

«УТВЕРЖДАЮ»  
Ректор, д.м.н., профессор РАН

А.В. Колсанов  
23 марта 2020 года

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную Наволокина Никиты Александровича на тему «Патоморфоз и механизмы клеточной гибели в культурах клеток опухолей человека и перевитых опухолях животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, представленную к защите в диссертационный совет Д 208.008.01 при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава РФ на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 - патологическая анатомия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

#### **Актуальность темы выполненной работы**

Представленная диссертационная работа посвящена одной из актуальных задач современной онкоморфологии - изучению патоморфоза опухолевых клеток животных и человека в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, под действием флавоноидсодержащих экстрактов.

Смертность от онкологических заболеваний продолжает расти и, к сожалению, современные методы лечения не всегда оказываются эффективными. Кроме того, применяемые противоопухолевые средства имеют ряд побочных действий: токсическое влияние на органы и ткани организма и развитие к ним резистентности. Поэтому поиск новых, более безопасных и эффективных лекарственных средств остается актуальным. Лекарственные средства растительного происхождения обладают минимальным количеством побочных явлений, что обуславливает приоритетность их разработки.

Несомненно, что изучение возможных воздействий лекарственных средств растительного происхождения, как на опухоль, так и на состояние организма в целом должно быть детально изучено. Одним из самых объективных и демонстративных методов изучения таких воздействий является морфологический метод. В литературе имеются публикации, посвященные данному разделу морфологии, но они не полностью раскрывают такие проблемы, как роль и значения аутофагии, механизмы реализации апоптоза в опухолевых клетках под действием флавоноидсодержащих экстрактов и т.д. Решению этих актуальных задач и посвящена работа Н.А. Наволокина.

### Научная и практическая ценность диссертации

В проведенном диссертационном исследовании представлены приоритетные научные результаты, имеющие важное фундаментальное и прикладное значение. На основании анализа полученных морфологических данных о развитии аутофагии в опухолевых клетках, под действием флавоноидсодержащих экстрактов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, сформулирована научно-теоретическая концепция о роли аутофагии в развитии резистентности опухолевых клеток к воздействию.

Впервые в экспериментах на клеточных культурах опухолей человека (Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарцином молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карцином почки A498, Сакi-1, Sn12c, рака шейки матки HeLa) установлено, что снижение количества опухолевых клеток, их гибель путем некроза или апоптоза, а также появление или блокирование образования аутофагосом зависят от концентрации флавоноидсодержащего экстракта аврана (Патент РФ № 2018105419).

Установлено, что морфологические признаки повреждения в виде вакуолизации цитоплазмы, округления формы клеток, кариорексиса, а также гибель  $0,6 \pm 0,5\%$  неопухолевых клеток почки эмбриона свиньи SPEV развиваются при действии экстракта аврана в концентрации 1,5 мг/мл., в отличие от опухолевой культуры HeLa, в которой при той же концентрации описанные морфологические изменения наблюдаются в  $41,5 \pm 5\%$ .

Установлено, что апоптоз в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов бессмертника и аврана реализуется через механизм активации каспаз (каспаза-3).

Выявлены особенности морфологии и экспрессии маркеров ангиогенеза, пролиферации, аутофагии и апоптоза (EGFR, VEGF, Ki67, Вах, Bcl-2, p53, CD95, Fas-ligand и LC3B) в клетках и тканях перевитых опухолей животных (рака почки РА, рака печени РС-1 и саркомы 45) в экспериментах *in vivo* без воздействия и после введения экстракта аврана.

Впервые определено, что в основе развития патоморфоза перевиваемых опухолей 2-3 степени (рака почки РА, печени РС-1 и саркомы 45) в 80% наблюдений лежит апоптоз опухолевых клеток, развивающийся под влиянием экстракта аврана (Патент РФ №2519769). Особенностью патоморфоза опухоли мезенхимального происхождения саркомы 45 является разрастание стромы опухоли без признаков предшествующего некроза, а опухоли эпителиального происхождения (рака почки РА) – появление гигантских клеток.

Установлено, что патоморфоз 2-3 степени, развивающийся в перевитых опухолях при применении экстракта аврана, не сопровождается развитием выраженных дистрофических и некротических процессов в паренхиме внутренних органов и веществе головного мозга (Патент РФ № 2578440).

Выявлено, что у самцов белых беспородных крыс с перевитыми опухолями (рака почки РА, печени РС-1 и саркомы 45) к концу эксперимента в 80% случаев происходит увеличение массы тела в среднем на 25% и размеров иммунокомпетентных органов (селезёнки, перибронхиальных и мезентериальных лимфатических узлов) в отличие от группы сравнения.

Определено, что морфологическим критерием и предиктором развития резистентности клеток опухоли к воздействию флавоноидсодержащего экстракта аврана является экспрессия белка LC3В – маркера аутофагии. Также, установлено, что аутофагосомы в опухолевых клетках рака шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 не образуются при адресной доставке экстракта аврана в клетку за счет его микрокапсулирования.

#### **Связь темы с планами соответствующих отраслей науки**

Работа Н.А. Наволокина выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы кафедры патологической анатомии и кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России «Поиск, разработка и доклинические испытания *in vivo* и *in vitro* фармацевтических биологически активных композиций, содержащих биофлавоноиды», номер гос. регистрации И131114161615, а также при финансовой поддержке программы «Умник», в рамках госзадания Минздрава РФ на тему: «Разработка препаратов на основе флавоноидсодержащих экстрактов лекарственных растений», стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2016-2018 годы, при финансовой поддержке РФФИ (2018, 2019 год) и мегагранта Правительства РФ №075-15-2019-1885 (2019, 2020 год).

#### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнения. Используемые в работе методические подходы адекватны поставленным цели и задачам исследования, в диссертационной работе применен комплекс классических и современных гистологических, морфометрических, иммуногистохимических и культуральных методов исследования с использованием современного научного оборудования исследовательского класса (проточный цитофлуориметр, флуоресцентный, конфокальный и электронный микроскопы, микровизор медицинский), при этом методы дополняют друг друга.

В работе применен большой набор иммуногистохимических маркеров, что позволило детально охарактеризовать морфологическое состояние клеток, как без патологии, так и опухолевых клеток животных и человека в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в норме и после воздействия флавоноидсодержащими экстрактами. С помощью морфометрических методов на гистологических препаратах, окрашенных с помощью

иммуногистохимических маркеров различными антителами, проведена количественная и полуколичественная оценка пролиферации, ангиогенеза, апоптоза и аутофагии в опухолевых клетках

В работе использованы нелинейные белые крысы, в каждой экспериментальной группе число животных достаточно с точки зрения, как биоэтики, так и получения достоверных результатов.

С учетом variability полученных показателей автором обоснованно использованы современные статистические методы. При анализе фактического материала нормальность распределения оценивалась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения показателей, полученных в исследовании при их параметрическом распределении, но без равенства дисперсий, автором был использован критерий Крамера-Уэлча (T). Данный метод допускает множественные сравнения в группах (Welch B.L., 1951; Гржибовский А.М., 2008). При непараметрическом распределении данные автор проверял на возможность множественных сравнений критерием Краскела-Уоллиса, а значимость различий между конкретными группами определял при помощи критерия Манна-Уитни (U/Z-критерий). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовался автором для выявления и оценки корреляционных связей (Гланц С., 1998).

Результаты, полученные автором, можно рассматривать как достоверные и значимые, а на основании представленного объёма морфометрических данных можно говорить о репрезентативности исследования и возможности экстраполяции результатов на генеральную совокупность.

Структура диссертации традиционна. Работа написана хорошим литературным языком, иллюстрирована достаточным количеством микрофотографий, графиков и таблиц.

Сформулированные автором выводы достоверны, полностью соответствуют задачам и логически следуют из результатов, полученных в ходе исследования. Автореферат и публикации полностью отражают основные положения диссертации.

По теме диссертации опубликовано 58 научных работ, в том числе 26 – входят в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, по научным специальностям и соответствующим им отраслям науки; 16 публикаций в зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science; получено 6 патентов на изобретение и подана 1 заявка на изобретение. Опубликована глава в зарубежной монографии издательства Elsevier. Результаты исследования были доложены на многочисленных российских и международных конференциях.

### **Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов**

Теоретическая значимость данного исследования заключается в его фундаментальности, так как полученные в работе результаты расширяют представления об особенностях патоморфоза опухолевых клеток человека и животных под действием флавоноидсодержащих экстрактов, кроме того позволяет дополнить представления о механизмах гибели опухолевых клетках, под действием флавоноидов, роли аутофагии в развитии резистентности опухолевых клеток.

Результаты данного исследования имеют большое значение для патологической анатомии, клеточной биологии, цитологии, гистологии.

Рецензируемая работа имеет и практическую значимость, так как применение иммуногистохимического маркера аутофагии LC3B при оценке патоморфоза опухоли позволяет выявить случаи с началом развития резистентности и провести адекватную оценку ответа опухоли на лечение.

Результаты работы использованы в учебном процессе кафедры патологической анатомии, а также внедрены в научную работу Центра коллективного пользования НИИ Фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского, а также в учебный процесс кафедры патологии животных СГАУ им. Н.И. Вавилова; в Международном научно-образовательном центре оптических технологий в промышленности и медицине «Фотоника» ФГБОУ ВО СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Центре коллективного пользования ФГБУН ИБФРМ РАН.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Полученные автором результаты иммуногистохимического, флуоресцентного и других методов исследования, а также сформулированные на основе их анализа выводы могут быть применены для оценки патоморфоза опухолевых клеток под действием флавоноидсодержащих экстрактов и использованы в дальнейших научных исследованиях *in vitro* и *in vivo* для оценки биологических эффектов флавоноидов.

Для объективной оценки развивающихся морфологических изменений в клетках опухолевых культур под действием растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, может использоваться разработанный автором тест «живые и мертвые» при одновременной окраске йодистым пропидием и акридиновым оранжевым и применять наиболее информативные показатели, разработанные автором. При использовании витальных красителей (Хехст и др.) следует учитывать такие показатели, как: среднее количество живых клеток в поле зрения; индекс пролиферации – соотношение среднего количества живых клеток в поле зрения при воздействии экстракта, к среднему количеству живых клеток в поле зрения в контроле; индекс апоптотической активности.

Рекомендуется использовать предложенные Н.А. Наволокиным показатели для оценки эффективности лечебного патоморфоза в перевитых опухолях животных в эксперименте для оценки атрофических изменений (размеры клеток, ядра, количество клеток в поле зрения); пролиферативной активности (количество митозов, окраска на маркеры Ki67 и EGFR); аутофагии (экспрессия маркера LC3B) и апоптоза (p53, Bcl-2, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand).

Для оценки морфологических признаков резистентности опухолевых клеток к противоопухолевой терапии, по результатам диссертации Наволокина Н.А. рекомендуется использовать иммуногистохимический маркер LC3B, позволяющий установить образование аутофагосом в опухолевых клетках, являющихся предиктором ее развития.

Полученные данные можно использовать в учебном процессе для преподавания патологической анатомии, гистологии, цитологии в высших медицинских учебных заведениях, а также в программах циклов повышения квалификации и тематических семинарах.

#### **Замечания к работе**

Выводы в полном объеме отражают результаты исследования, но они перегружены цифровыми показателями и включают статистическую значимость их различий, что затрудняет их восприятие. Часть микрофотографий, на которых представлены результаты иммуногистохимического исследования (рис. 59, 107) невысокого качества вследствие выраженного фонового окрашивания. Однако эти замечания не носят принципиального характера и не влияют на высокую оценку рецензируемой работы.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Н.А. Наволокина «Патоморфоз и механизмы гибели опухолевых клеток в культурах и перевитых опухолях под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 - патологическая анатомия, 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология, является заверенной научно-квалификационной работой и содержит решение актуальной научной задачи – выявление особенностей патоморфоза и механизмов гибели опухолевых клеток в культурах и перевитых опухолях под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов. Результаты работы имеют большое теоретическое и практическое значение для патологической анатомии, для клеточной биологии, цитологии, гистологии.

По актуальности, новизне, уровню выполнения, научно-практической значимости полученных результатов работа полностью соответствует требованиям пункта 9-13 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 28 августа 2017 г. № 1024; от 01

октября 2018 г. №1168), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а соискатель Наволокин Никита Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 - патологическая анатомия, 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв на диссертацию Никиты Александровича Наволокина обсужден и утвержден на заседании межкафедральной конференции кафедр общей и клинической патологии: патологической анатомии, патологической физиологии и кафедры гистологии и эмбриологии (протокол № 9 от 20 марта 2020 года).

Заведующий кафедрой общей и клинической патологии:  
патологической анатомии, патологической физиологии  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Самарский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук по специальности  
14.03.02 - патологическая анатомия,  
профессор



Федорина Татьяна Александровна

Заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Самарский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор биологических наук по специальности  
03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология,  
заслуженный работник высшей школы РФ,  
профессор



Суворова Галина Николаевна

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89  
[info@samsmu.ru](mailto:info@samsmu.ru) (846)3321634



## В диссертационный совет Д 208.008.01

при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

В аттестационное дело Наволокина Никиты Александровича

### Сведения о ведущей организации

Полное наименование:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Сокращенное наименование:	ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России
Адрес,	443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89
Сайт:	<a href="http://www.samsmu.ru/">http://www.samsmu.ru/</a>
Электронная почта	<a href="mailto:info@samsmu.ru">info@samsmu.ru</a>
Телефон/Факс:	(846)3321634 / (846) 3332976
Фамилия, имя, отчество, учёное звание руководителя ведущей организации	Колсанов Александр Владимирович, профессор РАН, доктор медицинских наук, профессор.
Фамилия, имя, отчество, учёное звание Заместителя руководителя ведущей организации	Давыдкин Игорь Леонидович, проректор по научной работе, лауреат премии Правительства РФ, доктор медицинских наук, профессор
Фамилия, имя, отчество, учёное звание сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Федорина Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, заведующий кафедрой общей и клинической патологии: патологической анатомии, патологической физиологии.  Суворова Галина Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заслуженный работник высшей



школы РФ, заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии
--

Адрес ведущей организации: 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

Сайт: <http://www.samsmu.ru/>

Электронная почта: [info@samsmu.ru](mailto:info@samsmu.ru)

Телефон: (846)3321634 Факс: (846) 3332976

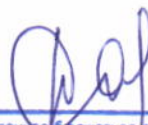
Список основных публикаций работников структурного подразделения, в котором будет готовиться отзыв по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет:

1. Забрюшинные липосаркомы: клинко-мофрологическая характеристика 30 наблюдений / Т.А. Федорина, О.И. Каганов, С.В. Полетаева, и др. // Аспирантский вестник Поволжья. - 2017. - № 1-2. - С. 178-181.
2. Федорина, Т.А. Патоморфология медуллярного рака щитовидной железы и сравнительная характеристика с-клеточной гиперплазии опухолевого и неопухолевого генеза / Т.А. Федорина, А.Д. Куклева // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. - 2017. - Т. 19. - № 2. - С. 82-83.
3. Сарбаева, Н.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н.Н. Сарбаева, Ю.В. Пономарева, М.Н. Милякова // Гены и Клетки. - 2016. - Т. 11. - № 1. - С. 9-17.
4. Анализ биосовместимости материалов для изготовления расширяющегося самоблокирующегося интрамедуллярного стержня с помощью культуры остеогенных фибробластоподобных клеток / Г.П. Котельников, О.Н. Проценко, Л.Т. Волова и др. // Фундаментальные исследования. - 2015. - № 2-23. - С. 5120-5123
5. Новые методологические подходы в анализе и синтезе морфологических данных (anatomia in silico) / Г.П. Котельников, А.В. Колсанов, В.Д. Иванова, и др. // Морфология. - 2017. - Т. 152. - № 4. - С. 74-78.
6. Изучение влияния факторов космического полета на культуру хондробластов в 3d-модели / Л.Т. Волова, В.В. Россинская, М.Н. Милякова, и др. // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2016. - Т. 50. - № 5. - С. 11-17.
7. Оценка биосовместимости базисных материалов для изготовления съемных зубных протезов на культуре дермальных фибробластов человека in vitro. / Д.А. Трунин, М.И. Садыков, Л.Т. Волова, и др. // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - № 5. - С. 140.

8. Особенности репарации аллогенных орбитальных биоимплантатов. / Е.С. Милюдин, Л.М. Цурова, Г.А. Николаева, и др. // Медицинский вестник Башкортостана. - 2017. - Т. 12. - № 2 (68). - С. 113-116.
9. Биологическая модель для исследования влияния факторов космического полёта на клетки опорных и соединительных тканей человека / Л.Т. Волова, Е.И. Пугачёв, П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. - 2015. Т. 17. - № 2-2. - С. 263-267.
10. Анализ местного лечения ожоговых ран с применением раневых покрытий в эксперименте. / А.В. Толстов, А.В. Колсанов, И.В. Новиков, И.В. Подсевалова // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. - 2016. - Т. 6. - № 3. - С. 119-125.
11. Биологическая модель для исследования влияния факторов космического полёта на клетки опорных и соединительных тканей человека. / Л.Т. Волова, Е.И. Пугачёв, П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. - 2015. - Т. 17. - № 2-2. - С. 263-267.
12. Характеристика основных клеточных дифферонов тканей дефинитивной шейки матки / Ю.В. Григорьева, Г.Н. Суворова, О.Н. Тулаева и др. // Аспирантский вестник Поволжья. - 2018. - № 1-2. - С. 12-16.
13. Некоторые аспекты морфогенеза тканей шейки матки белых беспородных лабораторных крыс накануне и в период родов / Ю.В. Григорьева, Г.Н. Суворова, С.Н. Юхимец и др. // Гены и Клетки. - 2018. - Т. 13. - № 2. - С. 67-71.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель Наволокин Никита Александрович не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Проректор по научной работе,  
лауреат премии Правительства РФ,  
доктор медицинских наук, профессор



И.Л. Давыдкин

