ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Лихолат Тетяни Юріївни на тему «СТРУКТУРНО**–**ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА ВІКОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТАТУСУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ НА КЛІТИННОМУ РІВНІ»

представлену в спеціалізованувчену радуД 26.254.01 на здобуттянауковогоступеня кандидатабіологічних наук зі спеціальності 03.00.11 – **цитологія, клітинна біологія, гістологія**

1. Актуальність теми дисертації.Визначенняособливостей протікання однієї із найпоширеніших онкопатологій раку молочної залози у жінок та підбір сертифікованих, легко відтворюваних маркерів моніторингу в пост операційний період є актуальною проблемою на сьогодні. Зростаючі темпи захворюваності на цю патологію асоціюють не лише з віковими та генетичними передумовами виникнення хвороби, а й зі способом життя, харчуванням та впливом аліментарних чинників оточуючого середовища, в тому числі підвищеним вмістомекзоестрогенів.

 Успішність терапії РМЗ залежить не лише від вчасного встановлення діагнозу на ранній стадії захворювання, але й постійного моніторингу за перебігом захворювання та запобігання виникненню рецидивів. Тому, підбір інтегральних молекулярно-клітинних та біохімічних показників, які дозволяють враховувати ризики рецидивування захворювання для різних вікових груп пацієнтів є важливою частиною успішного лікування.

Отже поставлені автором мета та завдання щодо визначення особливостей біохімічно-імуногістохімічних механізмів розвитку раку молочної залози в залежності від віку, способу харчування та інших чинників зовнішнього впливу, в тому числі екзоестрогенів, є актуальними та обґрунтованими.

 Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетної тематики кафедри біофізики та біохімії Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара “Використання природних антиоксидантів та продуктів нанотехнологій в якості нейропротекторів за умов несприятливого впливу навколишнього середовища та метаболічних порушень” (№ держреєстрації 0113U003041, 2013-2014 рр.) та кафедри фізіології людини та тварин “Місцеві та центральні фізіологічні механізми адаптаційно-компенсаторних реакцій організму” (№ держреєстрації 0113U000014, 2013-2015 рр.)

2. Наукова новизна роботи.Наукова новизна роботи полягає у виявленні вираженого зв’язку між біохімічними показниками, зміна яких виявлена за канцерогенезу, гормональним та віковим станом пацієнтів. В модельному експерименті з використанням індукованого канцерогенезу молочної залози у щурів та за впливу екзоестрогенусінестролупоказано вплив аліментарних чинників мікрооточення на біохімічні процесиу тварин в залежності від віку.

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.Дисертаційна робота вирішуєактуальнунауково-практичну задачу, в якій на основі визначення цілого ряду біохімічних показників запропоновано методичні рекомендації з їх використання та можливим долученням до інтегральних характеристик перебігу раку молочної залози з метою індивідуалізації комплексного лікування даного захворювання.

На основі визначення цілогокомплексу біохімічно-імуногістохімічних показників пухлини та сироватки крові пацієнтівобгрунтовано доцільність використання цілого ряду характеристик для уточнення діагнозу та прогнозування захворювання з урахуванням як гормонального статусу, так і вікупацієнтів. Доведено в експерименті з використанням різновікових груп щурів вплив синтетичних естрогенів на потенційний розвиток раку молочної залози та підтверджено дані результати з використанням кореляційного аналізу клітинно-біохімічних та гістологічних показників в тканинах піддослідних щурів *invitro* та *invivo.*Виявлено відмінності у молодих самок та старих щурів, що свідчить про існуванняпевнихвіковихфізіологічнихумов, яківизначаютьвисокучутливість до екзогеннихестроген-подібних сполук.

В рамках дисертаційної роботи автором запропонований комплекс досліджень клітинно-біохімічного профілю за розвитку раку молочної залози в клініці та експерименті може суттєво поглиблювати як фундаментальні так і практичні підходи у вирішенні проблем діагностично-прогностичного аспекту при лікуванні даного захворювання з урахуванням вікових особливостей та гормонального статусу.

4. Ступіньобґрунтованості та достовірностіположень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.Дисертанткоюпроведено експериментальнедослідження з використаннямсучаснихметодичнихпідходів, а самецитологічних, гістологічних, біохімічних, колориметричних, морфометричних, методу експериментальної онкології.. Отриманірезультатибулипроаналізовані за допомогоюсучаснихстатистичнихметодівобробкиданих. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам щодо підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, 3 розділів результатів власних досліджень, обговорення результатів, висновків, списку використаної літератури. Робота проілюстрована 19 рисунками та 19 таблицями.

Розділ 1. «Огляд літератури» містить 4 підрозділи, в яких авторомпроаналізованопоширеність захворювання на рак молочної залози, проведено порівняльний аналіз між захворюваністю, гормональним статусом та віком пацієнтів. Охарактеризовано сучасні діагностико-прогностичні показники, які використовуються для підтвердження анамнезу даного захворювання. Також проведено аналіз щодо суперечливих та не характерних біохіміко-клітинно-біологічних показників, які не завжди знаходяться в кореляційних зв’язках із захворюванням. Проведено порівняльний аналіз рецепторного статусу в клітинах не лише органу-мішені виникнення захворювання, а й івінших тканинах і органах, метаболічний статус яких може змінюватись за певними біохімічними реакціями, які корелюють із ступенем захворювання, наявністю/відсутністю метастазів і т.і. Охарактеризовано дані показники не лише в залежності від гормонального фону, а й у віковому параметрі. Фактично, проведено поліфункціональний аналіз за всіма показниками, які можуть доповнювати клінічну картину передумов та прояву захворюванняна рак молочної залози. Визначено додаткові фактори ризику, такі як наявність в раціоні харчування добавок зі вмістом екзоестрогенів, що проявляють неоднозначну дію, пов’язану з пришвидшенням виникнення захворювання, особливо при харчуванні з такими добавками в пуберантному віці. Проте слід зазначити, що огляд літератури дещо переобтяжений фактичним матеріалом і не містить у підсумку узагальнення, яке б логічно підводило до мети та завдань даної роботи.

Розділ 2. «Матеріали та методи досліджень» складається з 9 комплексних підрозділів, де детально описано умови експериментального дослідження, підбір вікових груп, протоколи визначення певних параметрів.

Однак, деякі із підрозділів не містять інформацію щодо послідовності проведення дослідження, зокрема, підрозділ 2.5. Гістохімічні дослідження розкривається однією фразою **«**Визначення ракової патології здійснювали за допомогою бінокулярного світлового мікроскопа» - такий опис методики недопустимий. Такий же мало зрозумілий опис стосується підрозділу 2.7.5 Дослідження ендотоксикозу.Як зазначено автором «Оцінку ендотоксикозу проводили за вмістом молекул середньої маси (МСМ), який визначали на підставіпрямоїспектрометріїдепротеїнізованогосупернатанта, отриманого після осадженнябілківрозчиномТХУпридовжинах хвиль254 нмі 280нм. Виражали в ум.од.» Це визначення проводилось в біологічних рідинах, в якихось зразках, виділених із певних тканин?!

В інших пунктах даного розділу також зустрічаються значні неточності у описі певних процедур.

Також суттєвим недоліком роботи в даному розділі не вказується згідно яких нормативних документів у пацієнток відбирали матеріал для дослідження:відсутні посилання на директиви та нормативні акти біотичного комітету.

Незважаючи на зауваження до експериментального розділу Матеріали та методи дослідження,в цілому, наведені методичні комплексні прийоми підходять для вирішення поставлених мети та задач. Кількість матеріалу, що досліджувався, його методична обробка, та в переважній більшості. статистичні підрахунки дозволяють вважати висновки роботи достовірними.

«Результати власних досліджень» складаються з 3 розділів:

Розділ 3 присвячено біохімічним показникам, визначеним в сироватці крові та тканині з новоутворенням на рак молочної залози, за якими автором їх віднесено до маркерів реабілітаційного процесу в пост терапевтичний період.

У розділі оксидантно-прооксидантний баланс у тканинах молочної залози в таблиці 3.3 наводяться показники, які помічаються як такі, що мають вірогідні відмінності, однак для деяких із них це не вірно. Як приклад, для ТБКАП, де вказано, що для тканини, що оточує пухлину та пухлинної тканини є достовірна різниця, однак насправді такої не існує, не зважаючи на велику вибірку масивів порівнюваних показників (f=52). Згідно статистичного аналізу Т-критерій повинен мати значення >2, тоді як за підрахунку виявлено, що даний показник рівний 0,5651, що не свідчить за вірогідно значимі відмінності.

Характеризуючи оксидантний статус тканини молочної залози хворих різного віку, що мають метастази у реґіонарні лімфовузли автором стверджується, що у відповідь на пошкодження матриксу, клітини активуютьдві паралельніпрограми: (1) послаблення окисногометаболізму глюкози для зменшення виробництвамітохондріальних АФК і(2) підвищення антиоксидантноїздатності додетоксикаціїАФК, що дозволяє їм знизитиоксидативнийстрес іпродовжитивиживання – поясніть, будь ласка, це твердження.

Порівнюючи активністьглутатіонтрансферази у пухлинахжінок у пременопаузіавтором вказується, що даний показник проявляв тенденцію до зниження. Можливо це було пов’язано з різними схемами терапії, застосованими у жінок в пременапаузі та постменапаузуальних? Це, мабуть слід винести у загальне зауваження, адже гормонозалежні та гормононезалежні пухлини підлягають різним схемам терапії, що може при визначенні біохімічних показників бути суттєвим впливом на їх рівень . Для прикладу, цисплатин-резистентні форми новоутворень пов’язують із підвищенням активності гамаглутамінтраспептидази, за рахунок чого активний метаболіт цього хіміопрепарату не проникає в клітину та не інтерколює в ДНК. То ж, подібні інтерпретації у різниці між показниками повинні співвідноситись із проведеною терапією.

Також не зрозумілим є поділ згідно конкретного віку пацієнток, у яких досліджували певні показники. Так наводяться наступні вислови щодо активності ключових ферментів в тканині пухлини та в незміненій оточуючій тканині, зокрема, як зазначає автор « Порівняння показників активності катепсину В дозволило встановити активацію ензиму в пухлинній тканині молодших жінок у 2 рази, старших жінок – на 66 % відносно значень незміненої тканини. Відмічене перевищення індекса ензиму в тканинах молодших жінок в порівнянні зі старшими пацієнтками: у незміненій тканині – на 11%, пухлині – на 33 %» - хотілося б отримати більш зрозуміле трактування, а саме стосовно гормонального статусу і, «старші або ж молодші» - це які? Подібні твердження справлять враження недбалості в описі та трактуванні одержаних величезних масивів даних. Також, не зовсім зрозумілим є опис ендотоксикації Як звучить в оригінальному тексті (ст..79) - Визначалось посилення ендогенної інтоксикації, що склало для молодших пацієнток 19 % (незмінена тканина) та 73 % (пухлина), старших пацієнток – 56 % та 85 %, відповідно. Значенняпухлинноїтканиниперевищувалипоказниктканини, щооточуєпухлину, на 27 % (підгрупа ІБ) та 22 % (підгрупа ІІБ). Показникижінок в пременопаузібуливищими, ніж у жінок в постменопаузі, на 9 % (незмінена тканина) та 13 % (пухлина).» Така недбалість суттєво знижує значимість отриманих результатів. Можливо, автор щось інше мала на увазі?!

Розділ 4 присвячено визначенню імуногістохімічних маркерів раку молочної залози в біоптатах, отриманих від пацієнток різних вікових груп та різного гормонального статусу.В даному розділі пропонується нова назва рецептора ІІ типу до епідермального фактора росту, а саме рівень епідермального фактору зростання Her-2/Neu. Такожне наведено зрозумілу класифікацію щодо імуногістохімічного визначення різних показників в таких одиницях як 1-100, 101-200 і т.д Це йде мова про кількість забарвлених клітин певними антитілами в полі зору? Поясність для прикладу, що означає вислів «Сигнал силою рангом 61 – 100 не спостерігався в дослідних зразках» Або ж наступний вислів «Для детермінації механізмів проліферативних процесів, що залежать від сили сигналу рецепторної відповіді, проведена її оцінка в тканині молочної залози за наявності метастазів.» Категорично не зрозуміло, про що тут йде мова!

Наведені результати імуногістохімічного визначення різних біомолекул, які вважаються маркерними при захворюванні на рак молочної залози не достатньо проаналізовані, що надзвичайно обтяжує адекватне сприйняття матеріалу.

Розділ 5 присвячено визначенню впливу сінестролу як фактороа прогресії пухлинного росту. Дане дослідження проведено на експериментальних щурах, які поділені на групи за віковим показником. В даному розділі виявлено, що аліментарна експозиція сінестролу посилювала процесиперекисного окиснення ліпідів в організмі тварин в препубертантному періоді та статевозрілих самиць. Мав місце різний ступінь інтенсифікації пероксидації в залежності від віку та дослідного органу: максимальне перевищення контрольних показників відмічене у сироватці крові. Найбільш резистентними до дії екзоестрогенів виявились нирки. Надходження гормонального препарату з їжею викликало зміни показників прооксидантно-антиоксидантних систем в головному мозку з можливим наступним ураженням сигнальних шляхів передачі інформації. В самиць у препубертантномуперіоді в головному мозкуреакціяпрооксидантноїсистемиперевищувала силу відповіді в органах статевозрілихтварин.

Дисертаціязавершуєтьсяобговореннямрезультатів та висновками. Висновки дисертації аргументовані, відповідають меті, задачам та сучасним вимогам до проведення наукових досліджень.

Перелік використаних джерел літератури містить містить371 посилання українською та іноземними мовами.

 Таким чином, дисертація Лихолат Тетяни Юріївни ««Структурно-функціональні та вікові характеристики статусу раку молочної залози на клітинному рівні»» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних конференціях та з’їздах. Основні положення роботи знайшли своє відображення у 32 наукових публікаціях, у тому числі: 11 статей, з яких 8 у фахових виданнях у галузі біологічних наук, 20 тез та одні методичні рекомендації.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своєї 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 автор.Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

За позитивної оцінки, проведеної автором роботи можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації., про які не зазначено вище при рецензуванні певних розділів.

1.Автором в науковій новизні сміливо стверджується, що«вперше у роботі визначено зв’язок між біохімічними процесами, залученими до канцерогенезу, і гормональними станом хворих на рак молочної залози залежно від вікового критерію». На мою думку це не так, оскільки біохімічні показники враховуються за різних новоутворень, а тим паче за раку молочної залози. Потрібно було б про інші аспекти наголосити, наприклад, певна вікова категорія (постменопаузальна та гормоноактивна) і вже тут вибудовувати залежність між біохімічними показниками для цих категорій.

2.Також, в експерименті по впливу екзоестрогенів на розвиток канцерогенезу у щурів було застосовано лише один із них сінестрол, проте в роботі вказується про їхмножинність. Можливо, Вами було перевірено декілька екзоестрогенів, а більш ґрунтовні дослідження проводили саме з сінестролом?

Зустрічаються по тексту багато громіздких, стилістично невдалих та незрозумілих речень. Також виявлено деяку недбалість в описі та трактуванні власних досліджень.

