

ВІДГУК

офіційного опонента, члена-кореспондента НАН України, доктора біологічних наук, професора, завідувача відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Кашуби Володимира Івановича

на дисертаційну роботу Павлової Анни Олександрівни на тему:

«Роль макрофагального та мастоцитарного стромально-імунного мікрооточення в оцінці ступеня злоякісності раку молочної залози»,
подану на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 «Біологія»
зі спеціальності 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційного дослідження

Рак молочної залози залишається однією з найбільш поширених злоякісних пухлин у жінок і водночас є моделлю вираженої молекулярної та клітинної гетерогенності. Сучасне розуміння біології раку молочної залози дедалі більше виходить за межі аналізу лише трансформованої клітини та передбачає оцінку складної системи взаємодій між пухлинними, імунними й стромальними компонентами. Саме пухлинне мікрооточення значною мірою визначає характер локальної імунної відповіді, ангіогенез, ремоделювання позаклітинного матриксу, інвазивність, метастатичний потенціал і формування резистентності до терапії.

У цьому контексті дисертаційна робота Павлової Анни Олександрівни присвячена актуальній проблемі фундаментальної онкології — ідентифікації клітинних та молекулярних патернів стромально-імунного мікрооточення, асоційованих зі ступенем злоякісності раку молочної залози. Наукова логіка дослідження побудована навколо інтеграції кількох взаємопов'язаних рівнів: макрофагального та мастоцитарного компонентів, системних і локальних цитокінових сигналів, матриксцелюлярних генів SPP1 і SPARC та їх білкових продуктів OPN і ON, а також регуляторних мікроРНК miR-26a-5p, miR-155-5p і miR-18a-5p. Застосування зазначеного підходу відповідає сучасним

тенденціям щодо переходу від аналізу окремих маркерів до вивчення мережевої організації пухлинного мікрооточення.

Особливої уваги заслуговує акцент на просторовій гетерогенності мікрооточення. Важливим внеском роботи є диференційований аналіз експресії молекулярних факторів у пухлинному та стромальному компартментах. Авторка обґрунтовано доводить, що за ідентичного рівня експресії топографія маркера визначає кардинально різні механізми міжклітинної комунікації та має протилежне клініко-біологічне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Дисертаційна робота виконана у відділі цитоморфології та молекулярно-біологічних маркерів пухлинного росту Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України в межах планових науково-дослідних робіт за темами «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022–2023, номер державної реєстрації 0122U201203) та «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2024–2028, номер державної реєстрації 0118U005468).

Наукова новизна одержаних результатів

Наукова новизна роботи визначається насамперед комплексним характером дослідження. У межах однієї клінічної моделі поєднано морфологічну оцінку двох мієлоїдних популяцій клітин, кількісне визначення їх топології та функціонального стану, аналіз циркулюючих і локальних цитокінів, експресії матрицелюлярних генів, а також біоінформатичну й експериментальну характеристику регуляторних мікроРНК.

Авторкою показано, що мастоцитарний компонент раку молочної залози не може бути адекватно охарактеризований лише за чисельністю клітин. Тканина раку молочної залози характеризувалася дворазовим

збільшенням загальної щільності мастоцитів і 5,9-разовим збільшенням інтратуморальної популяції порівняно з фіброаденомою, тоді як індекс дегрануляції, навпаки, був вищим у доброякісних новоутвореннях. Встановлено незалежність змін кількості, топології, дегрануляції та зрілості мастоцитів, а також їх різноспрямовані асоціації з категоріями T і N, ступенем диференціювання, молекулярним підтипом та рецепторним статусом.

Суттєвими є результати щодо вивчення макрофагального компонента раку молочної залози. Виявлено просторову неоднорідність CD68⁺ - і CD163⁺ -клітин, підвищення загальної CD68⁺ -інфільтрації при II стадії, T2 та N⁺ , а також 3,6-разове збільшення кількості CD163⁺ -макрофагів у низькодиференційованих пухлинах. Зниження співвідношення CD68⁺ /CD163⁺ у G3-новоутвореннях і базальному молекулярному підтипі обґрунтовано інтерпретується як відносне збагачення мікрооточення CD163⁺ -субпопуляцією, а не як пряме співвідношення фенотипів M1/M2.

Важливою складовою новизни є ідентифікація топологічно залежного зв'язку остеопонтину (OPN) з імунною компонентою. Висока стромальна експресія OPN асоціювалася зі збільшенням CD163⁺ -макрофагів у 2,17 раза, зменшенням CD68⁺ -клітин у 2,06 раза та зниженням співвідношення CD68⁺ /CD163⁺ . Для мастоцитів виявлено іншу, але також просторово залежну закономірність: висока паренхіматозна експресія OPN супроводжувалася накопиченням інтратуморальних клітин і зменшенням стромальної субпопуляції, тоді як високий рівень OPN у стромі був пов'язаний зі збільшенням загальної та стромальної мастоцитарної інфільтрації. Незалежно від локалізації високий рівень OPN асоціювався з посиленням дегрануляції мастоцитів.

Цікавими є результати щодо розбіжностей між транскриптним і білковим рівнями. У власній когорті експресія *SPP1* і *SPARC* на рівні мРНК зростала при T2 і N⁺ та була найвищою при базальному підтипі, тоді як білкові рівні OPN і остеонектину (ON) не залежали від розміру первинної

пухлини, але були вищими при N⁺ і низькому ступені диференціювання. Окремо встановлено асоціацію ядерної локалізації OPN із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів, G3, високим Ki-67 та відсутністю ER і PR.

Біоінформатичний блок дозволив доповнити експериментальні дані аналізом регуляторних мереж miR-26a-5p, miR-155-5p та miR-18a-5p. Виявлено спільні й унікальні гени-мішені, залучені до цитокінового сигналіngu, PI3K/АКТ- та TGF- β -залежних шляхів, ангіогенезу і ремоделювання позаклітинного матриксу. Для miR-155-5p та miR-18a-5p встановлено виражені асоціації з деконволюційно оціненими популяціями макрофагів, а у власному матеріалі експресія miR-26a-5p була пов'язана з N⁺, HER2/neu-позитивним статусом та високим Ki-67.

Теоретичне та практичне значення роботи

Теоретичне значення одержаних результатів полягає у поглибленні уявлень про стромально-імунне мікрооточення як багаторівневу систему, в якій клітинні, гуморальні, матриксцелюлярні та посттранскрипційні механізми формують взаємопов'язані, але не тотожні патерни. Дисертація аргументовано демонструє, що біологічна агресивність неопластичного процесу є комплексною характеристикою, яка не може бути редукована до ізольованого оцінювання поодиноких маркерів. Авторка переконливо обґрунтовує необхідність системного інтегративного підходу, який обов'язково враховує тканинну компартменталізацію експресії, специфіку функціонального стану клітинних елементів мікрооточення, а також архітекtonіку й характер міжкомпонентних асоціацій у пухлинній системі

Практичне значення полягає в обґрунтуванні доцільності комплексної оцінки показників макрофагальної та мастоцитарної інфільтрації, експресії OPN/ON, цитокінів IL-6 та IL-10 і регуляторних мікроРНК для поглибленої характеристики ступеня злоякісності раку молочної залози. Результати щодо *SPPI/SPARC* і OPN/ON використані при підготовці методичних рекомендацій «Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу

раку молочної залози». Запропонований інтегральний патерн має перспективу подальшої валідації як складова прогностичних моделей, однак його клінічне застосування потребує незалежного підтвердження.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій

Достовірність результатів забезпечується достатнім обсягом клінічного матеріалу та поєднанням взаємодоповнювальних методів. Дослідження виконано на операційному матеріалі 134 хворих на рак молочної залози I–II стадій; групу порівняння становив матеріал 30 пацієнток із фіброаденомою. Відсутність неоад'ювантного лікування до операції зменшує ризик терапевтично індукованих змін досліджуваних показників.

Методичний комплекс включає гістологічні та гістохімічні методи, імуногістохімію з оцінкою H-Score й оптичної густини, кількісне визначення CD68⁺ - і CD163⁺ -клітин на одиницю площі, ELISA для IL-6 та IL-10, кількісну ПЛР у реальному часі для генів і мікроРНК, а також широкий набір біоінформатичних платформ — HPA, GEPIA3, TCGA/GTEx, miRNet 2.0, InteractiVenn, ImmReg та UALCAN. Для аналізу імунної інфільтрації в ImmReg використано кілька незалежних алгоритмів деконволюції, що підвищує надійність біоінформатичної частини.

Статистичну обробку здійснено з урахуванням характеру розподілу даних із застосуванням параметричних і непараметричних критеріїв. Важливо, що в дисертації авторка не приховує відсутності статистичної значущості частини міжгрупових відмінностей і в розділі обговорення коректно розмежовує асоціативні спостереження та причинні механізми. Це підвищує наукову доброчесність інтерпретації результатів.

Структура та загальна оцінка дисертаційної роботи

Дисертацію викладено на 192 сторінках. Робота складається з анотації, списку наукових праць здобувача за темою дисертації, вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел та додатка. Чотири розділи присвячені результатам власних досліджень, окремий розділ — їх аналізу та

узагальненню. Список використаних джерел налічує 133 найменування. Робота ілюстрована 58 рисунками та 15 таблицями.

У вступі чітко сформульовано мету — ідентифікувати клітинні та молекулярні патерни стромально-імунного мікрооточення, асоційовані зі ступенем злоякісності раку молочної залози. П'ять завдань логічно підпорядковані цій меті та охоплюють мастоцитарний, макрофагальний, цитокіновий, матриксцелюлярний і посттранскрипційний рівні.

Перший розділ містить сучасний огляд літератури щодо гетерогенності раку молочної залози, ролі стромально-імунного мікрооточення, функціональної пластичності мастоцитів і пухлинно-асоційованих макрофагів, а також регуляторного значення матриксцелюлярних білків, цитокінів і мікроРНК. Позитивною рисою огляду є послідовне підведення читача від окремих компонентів до концепції інтегрованої регуляторної мережі.

Другий розділ достатньо детально описує дизайн дослідження, клініко-патологічну характеристику когорти, біоінформатичні ресурси, гістохімічні та імуногістохімічні методи, імуноферментний аналіз та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі і статистичний аналіз. Обсяг і різноплановість методичного інструментарію відповідають поставленим завданням.

У третьому розділі послідовно розкрито кількісні, топологічні та функціональні характеристики мастоцитів. Важливим є розмежування щільності інфільтрату, локалізації, дегрануляції та зрілості, оскільки ці характеристики не продемонстрували повної взаємозалежності. Саме такий підхід дозволив виявити просторовий перерозподіл мастоцитів у зв'язку з T, N і G та показати, що функціональна активність клітин не є прямим наслідком їх кількості.

Четвертий розділ присвячено пухлинно-асоційованим макрофагам. Авторка показала, що збільшення загальної CD68⁺-інфільтрації супроводжується зростанням поширеності раку молочної залози, тоді як G3 і

базальний підтип характеризуються відносним збагаченням CD163⁺ - компонентою. Методологічно правильним є застереження, що співвідношення CD68⁺ /CD163⁺ не можна автоматично ототожнювати зі співвідношенням M1/M2.

П'ятий розділ об'єднує цитокіновий і мікроРНК-регуляторний рівні. Самостійна стратифікаційна здатність сироваткових IL-6 та IL-10 виявилася обмеженою, однак їх зв'язок із макрофагальною інфільтрацією був виразним. Найбільш інформативною є саме інтеграція системного та локального рівнів цитокінів із морфологічною оцінкою CD68⁺ - і CD163⁺ -клітин. Біоінформатичний аналіз мікроРНК логічно доповнює експериментальну частину й формує підґрунтя для подальших функціональних досліджень.

Шостий розділ є одним із найбільш змістовно насичених. У ньому зіставлено дані відкритих транскриптомних ресурсів із результатами власного імуногістохімічного дослідження та кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, показано відмінності між експресією *SPP1/SPARC* на рівні мРНК та OPN/ON на білковому рівні, охарактеризовано компартмент-специфічну експресію OPN і ON та встановлено її зв'язки з клітинними компонентами мікрооточення. Саме тут найбільш переконливо реалізована центральна ідея роботи про значення просторової організації міжклітинних взаємодій.

У сьомому розділі результати не просто повторюються, а систематизуються у багаторівневій моделі. Авторка розмежовує регуляторний, клітинно-медіаторний і клініко-біологічний рівні та коректно підкреслює, що одержані асоціації не завжди визначають напрям причинного зв'язку. Висновки відповідають поставленим завданням і відображають основні результати роботи.

Повнота опублікування та апробація результатів дисертації

За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, зокрема 5 статей у наукових журналах, що індексуються в міжнародних наукометричних базах Scopus та Web of Science, методичні рекомендації та 7

тез доповідей. Основні результати представлені й обговорені на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях. Тематика публікацій охоплює всі ключові складові дисертації — матриксцелюлярні гени, мастоцити, пухлинно-асоційовані макрофаги та цитокіново-матриксні взаємозв'язки.

Особистий внесок здобувача та академічна доброчесність

Здобувачка брала безпосередню участь у формуванні концепції і дизайну дослідження, опрацюванні клінічного матеріалу, виконанні основної частини експериментальних досліджень, статистичній обробці, інтерпретації результатів та підготовці наукових публікацій. Використані в дисертації ідеї, результати та тексти інших авторів супроводжуються належними бібліографічними посиланнями. За змістом поданих матеріалів підстав для сумніву в самостійному характері дисертаційної роботи немає.

Зауваження та дискусійні питання

Високо оцінюючи науковий рівень роботи, вважаю за доцільне висловити кілька зауважень і побажань, які мають переважно дискусійний характер та не впливають на загальну позитивну оцінку дисертації.

1. Функціональна інтерпретація макрофагального компонента ґрунтується переважно на маркерах CD68 і CD163. Авторка коректно зазначає обмеженість спрощеної моделі M1/M2, однак поглиблення фенотипування за допомогою мультиплексної імуногістохімії, проточної цитометрії, одноклітинного або просторового транскриптомного аналізу дозволило б точніше охарактеризувати функціональні стани пухлинно-асоційованих макрофагів.

2. Виявлені мережі мікроРНК та їх потенційних генів-мішеней мають переконливе біоінформатичне обґрунтування, проте прямої експериментальної валідації взаємодій miR-26a-5p, miR-155-5p і miR-18a-5p з ключовими мішенями у власному клінічному матеріалі не проводили. Це слід розглядати як перспективний напрям продовження роботи, а не як недолік її основного дизайну.

3. Запропонований інтегральний патерн стромально-імунного мікрооточення є концептуально цікавим, однак до його практичного використання як прогностичної панелі необхідні багатофакторне моделювання, оцінка незалежної прогностичної цінності окремих компонентів і зовнішня валідація в незалежній когорті.

4. Розбіжності між рівнями *SPP1/SPARC* на рівні мРНК та OPN/ON на білковому рівні обговорені авторкою, проте молекулярні механізми цієї невідповідності — посттранскрипційна регуляція, секреція, протеолітичний процесинг та внесок різних клітинних джерел — могли б бути розглянуті ще детальніше.

У порядку наукової дискусії хотілося б почути відповіді на такі запитання:

1. Які молекулярні механізми, на Вашу думку, можуть пояснювати вибірковий зв'язок саме стромальної експресії OPN із накопиченням CD163⁺-макрофагів, тоді як для паренхіматозної експресії такого зв'язку не встановлено?

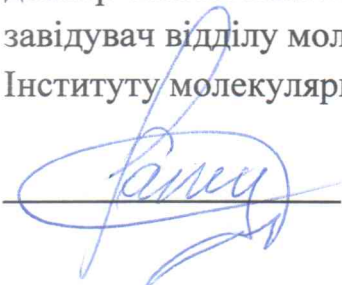
2. Яке практичне значення можуть мати встановлені у роботі асоціації між компонентами стромально-імунного мікрооточення та ступенем злякисності РМЗ?

Висновок

Дисертаційна робота Павлової Анни Олександрівни «Роль макрофагального та мастоцитарного стромально-імунного мікрооточення в оцінці ступеня злякисності раку молочної залози» є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому вирішено актуальне завдання сучасної фундаментальної онкології. Робота характеризується належним методичним рівнем, достатнім обсягом фактичного матеріалу, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням. Одержані результати обґрунтовані, а висновки в цілому відповідають поставленій меті та завданням.

За актуальністю, науковою новизною, ступенем обґрунтованості результатів, рівнем їх опублікування та оформлення дисертація відповідає вимогам чинного «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її авторка Павлова Анна Олександрівна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу молекулярної онкогенетики
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України


В. І. Кашуба

