює узагальнену концепцію, відповідно до якої просторова організація колагенової строми визначається балансом чотирьох взаємопов'язаних процесів: синтезу колагену, його протеолізу, інгібування протеолітичних ферментів і поперечного зшивання волокон. Зміна співвідношення між цими процесами формує морфометричний фенотип, асоційований із клінічною агресивністю раку молочної залози.

Така послідовність викладення забезпечує цілісність роботи, демонструє логічний зв'язок між морфологічними, молекулярними та клінічними складовими дослідження і підкреслює його міждисциплінарний характер.

На основі отриманих даних представлено інтегровану модель молекулярно-морфологічної перебудови колагенової стромы. Менш агресивний варіант характеризується відносним збереженням довжини та ширини колагенових волокон і більш збалансованим профілем білків ремоделювання. Для пухлин із несприятливими характеристиками властиві потоншення та вкорочення волокон, підвищення їх щільності й прямолінійності, зростання експресії MMP-1, MMP-8 і LOX та зниження TIMP-3.

У завершальній частині шостого розділу описано математичні моделі, що пов'язують морфометричні й молекулярні показники з клінічними характеристиками пухлинного процесу. Вони становлять основу для подальшого формування комплексної системи оцінювання ризику метастазування та прогресування раку молочної залози. Водночас автор не перебільшує ступінь готовності моделей до практичного використання й зазначає необхідність їх перевірки в незалежних проспективних дослідженнях.

Підсумкові висновки логічно випливають із результатів роботи та охоплюють усі поставлені завдання. Їх зміст відображає як фундаментальний аспект дослідження — розкриття механізмів реорганізації колагенового матриксу, так і прикладний — визначення комплексу потенційно прогностичних морфометричних і молекулярних показників.

Загалом дисертаційна робота є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому вирішено актуальне наукове завдання, пов'язане з визначенням структурних і молекулярно-біологічних ознак ремоделювання колагенової стромы при раку молочної залози. Робота характеризується достатнім обсягом фактичного матеріалу, використанням сучасних методичних підходів, належним рівнем статистичного аналізу та практичною спрямованістю отриманих результатів. Представлені дані мають значення для подальшого

розвитку цифрової патогістології, молекулярної онкології та створення інтегрованих підходів до оцінки агресивності пухлинного процесу.

Робота становить завершене комплексне дослідження, у якому результати цифрової морфометрії не розглядаються ізольовано, а одержують молекулярне та біологічне пояснення. Це забезпечує цілісність дисертації та підтверджує її відповідність вимогам до наукових робіт на здобуття ступеня доктора філософії.

Відсутність або наявність порушень академічної доброчесності

Перевірка рукопису на дотримання академічної доброчесності проведена відповідно до локального порядку установи. За змістовим аналізом звіту не встановлено некоректних запозичень, привласнення чужих результатів, маніпулювання первинними даними чи неналежного дублювання публікацій. Остаточний висновок: порушення академічної доброчесності відсутні.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Під час рецензування дисертації виникли певні зауваження.

1. Певного уточнення потребує формулювання об'єкта дослідження — «рак молочної залози», яке є надто широким порівняно з фактичним предметом і спрямованістю роботи. З огляду на мету та завдання дисертації більш конкретним видається визначення об'єкта як «ремоделювання колагенової строми при раку молочної залози» або «колагенова строма пухлинної тканини молочної залози при РМЗ», що точніше відповідало б змісту проведеного дослідження.

2. У формулюванні мети дослідження доцільно конкретизувати об'єкт, у якому досліджували просторову організацію колагенової матриці. Формулювання «ідентифікувати особливості просторової організації і кількісні характеристики колагенової матриці, асоційовані з агресивністю перебігу пухлинного процесу» бажано доповнити словами «у тканині раку молочної залози». Це зробило б мету самодостатньою та точнішою.

3. У ключових словах одночасно використано поняття «колагенова строма» і «колагеновий матрикс». Бажано визначити їх співвідношення та уніфікувати термінологію. Строма пухлини є ширшим поняттям і включає клітинні компоненти, судини та позаклітинний матрикс, тоді як колаген є одним із основних компонентів останнього. Тому формулювання «колагенова строма» потребує пояснення, якщо ним автор позначає саме колагеновий компонент пухлинної строми.

4. Доцільно також чітко визначити, що автор розуміє під терміном «цифрова патологія», оскільки він використовується як одна з ключових характеристик практичного значення роботи. У контексті даної дисертації йдеться насамперед про цифровізацію гістологічних зображень, їх комп'ютерну сегментацію та кількісний аналіз структурних характеристик тканини, тобто «цифрову патогістологію».

5. У розділі «Перелік умовних позначень» українські та англійські терміни представлені непослідовно. Доцільно уніфікувати принцип подання скорочень: або подавати український термін із міжнародним еквівалентом при першому згадуванні, або послідовно використовувати міжнародні позначення для генів і білків, уникаючи змішування мовних форм без необхідності.

6. В анотації та вступі методи статистичного аналізу охарактеризовано дещо узагальнено: використано поняття «варіаційна статистика», «статистичні та математичні методи», без конкретизації їх змісту. Водночас у розділі 2.6 наведено застосовані статистичні критерії — t-критерій Стюдента, U-критерій Манна–Уїтні, рангову кореляцію Спірмена, множинний регресійний аналіз. Доцільно було б уніфікувати опис методів у різних частинах роботи та замінити нечітке поняття «варіаційна статистика» на «описова статистика», а термін «математичні методи» — на більш конкретне «методи статистичного моделювання» або «лінійний та логістичний регресійний аналіз».

7. У методах статистичного аналізу не зазначено, за допомогою якого критерію перевіряли відповідність кількісних даних нормальному розподілу. Водночас вибір між t-критерієм Стюдента та U-критерієм Манна–Уїтні

безпосередньо залежить від характеру розподілу даних. Тому доцільно було б вказати використаний тест на нормальність, наприклад Шапіро–Уїлка або інший відповідний критерій.

8. У роботі не цілком зрозуміло, чи застосовувалися поправки на множинні порівняння при аналізі морфометричних, молекулярних та клініко-патологічних показників. У біоінформатичній частині автор чітко зазначає використання поправки Benjamini–Hochberg та контролю FDR, однак у загальному розділі статистичного аналізу для порівнянь експериментальних груп відповідна інформація відсутня. З огляду на значну кількість досліджуваних параметрів і міжгрупових порівнянь доцільно було б зазначити, чи проводилася корекція рівня статистичної значущості та який саме метод використовувався.

9. Автором наведено значний загальний обсяг проаналізованого матеріалу — близько 1,4 млн колагенових волокон у 120 зразках РМЗ та 30 зразках фіброаденом. Водночас для оцінки відтворюваності цифрового морфометричного аналізу доцільно було б чітко зазначити кількість мікрофотографій/полів зору, проаналізованих для кожного гістологічного зразка, принцип їх відбору, а також середню або задану кількість волокон, що включалася до аналізу одного зразка. Такі дані є важливими для оцінки репрезентативності вибірки та можливого впливу внутрішньопухлинної гетерогенності на результати морфометрії.

10. У методах написано, що для кожного зображення CurveAlign визначав параметри волокон, але не описано, що в статистичному аналізі вважалось незалежною одиницею спостереження: окреме волокно, мікрофотографія чи пацієнт/зразок. Це принципово важливо: 1,4 млн волокон не означають 1,4 млн незалежних біологічних спостережень. Якщо статистичні тести виконувалися на рівні окремих волокон без попередньої агрегації даних на рівні зразка/пацієнта, виникає ризик псевдореплікації і штучного збільшення статистичної потужності.

11. У представленні результатів кореляційного аналізу доцільно було б чітко зазначати, який саме коефіцієнт кореляції наведено. У методичному розділі вказано використання рангової кореляції Спірмена, отже відповідний коефіцієнт

коректніше позначати як rs, а не r. Крім того, поряд із величиною коефіцієнта бажано наводити рівень статистичної значущості для кожної асоціації, особливо для результатів, що включаються до ключових висновків роботи. Аналогічно, для регресійних моделей бажано послідовно наводити не лише R^2 , а й β -коефіцієнти, довірчі інтервали та р-значення для окремих предикторів.

12. Термін «багатофакторні регресійні моделі» бажано уніфікувати з прийнятою статистичною термінологією. Для моделей, у яких одна залежна змінна аналізується одночасно відносно кількох незалежних предикторів, доцільніше вживати поняття «множинна регресійна модель», «мультифакторна регресійна модель» або, залежно від конкретної структури аналізу, «мультиваріабельна регресійна модель». Крім того, бажано щоразу конкретизувати тип моделі — множинна лінійна чи множинна логістична регресія, — а також чітко зазначати залежну змінну та включені до моделі предиктори.

13. Як побажання до огляду літератури: враховуючи детальний опис клітинних компонентів пухлинної стромы та позаклітинного матриксу, доцільно було б узагальнити ці відомості у вигляді таблиці або схематичного рисунка. Це полегшило б сприйняття значного обсягу матеріалу та наочно продемонструвало взаємодію клітинних і матриксних компонентів пухлинного мікрооточення.

14. Формулювання «алгоритм верифікації параметрів дезорганізації колагенового матриксу» видається недостатньо конкретним і дещо ускладнює розуміння суті розробленого підходу. З огляду на фактичну послідовність процедур — гістохімічне забарвлення, стандартизовану цифрову візуалізацію, сегментацію та кількісну оцінку морфометричних характеристик волокон — доцільніше було б використовувати термін «алгоритм цифрової сегментації та морфометричної оцінки архітекtonіки колагенової стромы» або «алгоритм цифрового морфометричного аналізу колагенового матриксу».

15. Дискусійним є використання англomовного скорочення TSR (tumour–stroma ratio) у тексті українськомовної дисертації. Оскільки термін у роботі перекладено як «пухлинно-стромальне співвідношення», для термінологічної

послідовності можна було б використовувати українське скорочення, залишивши міжнародний аналог TSR при першому згадуванні.

16. Потребує додаткового пояснення твердження щодо переваги забарвлення за Маллорі порівняно з методами Массона та ван Гізона. Автор зазначає, що на першому етапі було здійснено підбір методу забарвлення та встановлено «пріоритетність» Маллорі завдяки кращому селективному контрастуванню колагенових волокон. Водночас із наведеного опису випливає, що вибір ґрунтувався переважно на візуальній оцінці. Було б доцільно навести кількісні критерії порівняння якості сегментації або контрастності трьох гістохімічних методів, особливо з огляду на те, що саме вибір забарвлення є важливою складовою запропонованого цифрового алгоритму.

17. Формулювання «тканина РМЗ має специфічний морфометричний профіль організації колагенового матриксу» видається термінологічно не зовсім вдалим. Морфометрія є методом кількісного аналізу, тоді як безпосередньо визначали структурні та просторово-геометричні характеристики колагенових волокон — довжину, ширину, прямолінійність, щільність та кут орієнтації. Тому більш коректним видається використання термінів «структурно-просторовий профіль», «профіль архітекtonіки колагенового матриксу» або «структурно-просторові характеристики колагенової строми».

18. Формулювання «ідентифіковано профіль експресії білків ремоделювання стромального мікрооточення» потребує уточнення. У наведених результатах фактично визначали рівні експресії MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX та аналізували їх кореляції зі структурними характеристиками колагену. Тому в цьому контексті точніше говорити про «рівні експресії», «особливості експресії» або «сукупність показників експресії досліджених білків». Термін «профіль експресії» доцільніше використовувати у разі характеристики сукупного патерну кількох маркерів, їх просторового розподілу або особливостей локалізації.

19. Аналогічного уточнення потребує підрозділ 4.6 «Молекулярний профіль колагенової строми пухлин із різним метастатичним статусом». Бажано конкретизувати, що саме автор вкладає у поняття «молекулярний профіль»:

сукупність рівнів експресії MMP1, MMP8, TIMP3, LOX, колагенів чи інших маркерів. Без такого уточнення назва є надто узагальненою.

20. Формулювання «поєднане визначення MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX із морфометричними параметрами колагенових волокон» є недостатньо точним. По-перше, необхідно вказувати, що визначали саме рівні експресії зазначених білків. По-друге, замість терміна «морфометричні параметри» доцільніше використовувати змістовне визначення досліджуваних ознак — «параметри архітекtonіки колагенових волокон», «структурно-просторові характеристики» або «параметри просторової організації колагенового матриксу». Морфометрія в цьому випадку є методом їх вимірювання, а не властивістю тканини.

21. У твердженні про те, що низькодиференційований РМЗ характеризувався підвищенням експресії MMP1 на 59,2%, MMP8 — на 96,6% та LOX — у 2,05 раза, необхідно обов'язково зазначити групу порівняння. Аналогічно це стосується подальших тверджень щодо змін експресії LOX і TIMP3 залежно від розміру пухлини та метастатичного статусу. Відсоткові або кратні зміни не можуть бути однозначно інтерпретовані без чіткого зазначення референтної групи.

22. Назва розділу 5 — «Особливості епігенетичної регуляції генів колагенів та білків ремоделювання стромального компоненту пухлинного мікрооточення...» — видається надто широкою порівняно з фактичним змістом дослідження, оскільки в роботі аналізується лише один із механізмів епігенетичної регуляції — регуляція за участю мікроРНК. Більш коректною була б назва «Особливості регуляції експресії генів колагенів та білків ремоделювання стромального компоненту пухлинного мікрооточення за участю мікроРНК».

23. У характеристиці молекулярно-генетичних методів термін «ПЛР-дослідження експресії мікроРНК» є надто загальним. Оскільки в роботі фактично застосовували кількісну ПЛР зі зворотною транскрипцією, доцільніше одразу зазначати повну назву методу — «кількісна ПЛР зі зворотною транскрипцією».

24. У тексті трапляються формулювання, які потребують смислової конкретизації. Зокрема, твердження про можливість ідентифікації «груп пацієнток високого ризику» бажано доповнити уточненням, високого ризику якої саме події — прогресування, рецидиву, метастазування, несприятливого прогнозу тощо.

25. У тексті роботи трапляються окремі редакційно-технічні неточності, зокрема неуніфіковане написання назви гістохімічного методу («Маллорі»/«Малорі»), а також різне оформлення математичних знаків (<, >, =) та числових значень. Не зовсім вдалим є скорочене позначення «COL1» у тексті при характеристиці білка. Доцільно або використовувати повне стандартизоване позначення відповідного білка/гена, або наводити його назву словами, щоб уникнути неоднозначності. У науковому стилі коректніше використовувати словосполучення «джерела літератури», а не «літературні джерела», а також послідовно дотримуватися єдиного оформлення термінів, символів і скорочень. Зазначені недоліки мають редакційний характер, проте їх усунення сприяло б термінологічній та стилістичній уніфікації дисертаційної роботи.

Незважаючи на окремі дискусійні та редакційно-методичні зауваження, дисертаційна робота справляє надзвичайно сильне враження завдяки сучасній концепції, високому методичному рівню, значному обсягу фактичного матеріалу та вдалому поєднанню цифрової патогістології, молекулярної онкології й кількісного аналізу пухлинного мікрооточення. За глибиною, цілісністю та науковою зрілістю це дослідження суттєво вирізняється серед більшості кваліфікаційних робіт і, на мою думку, є прикладом справді високоякісної сучасної дисертації.

У порядку дискусії бажано почути відповідь на наступні запитання:

1. У підрозділі 3.3. на с. 82 дисертаційної роботи за результатами кластерного аналізу виділено три кластери. Які ключові морфологічні та молекулярні ознаки відрізняють ці кластери? Чим, зокрема, відрізняються два кластери люмінальних пухлин і яке потенційне діагностичне або прогностичне значення може мати таке розмежування?

2. Які клітинні популяції пухлинного мікрооточення Ви вважаєте основними джерелами досліджених білків ремоделювання колагенового матриксу — COL1A1, COL3A1, MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX? Яку роль при цьому відіграють пухлино-асоційовані фібробласти та які інші клітини пухлини можуть брати участь у формуванні й перебудові колагенової строми?

3. Які з виявлених у Вашій роботі структурно-просторових і молекулярно-біологічних ознак дезорганізації колагенового матриксу Ви вважаєте найбільш інформативними для прогнозування перебігу РМЗ? Які з них, на Ваш погляд, мають найбільший потенціал для практичної стратифікації хворих?

4. У роботі добре показано клінічні асоціації змін колагенової строми. Як Ви інтерпретуєте ці зміни з фундаментальної точки зору: які зміни функціонального стану пухлино-асоційованих фібробластів та інших клітин мікрооточення можуть лежати в основі виявленої перебудови архітекtonіки колагенового матриксу при прогресуванні РМЗ?

5. Які відомі функції досліджених у роботі miR-26b-5p, miR-100-5p, miR-142-3p і miR-143-3p у канцерогенезі РМЗ та яким чином вони потенційно можуть бути пов'язані з регуляцією ремоделювання позаклітинного матриксу?

**Висновок щодо відповідності дисертації вимогам «Порядку
присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової
спеціалізованої вченої ради...», затверджений постановою КМУ від
12.01.2022 № 44.**

Дисертація Мушія Олександра Михайловича «Інтегративний аналіз архітектоніки колагенової строми та молекулярно-біологічних маркерів її ремоделювання при раку молочної залози» є завершеною самостійною кваліфікаційною науковою працею, у якій отримано нові науково обґрунтовані результати щодо молекулярних механізмів і структурних проявів перебудови пухлинної строми при раку молочної залози.

Сукупність одержаних результатів розв'язує актуальне наукове завдання, що має істотне значення для біології пухлинного росту, молекулярної онкології та цифрової патоморфології. Робота характеризується сучасною методологією, достатнім обсягом експериментального матеріалу, комплексним поєднанням морфологічних, молекулярно-біологічних, біоінформатичних і статистичних підходів, належним рівнем наукової новизни та практичної значущості.

Робота має комплексний міждисциплінарний характер та поєднує цифрове дослідження архітектоніки колагенових волокон з аналізом експресії COL1A1, COL3A1, MMP-1, MMP-8, TIMP-3, LOX і потенційно залучених до їх регуляції мікроРНК. Встановлені асоціації miR-26b-5p, miR-100-5p та miR-142-3p із клініко-патологічними характеристиками раку молочної залози доповнюють отримані морфологічні результати та формують цілісне уявлення про багаторівневу регуляцію колагенового матриксу.

Достовірність наукових положень забезпечена використанням взаємодоповнювальних методів, достатнім обсягом фактичного матеріалу та застосуванням сучасних підходів до статистичного аналізу. Побудовані регресійні моделі демонструють перспективність використання морфометричних характеристик для оцінювання поширеності пухлинного процесу. Водночас автор обґрунтовано визначає необхідність їх подальшої

зовнішньої та проспективної валідації перед можливим клінічним застосуванням.

Основні наукові положення і висновки дисертації є обґрунтованими, відповідають поставленій меті та завданням і достатньо повно висвітлені у наукових публікаціях здобувача. Представлені у роботі результати мають теоретичне значення для поглиблення уявлень про роль архітекtonіки колагенового матриксу та механізмів його ремоделювання у прогресуванні раку молочної залози, а запропоновані підходи створюють підґрунтя для подальшого розвитку цифрової патології, молекулярної стратифікації пухлин та персоналізованої онкології. Висловлені у відгуку зауваження та дискусійні положення не знижують загальної високої наукової цінності роботи і не впливають на обґрунтованість її основних положень та висновків.

Дисертація відповідає принципам академічної доброчесності, а її основні результати достатньо повно представлені в наукових працях та матеріалах наукових конференцій. Висловлені у відгуку зауваження не стосуються достовірності основних положень і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Таким чином, за актуальністю, змістом, обсягом досліджень, науковою новизною, достовірністю результатів, теоретичним і практичним значенням дисертаційна робота відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 та Порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 зі змінами. Мушій Олександр Миколайович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

**Доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник
відділу молекулярної онкогенетики
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України**

Ганна Геращенко