

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук, профессора Доросевича Александра Евдокимовича, заведующего кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России на диссертационную работу Наволокина Никиты Александровича на тему «Патоморфоз и механизмы клеточной гибели в культурах клеток опухолей человека и перевитых опухолях животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов», представленную в диссертационный совет Д.208.040.01 на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 – патологическая анатомия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность избранной темы

Выбранная Н.А. Наволокиным тема диссертации является весьма актуальной и обусловлено это, прежде всего, неутешительной динамикой роста числа онкологических заболеваний. По данным Министерства здравоохранения России, в 2018 году средний показатель по России составил 2562,1 случая на 100 тысяч граждан. По данным ведомства, за последние десять лет заболеваемость раком выросла на 40 процентов. Несмотря на то, что достигнуты значительные успехи в химиотерапии данных заболеваний, ряд важных проблем по-прежнему остается нерешенным: выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии; формирование в опухоли множественной лекарственной устойчивости - приобретение опухолевыми клетками перекрестной резистентности к цитостатикам с разными механизмами действия и внутриклеточными мишенями. Эти проблемы усугубляют друг друга и значительно снижают эффективность лечения. Кроме того, на данный момент нет широкого внедрения противоопухолевых препаратов с апоптотическим механизмом действия (Корман Д.Б., 2013).

Все эти факторы обуславливают необходимость поиска новых безопасных средств, в том числе на основе лекарственного растительного

сырья. Экстракты, содержащие флавоноиды с доказанным широким спектром действия, вполне могли бы претендовать на новые безопасные самостоятельные противоопухолевые средства, так как установлена их способность тормозить рост некоторых опухолей, а также усиливать эффективность цитостатической терапии за счет ослабления её токсического действия на здоровые клетки. Однако глубокого исследования морфологических изменений опухолевых клеток и патоморфоза опухоли, а также степени повреждающего действия на нормальные клетки и ткани организма человека и животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов ранее не проводили, также не известны и механизмы гибели опухолевых клеток под действием флавоноидов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле, изложена на 268 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, разделы материал и методы исследования, результаты собственного исследования, обсуждения полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы.

Во «Введении» отражена актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи. Автором была поставленной цель: выявить особенности патоморфоза опухолей различного гистогенеза, установить возможные механизмы гибели и резистентности опухолевых клеток в экспериментах на клеточных культурах опухолей человека (*in vitro*) и перевитых опухолях у животных (*in vivo*) под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов. В соответствие с целью были сформулированы 8 задач, последовательное решение которых позволило достичь поставленной цели.

Следует отметить тщательность, с которой проведено исследование, а именно: использование групп сравнения или контроля во всех дизайнах

эксперимента и адекватные и индивидуально подобранные методы статистики для каждого проведенного эксперимента.

В главе «Обзор литературы» проведен анализ научной литературы об истории создания противоопухолевых препаратов растительного происхождения и их механизмах действия, о преимуществах применения флавоноидов для противоопухолевой терапии, современных представлениях программированной гибели клеток и подходах оценки патоморфоза опухолей. Библиографический указатель включает 355 источников, из них 88 отечественных и 267 зарубежных.

В главе «Материал и методы исследования» подробно описаны использованные автором общепринятые методы исследования — культуральный метод, флуоресцентные методы окраски, методы проточной цитофлуориметрии, электронной микроскопии, морфологические методы, включая иммуногистохимическое исследование, статистическая обработка результатов. Автором исследованы 4 экстракта, содержащих флавоноиды; 11 культур клеток, 3 перевиваемые опухоли (саркомы SA 45, рака почки РА и печени РС-1). Эксперименты были выполнены на 220 лабораторных крысах. Из аутопсийного материала было приготовлено 2154 гистологических блока, 3558 гистологических микропрепаратов, 583 микрофотографии гистологических препаратов, 4123 микрофотографий клеточных культур, 25 электронограмм, то есть, проведен огромный объем работы, что обеспечило достоверность полученных данных.

В главе «Результаты собственных исследований» автор излагает полученные данные, иллюстрируя их 120 рисунками, содержащими 234 микрофотографии, 4 электронограммы и 55 графиков и 34 таблицы. Весь представленный материал демонстрирует полученные результаты, облегчает восприятие текстового материала и еще раз подтверждает достоверность полученных результатов.

Полученные автором данные цитологического, гистологического, гистохимического, иммуногистохимического анализа с использованием

широкого набора маркеров (Ki67, EGFR, VEGF, p53, BAX, Bcl-2, CD95 (Fas/APO-1), FAS-ligand и LC3B), данные проточной цитофлюориметрии всесторонне характеризуют не только морфологические изменения, развивающиеся в опухолевых клетках под действием флавоноидсодержащих экстрактов, но и механизмы их реализации, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.

Автором установлено, что противоопухолевая активность изученных флавоноидсодержащих экстрактов вообще, и у аврана лекарственного в частности, реализуется за счет активации апоптоза, блокирования цитопротекторной аутофагии, снижения пролиферативной активности, ангиогенеза и развития атрофических изменений в опухолевых клетках. Установлено, что апоптоз реализуется как посредством активации через митохондриальный путь (p53, Bax/Bcl-2), так и рецепторным путем (FasL/FasR), что в итоге приводит к активации каспазы 3. При изучении цитопротекторной аутофагии установлено, что ее активация, степень выраженности и блокирование зависит от концентрации экстракта.

Большой фрагмент работы Н.А. Наволокина посвящен изучению аутофагии, по поводу которой в литературе нет однозначного мнения. На основании проведенных исследований, включающих оценку уровня экспрессии генов, ассоциированных с путями клеточной гибели в клетках карциномы почки человека (линия A498), выполненных методом *in silico*, автор пришел к мнению, что аутофагия, возникающая под действием флавоноидсодержащих экстрактов, не приводит клетку к гибели, а наоборот, способствует ее выживанию в условиях противоопухолевой терапии. Развивая это положение в экспериментах на перевитых опухолях, было доказано, что аутофагия развивается в опухолевой клетке как защитный механизм в ответ на действие противоопухолевых препаратов. Автор делает важный вывод о том, что появление аутофагов может считаться признаком развития резистентности опухоли к действию препаратов из-за его недостаточной дозировки, и рекомендует в практической работе

патологоанатомических отделений использовать иммуногистохимический маркер LC3B, позволяющий установить их образование, что будет являться морфологическим признаком резистентности опухолевых клеток к противоопухолевой терапии.

Обсуждение результатов собственного исследования проведено всесторонне в сопоставлении с результатами работ отечественных и зарубежных ученых по изучаемой проблеме.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, достоверны, базируются на конкретных полученных автором результатах и выявленных патогенетических закономерностях.

Достоверность и новизна исследования полученных результатов

Достоверность полученных в ходе научной работы результатов подтверждается достаточным количеством наблюдений, совокупностью использованных методик исследования, которые соответствуют поставленным в диссертации цели и задачам. Статистическая обработка проведена детально и грамотно с использованием современных компьютерных программ.

Научная новизна исследования не вызывает сомнения и подтверждена 6 полученными патентами на изобретение.

Автором впервые в экспериментах на десяти клеточных культурах опухолей человека 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.

Установлены морфологические признаки повреждения опухолевых и неопухолевых клеток, а также частота их гибели при действии экстракта аврана, причем установлено, что одна и та же концентрация экстракта аврана приводит к гибели в 7 раз больше опухолевых клеток, чем неопухолевых. Установлено, что апоптоз в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat под влиянием

флавоноидсодержащих экстрактов через механизм активации каспаз (каспаза-3).

Выявлены особенности морфологии и экспрессии маркеров ангиогенеза, пролиферации, аутофагии и апоптоза (EGFR, VEGF, Ki67, Bax, Bcl-2, p53, CD95 (Fas/APO-1), 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. Описаны особенности патоморфоза каждой опухоли.

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, и не развивается кахексия.

Определено, что морфологическим критерием и предиктором развития резистентности клеток опухоли к воздействию флавоноидсодержащего экстракта аврана является экспрессия белка LC3B – 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.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Решаемая междисциплинарная проблема в рамках диссертации является важной для народного хозяйства, так как создает теоретическую и практическую базу для разработки нового средства для профилактики и терапии онкологических заболеваний.

Непосредственно для патологической анатомии полученные диссертантом результаты дополняют и расширяют имеющиеся в литературе сведения о морфологических изменениях в опухолевых клетках под действием растительных противоопухолевых препаратов, раскрывают механизмы гибели опухолевых клеток под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов, а также показывают значимость оценки развития цитопротекторной аутофагии в опухолевых клетках и ее роль развитии резистентности опухолевых клеток при лечении онкологических заболеваний.

Апробация работы и внедрение результатов в практику

Основные результаты исследования были представлены на российских и международных конференциях. Результаты диссертации отражены в публикациях по теме диссертации; так, опубликовано 58 публикаций, в том числе 26 работ, входящих 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.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация написана с использованием современной международной терминологии. Вместе с тем, несмотря на положительную, в целом, оценку диссертационной работы, следует отметить, что в диссертации имеются лишь отдельные неудачно построенные предложения, которые носят преимущественно редакционный характер и не уменьшают научной и практической ценности диссертационной работы. Текст автореферата

полностью отражает содержание диссертационной работы – по объёму и соответствует требованиям ВАК РФ.

Заключение

Таким образом, диссертация Наволокина Никиты Александровича, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решается актуальная проблема патологической анатомии и клеточной биологии, цитологии, гистологии: патоморфоза опухолей и механизмов гибели опухолевых клеток, а также значение аутофагии в развитии резистентности опухолевых клеток. Также разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в развитии научного направления онкоморфологии, а диссертация соответствует требованиям п. 9-13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г. (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 к кандидатским диссертациям, а соискатель Наволокин Никита Александрович достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук.

Учитывая объем проведенного исследования, методологический подход, количество публикаций в журналах рекомендованных ВАК и в зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science, новизну исследования и его значительный вклад в решение задач практического здравоохранения страны считаю, что диссертация полностью соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация на соискание степени доктора наук, изложенных в пунктах 9,10,11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 28 августа 2017 г. № 1024; от 01

октября 2018 г. №1168). Сказанное подтверждается и цитированием (646) соответствующих 158 публикаций, а индекс Хирша у Н. А. Наволокина – 14.

Считаю возможным ходатайствовать перед Министерством образования и науки Российской Федерации о разрешении представить эту же диссертацию Наволокина Никиты Александровича на тему «Патоморфоз и механизмы клеточной гибели в культурах клеток опухолей человека и перевитых опухолях животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов» к соисканию ученой степени доктора наук по специальностям 14.03.02 – патологическая анатомия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология в соответствии с пунктом 36. «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 28 августа 2017 г. № 1024; от 01 октября 2018 г. №1168).

Заведующий кафедрой патологической анатомии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Смоленский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, доктор медицинских наук по специальности 14.03.02
– патологическая анатомия, профессор

А.Е. Доросевич

Доросевич Александр Евдокимович

214019, г. Смоленск, ул. Крупской, 28 Телефон: +7 (481) 255 02 75

E-mail: patanat@smolgmu.ru

Подпись руки доктора медицинских наук, профессора, заведующего
кафедрой патологической анатомии Доросевича А.Е. заверяю:

Начальник управления кадров

ФГБОУ ВО «Смоленский государственный

медицинский университет» Минздрава России

10 марта 2020г.



Т.Ю. Филатова

Филатова Татьяна Юрьевна

**Сведения
об официальном оппоненте**

по диссертации Наволокина Никиты Александровича на тему: «Патоморфоз и механизмы гибели опухолевых клеток в культурах и перевитых опухолях под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов» на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.03.02 – патологическая анатомия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, представленной в диссертационный совет Д 208.008.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

№ п/п	Фамилия, имя, отчество	Год рождения, гражданство	Место основной работы, адрес места работы, телефон, e-mail	Учёная степень, шифр, специальность	Учёное звание	Основные работы по профилю диссертации
1	Доросевич Александр Евдокимович	1946, гражданин РФ	заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Смоленский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, Смоленская обл., г. Смоленск, 214019 ул. Крупской, 28 Телефон: 8(4812)38-	Доктор медицинских наук 14.03.02 – патологическая анатомия (медицинские науки)	Профессор по кафедре патологической анатомии	1. Маряхина В.С., Флуоресцентная диагностика опухолей молочной железы и толстой кишки. / В.С. Маряхина, Ю.С. Корнева, А.Е. Доросевич // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2019. - Т. 18. - № 2. - С. 128-134 2. Ю.С. Корнева, Применение флуориметрии для дифференциальной диагностики колоректального рака и предраковых процессов на гистологических срезах//В.С. Маряхина, А.Е. Доросевич// Вопросы онкологии. 2019, т. 65, №1. – С. 121-125. 3. Морфологические особенности раневой регенерации при местном применении рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ в эксперименте / Р.Р. Жмайлик, В.Г. Богдан, Ю.С. Корнева, А.Е. Доросевич // Вестник

			34-71 +7 (481) 255 02 75 E-mail: patanat@smolemu.ru		экспериментальной и клинической хирургии. - 2017. - Т. 10. - № 3 (36). - С. 225-230. 4. Korneva, Y.S. Investigation of malignant transformation of sporadic adenomas of colon by fluorimetry / Y.S. Korneva, A.E. Dorosevich, V.S. Maryakhina // Lasers in Medical Science. - 2017. - Т. 32. - № 2. - С. 363-367. 5. Бычков А.В., Становление и развитие начальных этапов колоректального рака / А.В. Бычков, А.Е. Доросевич, И.В. Дмитриев // Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. - 2017. - № 2. - С. 87-97. 6. Бузган, Н.Г. Влияние холино-адренорецепторов на становление и развитие немелкоклеточного рака легкого / Н.Г. Бузган, О.Ф. Семененко, А.Е. Доросевич // Вопросы онкологии. - 2016. - Т. 62. - № 5. - С. 694-700. 7. Касацкий В.В., Гистофизиологическая характеристика перитуморозной зоны рака легкого (обзор литературы) / В.В. Касацкий, А.Е. Доросевич // Уральский медицинский журнал. - 2016. - № 3 (136). - С. 25-32. 8. Корнева, Ю.С. Взаимосвязь между морфологическими характеристиками рака толстой кишки и количеством эозинофильных гранулоцитов периферической крови как один из прогностических признаков / Ю.С. Корнева, А.Е.
--	--	--	--	--	---

					Доросевич // Уральский медицинский журнал. - 2016. - № 3 (136). - С. 91-94. 9. Сравнительный анализ корреляционных взаимосвязей вегетативного нервного и сосудистого компонентов коммуникационных систем при предраке и раке молочной железы и шейки матки / А.Е. Доросевич, С.Ю. Абросимов, И.А. Бехтерева, В.В. Судилова // Уральский медицинский журнал. - 2014. - № 8 (122). - С. 10-16. 10. . Бехтерева И.А., Морфологическая, морфометрическая и иммуногистохимическая характеристика коммуникационных систем в тканях рака шейки матки./ И.А. Бехтерева, А.Е. Доросевич // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. - 2014. - Т. 26. - № 11 (182). - С. 42-51.
--	--	--	--	--	---

Представленные выше данные подтверждаю, согласен на обработку персональных данных.
Официальный оппонент, доктор медицинских наук, профессор

А.Е. Доросевич

Подпись д.м.н., профессора А.Е. Доросевича заверяю:

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО «Смоленский государственный
медицинский университет» Минздрава России

К.М.Н.

«18» февраля 2020 г.



В.С. Петров