

## ВІДГУК

Офіційного опонента, кандидата медичних наук Пономарьової Ольги Володимирівни

на дисертаційну роботу Верьовкіної Наталії Олегівни на тему «Удосконалення лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози з урахуванням імунобіологічних властивостей пухлини», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.07 – «онкологія»

**Актуальність обраної теми дисертації.** Рак молочної залози (РМЗ) є одним із найпоширеніших онкологічних захворювань серед жінок у світі; численні роботи присвячені пошукам нових підходів до лікування, які базуються на сучасних знаннях у галузях експериментальної та клінічної онкології. Молекулярно-біологічна база знань поповнюється дуже швидко, та услід за нею з'являються біотехнологічні розробки, кожна з яких є ще одним кроком до перемоги над злякисними новоутвореннями. Вивчення біологічних властивостей пухлини та виявлення причин відсутності індукції протипухлинної імунної відповіді деякими підтипами РГЗ, а також дослідження змін пухлинного мікрооточення імунокомпетентними клітинами під впливом системної хіміотерапії визначає актуальність даного дослідження.

Дисертаційна робота Верьовкіної Н.О. спрямована на пошук нових прогностичних та предиктивних маркерів, з урахуванням яких можливе більш раціональне планування ад'ювантної протипухлинної терапії та покращання результатів лікування хворих на місцево-поширений рак грудної залози, що, безумовно, має наукове та практичне значення.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного інституту раку: «Оптимізувати лікування хворих на «тричі негативний» метастатичний рак грудної залози» (номер державної реєстрації 0114U001063, шифр теми ВН.14.01.07.152-14, термін виконання: 2014 – 2016 рр.) та «Оптимізувати тактику лікування хворих на метастатичний рак грудної залози прогностично несприятливих молекулярних підтипів» (номер державної реєстрації 0114U000407, шифр теми ВН. 14.01.07.173-17, термін виконання: 2016 –2018 рр.).

**Наукова новизна і теоретичне значення отриманих результатів.** Отримані нові наукові дані щодо прогностичного впливу інфільтрації стромы пухлинної тканини CD4+, CD8+ та FOXP3+ лімфоцитами на перебіг захворювання і результати лікування хворих на місцево поширений рак грудної залози.

Вперше науково доведено асоціацію поліморфізму генів CCR5, TLR-4 та TLR-2 з перебігом захворювання та ефективністю хіміотерапії у хворих на місцево поширений рак грудної залози.

Вперше визначено імунобіологічні маркери пухлинної тканини (співвідношення CD4+/CD8+ лімфоцитів та FOXP3+ лімфоцити), за

допомогою яких можна прогнозувати перебіг місцево поширеного РГЗ різних молекулярних підтипів. Визначено імунобіологічні маркери пухлинної тканини, що прогнозують ефективність хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ, та розроблено прогностичну модель визначення резистентності/чутливості до хіміотерапії.

Уперше запропоновано алгоритм прогнозування чутливості до ПХТ у хворих на місцево поширений РГЗ, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ, та вибору оптимального режиму ад'ювантної хіміотерапії (АХТ).

**Практичне значення результатів дослідження.** Для покращення результатів лікування хворих на місцево поширений РГЗ доцільно визначати поліморфізм гена CCR5 (del32): прогнозується вища ефективність хіміотерапії у разі виявлення генотипу N/del32 за геном CCR5 (del32).

Доцільно включення рівня FOXP3 + лімфоцитів у резидуальній пухлині в стандартні алгоритми стратифікації груп ризику, які включають визначення кількості уражених лімфовузлів, рівень Ki-67 та об'єм життєздатної залишкової пухлинної тканини (ОЖЗПТ) після НАХТ.

У хворих на РГЗ, які не досягли задовільного ступеня патоморфозу після НАХТ, при виборі режиму ад'ювантної терапії рекомендовано: додатково, до визначення стандартних критеріїв оцінки факторів ризику, визначати кількість стромальних CD4+ лімфоцитів та Ki-67 у резидуальній пухлині.

Застосування розробленої моделі прогнозування чутливості до хіміотерапії у пацієнтів, які не досягли задовільного ступеня терапевтичного патоморфозу після НАХТ оптимізує вибір режиму ад'ювантної хіміотерапії.

**Ступінь обґрунтованості й вірогідності положень, висновків і рекомендацій, оформлених у дисертації.** Клінічні дослідження проведені на достатній кількості (n = 111) хворих на рак молочної залози (112 хворих з вперше виявленим РГЗ ІІВ–ІІІВ стадії, яким було показане комплексне лікування за радикальною програмою. У процесі лікування одна пацієнтка вибула з дослідження через те, що після радикальної мастектомії було у неї виявлено карциносаркому. Таким чином, у статистичному аналізі враховано результати обстеження та лікування 111 пацієток). В роботі використані сучасні методи встановлення діагнозу. Усі хворі надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Це дослідження має дизайн проспективно-ретроспективного та нерандомізованого. Програма дослідження була схвалена комісією з біоетики Національного інституту раку. Крім того, автор використала сучасні методи статистики. Тому наукові положення, висновки і рекомендації автора є логічним та переконливим завершенням проведеного аналізу отриманих результатів дослідження.

**Повнота викладення матеріалів в опублікованих працях та авторефераті.** За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць, з них 8 статей у наукових фахових виданнях України (з них: 1 – в зареєстрованому в міжнародних наукометричних базах), 9 – у матеріалах і тезах конференцій та з'їздів.

Основні положення дисертації обговорювалися на: науково-практичних конференціях молодих вчених «Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології» (Київ, 2016), «Онкологія сьогодні: від діагностики до лікування» (Київ, 2017), науково-практичних конференціях з міжнародною участю: «Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин» (Яремче, 2015), «Сучасні досягнення діагностики та терапії раку грудної залози» (Київ, 2015); на XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016); IX з'їзді онкологів та радіологів країн СНД та Євразії: (Мінськ, 2016); European Society for Medical Oncology, Immuno-Oncology Symposium (Лозанна, 2015) та ESMO Congress (Мадрид, 2017).

Матеріали, розкриті в наукових публікаціях, відповідають змісту дисертаційної роботи. Особистий вклад дисертанта в опубліковані праці полягав в підборі пацієнтів, їх обстеженні, аналізі і обробці отриманих даних та написанні тексту.

Висновки та практичні рекомендації представленої наукової праці є конкретними, які витікають із результатів роботи та відповідають всім поставленим завданням. Автореферат дисертації повністю відповідає її змісту, відображає всі розробки дисертації, висновки та рекомендації.

#### **Оцінка структури дисертації.**

Дисертаційна робота написана українською мовою і складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, розділів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, який містить 122 найменування (10 кирилицею, 112 латиницею). Дисертація викладена на 151 сторінці машинописного тексту, ілюстрована 30 таблицями та 23 рисунками.

Вступ написаний відповідно до вимог Державної атестаційної комісії. У вступі автор обґрунтовує актуальність досліджуваної проблеми, розглядає описані в літературі дані про розповсюдженість РГЗ, ефективність сучасного протипухлинного медикаментозного лікування та можливі напрямки її підвищення з урахуванням сучасної бази знань у галузі молекулярної біології та імунології пухлинного росту, що невпинно поповнюється. На основі актуальності проблеми, новизни та практичного значення в цьому розділі сформульована мета та задачі роботи. Вступ написаний лаконічно, містить необхідну інформацію, істотних зауважень не спричиняє, має незначні стилістичні погрішності.

Розділ 1 – «Сучасний стан проблеми ефективності системної терапії у хворих на місцево-поширений рак грудної залози (Огляд літератури)» присвячений не тільки аналізу ролі хіміотерапії у лікуванні місцево-розповсюдженого раку грудної залози, але й особливостям клінічного перебігу раку грудної залози залежно від молекулярно-біологічних маркерів, а також фенотипу, ролі, шляхам активації та клінічному значенню пухлина-інфільтруючих лімфоцитів при раку грудної залози, а також поліморфізму генів TLR2, TLR4 та CCR5 у хворих на місцево-поширений рак грудної залози. Розділ написаний дуже цікаво та послідовно, розкриває еволюцію

оцінки значущості прогностичних критеріїв для хворих на рак грудної залози. Істотних зауважень по матеріалах розділу немає.

Розділ 2 даної дисертаційної роботи традиційно висвітлює «Матеріали та методи дослідження», де автор приводить характеристику включених в дослідження пацієнтів, описує методи дослідження, перелічує застосовані ним методи математичного та статистичного аналізу отриманих результатів. Розділ складається з 3 підрозділів, у яких висвітлено загальну методологію роботи, дизайн дослідження, критерії включення хворих у дослідження, лікування та проспективне спостереження, дослідження молекулярно-біологічних маркерів та методи статистичної обробки даних. Розділ написаний на високому методичному рівні, по матеріалах розділу істотних зауважень немає.

Розділ 3 «Результати власних досліджень» складається з 6 підрозділів.

Підрозділ 3.1 «Загальна характеристика хворих на місцево-поширений РГЗ» присвячений аналізу вікових особливостей хворих, що включені до дослідження, стану менструальної функції, розподілу за стадіями захворювання, гістологічною структурою та імуногістохімічними характеристиками. У підрозділі є незначні текстові похибки, але в цілому підрозділ написаний детально та містить всю необхідну інформацію щодо включених до дослідження хворих. На погляд рецензента, назва підрозділу вужча за його зміст, але цей факт не впливає на цінність поданої інформації.

У підрозділі 3.2 «Особливості лімфоїдної інфільтрації у пухлинній тканині та її роль у перебігу РГЗ» детально аналізується взаємозв'язок загальноновідомих імуногістохімічних характеристик пухлини (ER, PR, Her2neu, Ki67) з клінічним перебігом процесу та окремими імунобіологічними характеристиками. Спостереження дисертанта підтверджують висновки світової літератури щодо більш високого рівню чутливості хіміотерапевтичного впливу на пухлини, які не експресують рецептори стероїдних гормонів. Проаналізовано ступінь патоморфозу та рівень Ki67 у пацієток після неoad'ювантного лікування в залежності від експресії ER та PR-рецепторів, виявлена цікава закономірність зворотнього зв'язку між рівнем Ki67 та об'ємом життєздатної пухлинної тканини після НАХТ. Найцікавіші результати отримані дисертантом при дослідженні рівню пухлина-інфільтруючих лімфоцитів та вмісту їх субпопуляцій (CD4 – стромальні та перитуморальні, CD8 – стромальні і перитуморальні, та FOXP3) та корелятивного зв'язку з рівнем Ki67 в біопсійному та операційному матеріалі відповідно до та після НАХТ. Дисертанткою було встановлено, що наявність лімфоїдної інфільтрації, ступінь її вираженості та субпопуляції лімфоцитів, з яких вона складається, відрізняються при різних молекулярних підтипах РГЗ. У підрозділі містились термінологічні та кількісні погрішності, які дисертант виправила у процесі роботи над дисертацією.

Дуже цікавий підрозділ 3.3 «Взаємозв'язок імунобіологічних маркерів пухлинної тканини з ефективністю передопераційної хіміотерапії РГЗ» містить важливі спостереження, які стосуються предиктивних факторів

перебігу місцево-поширеного раку грудної залози та ефективності антрациклін-вмісних хіміотерапевтичних режимів для НАХТ. Встановлено, що НАХТ була достовірно ефективнішою у пацієток з вираженою лімфоїдною інфільтрацією ПЛІ (+++) порівняно з пухлинами з середнім ступенем ПЛІ (++) та низьким ступенем ПЛІ (+). Складний, але послідовний статистичний аналіз проведений дисертантом, дозволив виявити зворотній кореляційний зв'язок між рівнем ОЗЖПТ та кількістю стромальних CD4+ та перитуморальних CD8+ лімфоцитів, встановити пряму кореляційну залежність між кількістю стромальних CD8+ лімфоцитів та індексом Ki 67 у залишковій пухлині після НАХТ; дисертантом не доведено самостійного впливу рівня інфільтрації FOXP3+ лімфоцитами на ризик розвитку раннього рецидиву, тоді як включення цього показника в багатофакторну логістичну модель прогнозування ризику раннього рецидиву (FOXP3, pN, Ki-67) у хворих на місцево поширений РГЗ після НАХТ покращує її прогностичну цінність порівняно з використанням кожного фактора окремо. Термінологічні та кількісні похибки дисертант виправила у процесі роботи над дисертацією.

Підрозділ 3.4 «Особливості поліморфізму генів TLR2, TLR4 та CCR5 у хворих на місцево поширений рак грудної залози» викликав найбільший інтерес. Отримані результати дослідження свідчать про те, що у хворих на РГЗ носіїв генотипу N/N за геном CCR5(del32) достовірно частіше виявляли пухлини без експресії рецепторів естрогену та прогестерону. У носіїв генотипу N/del32 за геном CCR5(del32) визначено прямий кореляційний зв'язок між проліферативною активністю пухлини та інфільтрацією строми пухлини CD4+ лімфоцитами та регуляторними FOXP3+ лімфоцитами. Зі збільшенням індексу проліферативної активності Ki-67 зростала експресія CD4+ лімфоцитів та регуляторних FOXP3 лімфоцитів. Також встановлено, що ОЗЖПТ був достовірно нижчим у пацієток з генотипом N/del32 за геном CCR5(del32) ( $p=0,04$ ), що потребує подальшого дослідження з метою можливості його використання у якості предиктивного маркера. Крім того, доведено асоціацію гену TLR2 з розповсюдженістю процесу: у носіїв генотипу GA гену TLR2 (G753A) частіше виявляли метастази в аксилярні лімфатичні вузли; цей факт дозволяє розглядати таку генетичну характеристику як доповнення до переліку прогностичних маркерів. На погляд рецензента, поповнення прогностичної та предиктивної панелей є одним з найцікавіших спостережень дисертанта.

Підрозділи 3.5 «Прогностичне значення гістологічних та імунобіологічних маркерів пухлинної тканини у хворих на місцево поширений РГЗ» та 3.6 «Прогнозування ефективності хіміотерапії у хворих на місцево поширений РГЗ» є найважливішими з точки зору клініциста.

Проведений аналіз свідчить, що при стандартизації ризик рецидивів у хворих на місцево поширений РГЗ, які отримували антрациклін - вмісну НАХТ за стандартною схемою FAC до операції, пов'язаний, в основному з 4-ма факторами: рівнем FOXP3+ регуляторних лімфоцитів у імунному інфільтраті навколо пухлини після НАХТ, індексом проліферативної активності Ki67 у резидуальній пухлині, кількістю уражених аксилярних

лімфатичних вузлів та об'ємом життєздатної залишкової пухлини (ОЖЗП). Дисертантом підтверджено на популяційному рівні для пацієнтів з місцево поширеним РГЗ, які отримували неoad'ювантну хіміотерапію за стандартною схемою FАС, що збільшення кількості уражених аксилярних лімфовузлів від 10 і більше збільшує ризик рецидиву РГЗ, порівняно з хворими, у яких не було виявлено метастазів у регіонарні лімфовузли, при стандартизації за іншими факторами ризику. Також при оцінці ефективності НАХТ було виявлено зростання ризику розвитку рецидиву РГЗ пропорційно об'єму ОЖЗПТ. У пацієнтів з місцево поширеним РГЗ, які отримували НАХТ, виявлено збільшення ризику виникнення метастазів із збільшенням показника Кі 67 у резидуальній пухлині. Було визначено збільшення ризику виникнення рецидиву захворювання із зростанням показника регуляторних FOXP3 лімфоцитів, притаманних імуносупресивному мікрооточенню пухлини, після НАХТ. Таким чином, доведено незалежний прогностичний ефект збільшення ризику метастазування РГЗ у хворих з місцево поширеним РГЗ, які отримували НАХТ, наступних показників: рівня FOXP3 регуляторних лімфоцитів у імунному інфільтраті навколо пухлини після НАХТ, індексу проліферативної активності КІ67 у резидуальній пухлині, кількістю уражених аксилярних лімфатичних вузлів та об'єму життєздатної залишкової пухлинної тканини (ОЖЗПТ).

Вперше доведено незалежне прогностичне значення FOXP3+ лімфоцитів у резидуальній пухлині після завершення НАХТ у хворих на місцево поширений РГЗ. Так, збільшення кількості FOXP3+ лімфоцитів у резидуальній пухлині підвищувало імовірність рецидиву. Цікавим є результат порівняння значущості рівню FOXP3+ лімфоцитів у резидуальній пухлині після завершення НАХТ та рівню показника Кі-67; рівень FOXP3+ перевищував за своєю значущістю рівень показника Кі-67 для стратифікації груп ризику хворих на місцево поширений РГЗ. Також було доведено доцільність включення рівня FOXP3 + лімфоцитів у резидуальній пухлині у стандартні алгоритми стратифікації груп ризику, які включають в себе визначення кількості уражених лімфовузлів, рівень Кі-67 та ОЖЗПТ після НАХТ.

Запропонована дисертантом модель досить точно прогнозує чутливість/резистентність до хіміотерапії у пацієток з місцево-поширеним РГЗ, які не досягли задовільного ступеня патоморфозу після проведеної неoad'ювантної хіміотерапії; вона може бути застосована для планування ад'ювантної терапії та вибору адекватної схеми АХТ у даної категорії хворих.

В розділі 4 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» автор послідовно обговорює результати, отримані під час проведеного дослідження.

Висновки та практичні рекомендації викладено чітко, послідовно та обґрунтовано.

**Недоліки дисертації та автореферату.**

Значний обсяг досліджень та аналітичного фрагменту роботи призвів до появи деякої кількості термінологічних та цифрових похибок, повторень фрагментів тексту та складних формулювань, які в цілому не впливали на якість, безумовну наукову значущість та практичну цінність дисертаційної роботи. В процесі підготовки дисертант виправила виявлені недоліки.

**Питання.**

**Як, на Вашу думку, співвідносяться отримані у Вашій роботі дані з існуючою на сьогодні класифікацією TNM ? Чи можливо, на Вашу думку в перспективі доповнити її імунобіологічними маркерами ?**

**Заключення.** Дисертація Верьовкіної Наталії Олегівни є завершеною працею. Отримані обґрунтовані результати, які в сукупності вирішують актуальну наукову проблему клінічної онкології – покращення результатів лікування раку молочної залози.

За своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів, дисертація повністю відповідає вимогам п. 11 “Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника” затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.013 р. № 567, а її автор Верьовкіна Наталія Олегівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія.

**Науковий співробітник відділу моніторингу  
пухлинного росту та дизайну терапії  
Інституту експериментальної патології,  
онкології та радіобіології  
імені Р.Є. Кавецького НАН України  
кандидат медичних наук**



**О.В. Пономарьова**

