

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

ОСТРОВСЬКОЇ ГАЛИНИ ВІТАЛІЇВНИ

на дисертаційну роботу

МУШІЯ 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»

Дисертаційну роботу присвячено ідентифікації особливостей просторової організації та встановленню кількісних характеристик колагенової матриці, асоційованих з агресивністю перебігу РМЗ.

Актуальність теми

Рак молочної залози залишається однією з найпоширеніших злоякісних пухлин у жінок, а перебіг захворювання суттєво залежить не лише від властивостей пухлинних клітин, а й від стану їхнього мікрооточення. Особливого значення набуває колагеновий матрикс: його перебудова змінює механічні властивості тканини, напрямки міграції клітин і умови для інвазії та метастазування. Водночас у повсякденній морфологічній практиці ці зміни переважно оцінюють описово, що обмежує їх використання як об'єктивних прогностичних ознак.

Дисертація О. М. Мушія спрямована на подолання цієї методичної прогалини шляхом інтеграції гістохімічної візуалізації, цифрової морфометрії та аналізу молекулярних чинників ремоделювання стромы. Встановлення кількісних характеристик колагенових волокон, пов'язаних із розміром пухлини та метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів, відповідає сучасному напрямку персоналізації онкологічної діагностики. Тому обрана тема є своєчасною, науково значущою та безпосередньо орієнтованою на розв'язання актуального завдання експериментальної онкології.

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

Дисертаційну роботу виконано у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Дослідження є складовою науково-дослідних робіт: «Верифікація ключових патоморфологічних ознак пухлинного росту як інноваційних елементів штучного інтелекту в оптимізації технології діагностики раку молочної залози» (2021–2022, № державної реєстрації 0121U110569); «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022–2023, № 0122U201203); «Особливості експресії та статус метилування генів ремоделювання стромального мікрооточення у тканині раку молочної залози» (2023–2024, № 0123U102991). У межах цих тем здобувач досліджував морфометричні та молекулярні ознаки перебудови колагенового матриксу.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів

Здобувачем отримано сукупність нових даних, які конкретизують роль колагенового каркасу в прогресії раку молочної залози. На відміну від описової оцінки строми, запропоновано відтворювану послідовність комп'ютерного виділення волокон і визначення їх довжини, ширини, прямолінійності, кута орієнтації, щільності та стромально-паренхіматозного співвідношення. Це дозволило кількісно описати фенотип дезорганізованого матриксу.

Принципово важливим новим результатом є доведення того, що зі збільшенням пухлини та наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах волокна стають коротшими й тоншими, тоді як їх щільність та окремі показники впорядкованості зростають. Побудовані регресійні моделі пояснюють істотну частку варіабельності розміру пухлини ($R^2 = 0,679$) і регіонарного метастазування ($R^2 = 0,772$). Вперше одержано інтегровану картину співвідношень між архітектонікою колагену, MMP1/MMP8/TIMP3/LOX і регуляторними мікроРНК.

Практичне значення одержаних результатів

Практична цінність дисертації визначається запропонованим алгоритмом об'єктивної оцінки колагенового матриксу на цифрових зображеннях

гістологічних препаратів. Послідовність, що включає стандартизоване гістохімічне забарвлення, сегментацію в ImageJ і CurveAlign та вимірювання довжини, ширини, прямолінійності, орієнтації, щільності й TSR, може бути відтворена у патоморфологічних лабораторіях після належної технічної стандартизації.

Встановлені параметри ширини і щільності волокон та стромально-паренхіматозного співвідношення становлять основу для подальшої перевірки кількісних критеріїв ризику регіонарного метастазування. Комплексне урахування MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX може доповнити характеристику стромального профілю пухлини. Результати є перспективними для створення навчальних наборів даних і систем підтримки клінічних рішень, однак їх використання у практиці має передбачати незалежну валідацію.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій

Обґрунтованість положень дисертації забезпечена логічною відповідністю між метою, завданнями, дизайном дослідження та способами статистичної перевірки. Основна вибірка охоплювала 120 випадків раку молочної залози I–II стадій без неoad'ювантної терапії; групи порівняння становили 30 фіброаденом і 5 зразків незміненої тканини. Додатково досліджено 42 випадки раку молочної залози II–IV стадій із даними про регіонарні або віддалені метастази.

Додатковим підтвердженням надійності результатів є їх внутрішня узгодженість: прогресування пухлинного процесу супроводжувалося взаємопов'язаними змінами кількох незалежно вимірюваних параметрів колагену, а морфометричні ознаки корелювали з експресією регуляторів ремоделювання матриксу. Це зменшує ймовірність випадкового трактування окремого показника. Наведені кількісні дані, рівні статистичної значущості та коефіцієнти моделей дають змогу перевірити аргументацію автора.

Достовірність результатів посилюється комплексним використанням гістоморфологічних, гістохімічних, імуногістохімічних, молекулярно-генетичних, цифрових морфометричних і статистичних методів. Морфометричний аналіз виконано на великій кількості волокон із застосуванням

ImageJ та CurveAlign; в імуногістохімічних дослідженнях передбачено позитивний і негативний контроль, а RT-qPCR проводили у трикратних повтореннях. Застосовані параметричні й непараметричні критерії, кореляційний та регресійний аналіз відповідають структурі даних. Висновки сформульовані в межах одержаних результатів.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є завершеним самостійним дослідженням здобувача. О. М. Мушій особисто здійснив пошук і критичний аналіз наукової літератури, опрацював клініко-патологічні характеристики випадків, сформував репрезентативну вибірку та колекцію тканинного матеріалу. Ним розроблено й апробовано алгоритм верифікації структурних змін колагенового матриксу, виконано цифрову сегментацію та морфометричний аналіз волокон.

Здобувач провів статистичне опрацювання даних, узагальнив результати, підготував таблиці й ілюстративний матеріал, сформулював основні положення та висновки. Концепцію, мету і завдання роботи визначено спільно з науковим керівником; окремі клінічні, імуногістохімічні та молекулярно-генетичні етапи виконувалися у співпраці з фахівцями установи. Особистий внесок здобувача у публікаціях зі співавторами охоплював аналіз даних, інтерпретацію результатів і підготовку рукописів.

Повнота опублікування результатів дисертації та внесок здобувача у публікації зі співавторами

Основні результати дисертації повно відображено у 18 наукових працях: 9 статтях і 8 тезах наукових конференцій, а також методичних рекомендаціях. Три статті опубліковано у фахових виданнях України, шість — у виданнях, що індексуються у Scopus та/або Web of Science. Апробація матеріалів на восьми наукових форумах забезпечила належне професійне обговорення результатів.

Тематика публікацій охоплює ключові складові дисертації — цифрову морфометрію колагену, її зв'язок із клініко-патологічними характеристиками, молекулярні чинники ремоделювання строми та прогностичні перспективи. У працях зі співавторами О. М. Мушій здійснював аналіз літератури й даних, цифрові вимірювання, статистичне опрацювання, підготовку таблиць і рисунків,

інтерпретацію результатів та написання відповідних частин рукописів. Обсяг і зміст публікацій відповідають матеріалам дисертації.

Аналіз структури роботи та загальна оцінка дисертації

За своєю структурою дисертаційна робота відповідає встановленим вимогам до кваліфікаційних наукових праць на здобуття ступеня доктора філософії. Вона містить усі необхідні структурні компоненти: анотації українською та англійською мовами, перелік умовних позначень, вступ, шість розділів, висновки, список використаних джерел і додатки. Викладення матеріалу підпорядковано послідовному вирішенню поставлених завдань: від теоретичного аналізу проблеми й формування методичного інструментарію до встановлення структурних, молекулярних та епігенетичних закономірностей ремоделювання колагенової стромы і побудови прогностичних моделей.

Текст дисертації до висновків включно займає 167 сторінок. Список використаних джерел розпочинається зі сторінки 168, додаток А — зі сторінки 187, додаток Б — зі сторінки 198. Результати роботи широко представлені у вигляді таблиць і рисунків, які є змістовно пов'язаними з текстом, відображають основні етапи дослідження та дозволяють наочно оцінити виявлені морфометричні й молекулярні закономірності.

У вступі автор розкриває сучасне розуміння позаклітинного матриксу як динамічного регулятора прогресування злоякісних новоутворень та обґрунтовує необхідність комплексного вивчення колагенового каркаса раку молочної залози. Актуальність роботи визначається відсутністю загальноприйнятих кількісних критеріїв оцінювання просторової організації колагену та недостатньою з'ясованістю молекулярних механізмів, що лежать в основі її перебудови. Мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження сформульовані коректно. Положення наукової новизни та практичного значення узгоджуються з результатами, представленими в експериментальних розділах.

Перший розділ є аналітичним оглядом літератури та охоплює чотири взаємопов'язані проблемні напрями. Автор характеризує пухлинну строму як активного учасника канцерогенезу, аналізує функції білків ремоделювання позаклітинного матриксу, розглядає колагеновий каркас як чинник агресивності

та терапевтичної чутливості пухлин, а також систематизує відомості про генетичну й епігенетичну регуляцію його просторової організації. Літературний огляд має проблемний характер і завершується визначенням питань, вирішенню яких присвячено власне дослідження.

Другий розділ містить докладну характеристику матеріалу та використаних методів. Слід відмітити, що всі застосовані методи описані чітко, лаконічно і при цьому з достатньою повнотою інформативності, яка дозволяє в повній мірі уявити побудову дослідження і, при необхідності, відтворити зазначені експериментальні підходи. Дослідження проведено із залученням зразків тканини 120 хворих на рак молочної залози та 30 пацієнток із фіброаденомою. Представлено критерії формування клінічних груп, алгоритм гістологічного й гістохімічного дослідження, порядок цифрового оцінювання колагенових волокон, методики імуногістохімічного визначення білків і RT-qPCR, засоби біоінформатичного пошуку та статистичної обробки. Проаналізовано близько 1,4 млн окремих колагенових волокон, що забезпечило достатній обсяг даних для визначення стійких морфометричних закономірностей. Методи статистичної обробки відповідають характеру експериментального матеріалу.

Розділ 3 становить морфометричний блок дисертації. У ньому розроблено алгоритм кількісного оцінювання просторової організації колагенової матриці та встановлено комплекс ознак, які відображають її дезорганізацію при раку молочної залози. Показано, що трансформація колагенової стромы охоплює одночасні зміни розмірів, форми, взаємного розташування та щільності волокон. Визначено залежність цих параметрів від клініко-патологічних характеристик новоутворення. Порівняння пухлин із різним метастатичним статусом продемонструвало, що метастазування асоціюється з формуванням окремого стромального фенотипу, якому властиві вкорочення й потоншення колагенових волокон та зміни їх просторової впорядкованості.

У четвертому розділі здійснено перехід від опису морфометричного фенотипу до визначення його молекулярних детермінант. На підставі аналізу відкритих баз даних оцінено клінічне значення фібрилярних колагенів і ключових білків ремоделювання позаклітинного матриксу. Експериментальну

частину розділу присвячено дослідженню COL1A1, COL3A1, MMP-1, MMP-8, TIMP-3 та LOX. Виявлено статистично значущі зв'язки експресії цих показників зі стадією, розміром пухлини, ступенем її злоякісності, молекулярним підтипом і наявністю метастазів. Результати розділу свідчать про те, що прогресування захворювання пов'язане не з ізольованою зміною одного маркера, а з комплексним порушенням балансу синтезу, протеолізу, інгібування протеолізу та зшивання колагену.

П'ятий розділ присвячено епігенетичному рівню регуляції стромального компонента. За результатами порівняльного аналізу незалежних наборів транскриптомних даних сформовано перелік потенційних мікроРНК-регуляторів пухлинного мікрооточення. Біоінформатична оцінка генів-мішеней засвідчила їхню функціональну належність до процесів організації позаклітинного матриксу, адгезії та міжклітинної взаємодії. Дослідження експресії відібраних мікроРНК у клінічному матеріалі дозволило встановити асоціації miR-26b-5p зі статусом регіонарних лімфатичних вузлів, miR-100-5p — із розміром пухлини та стадією захворювання, miR-142-3p — із HER2-позитивним підтипом раку молочної залози.

Розділ 6 є не механічним повторенням одержаних результатів, а їх комплексним науковим осмисленням. У ньому зіставлено морфометричні, експресійні та клініко-патологічні показники, проаналізовано можливі біологічні механізми встановлених зв'язків і запропоновано інтегровану модель перебудови колагенового каркаса пухлини. Автор обґрунтовує, що архітектоніка строми формується внаслідок координованої взаємодії синтезу колагену, його протеолітичного розщеплення, інгібування металопротеїназ і ферментативного зшивання волокон.

Оригінальним завершенням роботи є розроблення математичних моделей, спрямованих на оцінювання зв'язку морфометричних і молекулярних характеристик строми з розміром пухлини, ураженням регіонарних лімфатичних вузлів і віддаленим метастазуванням. Запропоновано комплекс показників, який у перспективі може бути використаний для доповнення традиційної клініко-морфологічної характеристики раку молочної залози. Автор цілком

обґрунтовано наголошує, що перед практичним упровадженням ці моделі мають пройти проспективну перевірку на незалежних вибірках.

Висновки дисертації сформульовано відповідно до завдань роботи. Вони відображають отримані результати, не містять необґрунтованих тверджень і підтверджуються наведеним фактичним матеріалом. Список використаної літератури репрезентує сучасний стан досліджень пухлинної стромы та позаклітинного матриксу.

Отже, структура дисертації є доцільною, а послідовність представлення матеріалу дозволяє простежити всі етапи наукового пошуку — від формулювання проблеми до розроблення інтегрованої молекулярно-морфологічної моделі. Робота має завершений характер, а її зміст свідчить про здатність здобувача самостійно проводити комплексні дослідження та розв'язувати актуальні наукові завдання в галузі біології пухлинного процесу.

Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності

За результатами ознайомлення з текстом дисертації та з урахуванням офіційного звіту про перевірку ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації або інших порушень академічної доброчесності не виявлено. Підстав для сумніву в самостійності основних результатів немає.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли зауваження, які не мають принципового характеру і не знижують її наукової цінності, а спрямовані виключно на її доповнення та вдосконалення:

Зауваження щодо оформлення:

1. У списку умовних позначень терміни розташовані в порядку їх появи у тексті. Проте під час читання роботи неодноразово виникає потреба повертатися до певних скорочень, і таке розміщення ускладнює їх пошук. Зазвичай список умовних позначень і скорочень у дисертаційних роботах оформлюється відповідно до вимог ДСТУ 8302:2015, згідно з якими всі скорочення та терміни розташовують в алфавітному порядку (спочатку кирилиця, потім латиниця).

2. У «Вступі» дисертації відсутні посилання на наукові джерела, хоча автор у цьому розділі неодноразово узагальнено апелює до «численних досліджень» у тих чи інших напрямках. Наявність конкретних бібліографічних посилань у вступній частині є обов'язковою умовою, зокрема при висвітленні стану розробленості проблеми та обґрунтуванні актуальності теми.

3. Оскільки основою для визначення кількісних параметрів компонентів строми пухлин слугував гістологічний матеріал, доцільно було б насамперед надати візуальне підтвердження виявлених змін на гістологічних препаратах та продемонструвати їх порівняння за різних ступенів злоякісності. Адже при майбутньому практичному застосуванні запропонованих автором методів на першому етапі саме гістолог буде оцінювати наявність чи відсутність зазначених змін.

4. Автором встановлено низку асоціацій між морфометричними характеристиками колагенової строми та клініко-патологічними параметрами раку молочної залози (РМЗ). Водночас у роботі недостатньо детально обговорено можливий вплив молекулярного підтипу пухлини на інформативність розроблених моделей, що могло б слугувати окремим напрямом подальших досліджень.

У порядку дискусії бажано почути відповіді на такі запитання:

1. Чи можна застосувати розроблений алгоритм до гістологічних препаратів, забарвлених іншими методами?

2. Зміни колагенової строми (зокрема, прямолінійність, довжина, ширина) є чинником, що сприяє прогресуванню пухлини, чи вони є наслідком (побічним ефектом) її розвитку і дедиференціації?

3. Чому при наростанні ознак анаплазії (злоякісності) пухлини в ній виявляється суттєво вищий рівень супресивної металопротеїнази MMP8 порівняно з MMP1, яка зазвичай асоціюється із злоякісним фенотипом?

4. Який із досліджених молекулярних показників, на Вашу думку, найповніше відображає агресивність клінічного перебігу раку молочної залози?

**Висновок щодо відповідності дисертації вимогам «Порядку
присудження наукових ступенів» до дисертації на здобуття ступеня
доктора філософії**

Дисертаційна робота **Мушія Олександра Миколайовича** на тему **«Інтегративний аналіз морфометричних та молекулярних особливостей ремоделювання колагенового матриксу раку молочної залози»** є актуальним, завершеним і самостійно виконаним науковим дослідженням, результати якого мають теоретичне значення для онкології, гістології та клітинної біології.

У дисертації вперше на значному обсязі цифрових даних комплексно охарактеризовано просторову організацію колагенової стромы раку молочної залози та встановлено її зв'язок із категоріями T і N, ступенем диференціювання, молекулярним підтипом і метастатичним статусом пухлин. Важливим результатом є визначення характерного морфометричного фенотипу прогресування пухлинного процесу, який проявляється змінами довжини, ширини, щільності та просторової орієнтації колагенових волокон.

Переконливість одержаних результатів забезпечена достатнім обсягом дослідженого матеріалу, застосуванням сучасних методів цифрової морфометрії, гістохімічного та імуногістохімічного аналізу, а також належним статистичним опрацюванням даних. Висновки дисертації відповідають поставленій меті та завданням, ґрунтуються на результатах власних досліджень і належним чином аргументовані.

Наукова новизна роботи полягає в інтеграції морфометричних характеристик колагенових волокон із показниками експресії генів фібрилярних колагенів, білків ремоделювання позаклітинного матриксу та регуляторних мікроРНК. Практичне значення одержаних результатів визначається можливістю використання встановлених ознак для об'єктивізації оцінювання колагенової стромы та створення автоматизованих інструментів цифрової онкоморфології.

Дисертаційне дослідження виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності. Основні положення роботи оприлюднені в наукових публікаціях та апробовані на фахових наукових заходах. Наведені у відгуку

зауваження переважно визначають перспективні напрями продовження дослідження і не зменшують його наукової цінності.

За сукупністю наведених характеристик 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. Її автор, Мушій Олександр Миколайович, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

**доктор біологічних наук, професор
кафедри цитології, гістології та
репродуктивної медицини
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка**

Галина ОСТРОВСЬКА

підпис проф. Островської Г.В. засвідчую: