

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

заведующей кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Оренбургский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Поляковой Валентины Сергеевны на диссертацию 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 по специальностям 14.03.02 – патологическая анатомия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы выполненной работы

Актуальность диссертационной работы Наволокина Никиты Александровича не вызывает сомнений. Это обусловлена тем, что несмотря на имеющиеся успехи в ранней диагностике и своевременном хирургическом лечении показатели онкозаболеваемости не уменьшается. Смертность от онкологических заболеваний по-прежнему занимают второе место в структуре смертности во всем мире. В лечении онкологических больных остается много нерешенных проблем: выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии; развитие лекарственной устойчивости. Имеющиеся в арсенале химиотерапевтов противоопухолевые средства оказывают повреждающее действие не только на опухолевые, но и здоровые клетки. Установлена способность биофлавоноидов усиливать эффективность цитостатической терапии за счет ослабления её токсического действия на здоровые клетки, а также способность активации апоптоза в опухолевых клетках. Однако комплексных многосторонних работ по изучению морфологических изменений опухолевых клеток, степени повреждающего действия на нормальные клетки и ткани человека и животных флавоноидсодержащих экстрактов до сих пор нет. Не изучены и механизмы развития клеточной гибели в опухолевой ткани при воздействии флавоноидсодержащих экстрактов. Выполненное автором исследование является весьма актуальным так как открывает перспективу дальнейшего активного скрининга биофлавоноидов как потенциальных противоопухолевых средств и решения новых аспектов фундаментальных исследований механизмов гибели опухолевых клеток.

Значимость для науки и практики

Представленная работа имеет несомненную научную и практическую значимость.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что установленный факт торможения пролиферации опухолевых клеток за счет их перехода в

период покоя G₀, блокирование цитопротекторной аутофагии и одновременно активации механизмов апоптотической гибели объясняет противоопухолевое действие флавоноидсодержащих экстрактов, которое существенно отличается от известного ранее действия противоопухолевых средств, содержащих алкалоиды.

Для определения выраженности патоморфоза в экспериментальной морфологии автором разработаны информативные показатели чувствительности опухолевых клеток к воздействию флавоноидсодержащих экстрактов: активность роста клеток в культуре; доля клеток в состоянии аутофагии от общего числа живых клеток в культуре, а также корреляция процента клеток в аутофагии от общего числа жизнеспособных клеток и доля мертвых клеток от общего числа клеток; индекс пролиферации, доля клеток на стадии мета-, ана- и телофазы митоза от числа живых клеток; впервые предложен показатель апоптотической константы (AC₅₀) – концентрации экстракта, при которой, по сравнению с контролем, за сутки определяется половина клеток с признаками апоптоза, а также среднелетальная концентрация (LC₅₀), при которой наблюдается 50% гибель клеток от числа клеток в контроле.

Автором доказано, что критерием низкой чувствительности опухолей к воздействию флавоноидсодержащих экстрактов является появление в опухолевых клетках аутофагосом.

Примененный автором в работе комплексный подход с использованием широкого набора морфологических методов исследования позволяет выявить особенности лечебного патоморфоза опухолей различного гистогенеза в экспериментах *in vivo* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов и может быть рекомендован для использования в практике.

Объем и структура диссертации

Диссертация Наволокина Н.А. изложена на 268 страницах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственного исследования, обсуждения полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы.

Во «Введении» автор отражает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи. Данный раздел содержит сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости работы. Здесь же сформулированы положения, выносимые на защиту, которые обоснованы грамотным методологическим подходом к исследованию. Представлена информация об апробации работы и публикациях, результатах внедрения диссертации в педагогический процесс, научную и практическую работу, отражен личный вклад автора в данную работу.

Цель и задачи диссертационной работы Наволокина Н.А. сформулированы вполне корректно, а авторский комментарий по реализации каждой из поставленных задач представляется оправданным.

В главе 1 представлен **литературный обзор**, в котором рассматриваются особенности патоморфоза опухолей, программируемая

клеточная гибель, как механизм действия противоопухолевых препаратов нового поколения. В тексте обзора выделены нерешенные вопросы и обоснована необходимость проведения подобного исследования.

Глава 2 посвящена описанию **материала и методов исследования.**

В ней приведена общая характеристика исследованного материала, в необходимом объеме дано описание использованных методов исследования, среди которых классические методы гистологического исследования, иммуногистохимический метод, культуральный метод, флуоресцентные методы окраски, методы проточной цитофлуориметрии, электронной микроскопии, а также методы статистической обработки, полностью соответствующие характеру проводимых исследований.

Исследования были проведены на 11 культурах клеток: SPEV – культура эпителиальных клеток почки эмбриона свиньи; HeLa – рак шейки матки; SKBR-3, MCF-7 - аденокарцинома молочной железы; Jurkat - Т-клеточный лимфобластный лейкоз; A549 - карцинома легкого; PC-3 - карцинома простаты; HCT-116 - карцинома толстой кишки; A498, Saki и Sn12c – карциномы почки и 3-х перевиваемых опухолях (саркомы SA 45, рака почки PA и печени PC-1).

В главах 3,4,5,6,7 представлены результаты собственных исследований.

В экспериментах *in vitro* в результате проведенного исследования автором было установлено, что морфологические признаки повреждения опухолевых клеток рака шейки матки HeLa и неопухолевых клеток почки эмбриона свиньи SPEV под действием флавоноидсодержащих экстрактов проявляются в виде вакуолизации цитоплазмы, округления формы клеток, кариопикноза и кариорексиса, а также доказано, что опухолевые клетки обладают большей чувствительностью к действию экстракта, чем неопухолевые.

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, Saki-1, Sn12c, рака шейки матки HeLa) было подтверждено, что снижение количества опухолевых клеток и их гибель происходит в основном за счет активации апоптоза (от $26,9 \pm 3,4\%$ до $96,8 \pm 5,5\%$ клеток). 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).

В экспериментах *in vitro* с помощью двойного окрашивания йодистым пропидием и акридиновым оранжевым было установлено, что при воздействии экстрактами в опухолевых клетках рака шейки матки HeLa появляются морфологические признаки аутофагосом. В дальнейшем факт образования аутофагосом под действием флавоноидсодержащих экстрактов был подтвержден с помощью иммунофлуоресцентного маркера белка LC3B на проточном цитофлуориметре. В результате анализа полученных данных

об активации и блокировании аутофагии в опухолевых клетках при действии экстракта аврана в различных концентрациях был сделан вывод о том, что развитие аутофагии в опухолевых клетках имеет цитопротекторное значение. С помощью молекулярно-генетических методов (*in silico*) было установлено, что выраженность аутофагии имеет генетически детерминированный характер, что изначально объясняет неодинаковую устойчивость к терапии разных типов опухолевых клеток.

Для объективной оценки патоморфоза опухоли под действием экстрактов, а также возможности проведения сравнительного анализа по изменению морфологии до и после воздействия в работе были выявлены особенности морфологии и экспрессии маркеров ангиогенеза, пролиферации, аутофагии и апоптоза (EGFR, VEGF, Ki67, Вах, 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.

В экспериментах *in vivo* на лабораторных крысах с перевитыми опухолями было установлено, что в основе развития патоморфоза 2-3 степени в 80% наблюдений лежит апоптоз опухолевых клеток, развивающийся под влиянием экстракта аврана. 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 и исчезновение экспрессии маркера злокачественного потенциала EGFR (при раке печени РС-1). Вне зависимости от гистогенеза опухолей особенностью патоморфоза под действием экстракта аврана было исчезновение экспрессии маркеров ангиогенеза VEGF и пролиферации Ki67, отсутствие клеток в состоянии митоза (клетки опухоли переходили в G0 фазу), а также увеличение экспрессии маркеров апоптоза (p53, Вах, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand), увеличение количества клеток с экспрессией маркера аутофагии (LC3B) при пероральном пути введения экстракта аврана и снижение количества клеток с экспрессией LC3B при внутримышечном введении экстракта аврана. Авторы высказали свое мнение о том, что увеличение экспрессии маркера LC3B в ткани опухоли на фоне проведения противоопухолевой терапии может свидетельствовать о развитии резистентности опухолевых клеток к воздействию экстракта.

Кроме того, автором установлено, что патоморфоз опухолевой ткани при введении экстракта аврана не сопровождается развитием выраженных дистрофических и некротических процессов в паренхиме внутренних органов и веществе головного мозга, а к концу эксперимента в 80% случаев увеличиваются размеры иммунокомпетентных органов (селезёнки, перибронхиальных и мезентериальных лимфатических узлов), а также масса тела в среднем на 25% в отличие от группы сравнения.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в результате проведенного комплексного морфологического исследования структурных изменений опухолевых и нормальных клеток под действием

флавоноидсодержащих экстрактов было установлено, что гибель клеток происходит преимущественно путем апоптоза, который реализуется через механизм активации каспазы-3, а морфологическим критерием и предиктором развития резистентности опухоли к противоопухолевым препаратам является экспрессия белка LC3B – маркера аутофагии.

Степень обоснованности научных положений и выводов.

Положения, выносимые автором на защиту, отражают не только патоморфоз опухолевых клеток под действием флавоноидсодержащих экстрактов, но и механизмы гибели опухолевых клеток под действием флавоноидсодержащих экстрактов.

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.

Диссертационное исследование иллюстрировано 120 рисунками, содержащими 234 микрофотографии, 4 электронограммы и 55 графиков высокого качества и 34 таблицами. Графическое представление полученных материалов наглядно подтверждает полученные результаты. Список используемой литературы включает 355 источника, из них 88 отечественных и 267 зарубежных публикаций.

Достоверность полученных результатов

Научные положения диссертационной работы обоснованы грамотным методологическим подходом к исследованию. Достоверность полученных автором результатов основана на достаточном объеме выборки, грамотном планировании экспериментальной работы, использованием как классических гистологических методов исследования, так 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).

Научная обоснованность положений и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждается также проведенным с помощью современных адекватных методов статистики корректным анализом фактического материала. Достоинством работы является использование морфометрического анализа, при котором было произведено несколько тысяч измерений, что определяет объективность проделанной работы. Результаты, полученные автором, можно рассматривать как достоверные и значимые. Выводы логично и закономерно вытекают из содержания работы.

Научная новизна исследования

Автором установлено, что морфологические признаки повреждения клеток в виде вакуолизации цитоплазмы, округления формы клеток,

кариорексиса под действием экстракта аврана в одной и той же концентрации в неопухолевых клетках развиваются в 7 раз реже, чем при воздействии на опухолевые клетки культуры HeLa. Впервые в экспериментах на 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. Установлено, что апоптоз в опухолевых клетках 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 в клетках и тканях трех перевитых опухолей животных в экспериментах *in vivo* без воздействия и после введения экстракта аврана. Выявлены особенности патоморфоза трех перевиваемых опухолей при применении экстракта аврана. Определено, что морфологическим критерием и предиктором развития резистентности клеток опухоли к воздействию флавоноидсодержащего экстракта аврана является экспрессия белка LC3B – маркера аутофагии, а 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.

Научная новизна исследования подтверждается наличием у автора 6 патентов на изобретения.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты, полученные диссертантом в ходе исследования, дополняют и расширяют имеющиеся в литературе сведения о морфологических изменениях в опухолевых клетках под действием растительных противоопухолевых препаратов, а также показывают значимость оценки развития цитопротекторной аутофагии у опухолевых клеток и ее роль развитии резистентности опухолевых клеток при лечении онкологических заболеваний.

Полученные автором сведения могут быть использованы в дальнейших доклинических и клинических исследованиях экстракта аврана, как нового противоопухолевого препарата.

Решаемая 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

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По материалам диссертации было 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.

Результаты исследования были доложены на российских и международных конференциях.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по содержанию работы Наволокина Н.А. нет. Имеются лишь замечания, касающиеся используемой автором терминологии: в патоморфологии уже давно исключена «зернистая» дистрофия как вид белковой паренхиматозной дистрофии. Классикой для обнаружения апоптоза в мире служит Tunel-метод, выявляющий деградацию хроматина эндонуклеазами, автором использованы иммуногистохимические маркеры, которые позволяют утверждать не об апоптозе, а только о готовности клеток, экспрессирующих маркер, к запрограммированной гибели. При демонстрации рисунков опыта и группы сравнения целесообразно везде представлять фото с одинаковым увеличением.

В процессе знакомства с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Корректно ли утверждать, что реализация апоптоза осуществляется через активацию каспазы-3, если автор не использовал при иммуногистохимических исследованиях каспазу-3 для выявления апоптатической доминанты?

2. Какие особенности химического состава аврана позволяют отдать ему предпочтение в лечении опухолей в проведенных доклинических исследованиях?

Указанные замечания ни в коей мере не снижают ценности рецензируемой диссертационной работы.

Заключение

По актуальности изученной проблемы, научной новизне, объему проведенных исследований, их важного значения для патологической анатомии и клеточной биологии, цитологии, гистологии диссертация Наволокина Никиты Александровича на тему «Патоморфоз и механизмы клеточной гибели в культурах клеток опухолей человека и перевитых опухолях животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов», является завершенной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям п. 9-13 «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), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор, несомненно, достоин присуждения ученой степени кандидата наук по специальностям 14.03.02 – патологическая анатомия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Однако, учитывая количество патентов на изобретения, объем и 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 народного хозяйства и здравоохранения страны считаю, что данная работа по своим показателям соответствует критериям, предъявляемым к докторским диссертациям и 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) можно ходатайствовать перед Министерством образования и науки Российской Федерации о разрешении представить 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.

Заведующая кафедрой
патологической анатомии ФГБОУ
ВО «Оренбургский
государственный медицинский
университет» МЗ, доктор
медицинских наук по
специальности 03.03.04 – клеточная
биология, цитология, гистология

Полякова В.С.

12 марта 2020 года.
460000, г.Оренбург, ул. Советская, 6
Телефон: 8(3532) 77-62-22;
e-mail: k_patanat@orgma.ru

Подпись д.м.н., профессора
В.С. Поляковой заверяю:
Ученый секретарь
ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
д.б.н., профессор

Соловух Г.Н.



Личную подпись	<i>профессора Поляковой В.С.</i>
заверяю	<i>профессора Соловух Г.Н.</i>
Начальник отдела кадров	<i>Соловух Г.Н.</i>

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	Полякова Валентина Сергеевна	1954, РФ	Заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Оренбургский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 460000, Российская Федерация, Оренбургская область, г. Оренбург, ул. Советская/ул.	Доктор медицинских наук, (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология)	Профессор	<ol style="list-style-type: none"> 1. Морфофункциональная характеристика кожи и ее производных при экспериментальном введении хелаторов эссенциальных микроэлементов / Т.В. Николаева, В.С. Полякова, Н.П. Сетко, Воронина Л.Г. // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2016. - Т. 5. - № 2. - С. 26-32. 2. Морфологические особенности заживления острых экспериментальных аденолиновых язв желудка при использовании препарата "винфар". / М.Е. Никитенко, В.С. Полякова, В.С. Тарасенко // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2015. - Т. 4. - № 3. - С. 90-91. 3. Assessment of morphological and functional changes in organs of rats after intramuscular introduction of iron nanoparticles and their agglomerates. /

			<p>М.Горького/пер. Дмитриевский, 6/45/7. Телефон: 8 (3532) 77-62-22; e-mail : k_patanat@orgma.ru</p>		<p>Е. Sizova, S. Miroshnikov, E. Yausheva, V. Polyakova // BioMed Research International. - 2015. - Т.2015. - С. 243173.</p> <p>4. Роль апоптоза, индуцируемого тяжелыми металлами, в развитии аутоиммунных заболеваний / В.С. Полякова, Т.В. Николаева, Н.П. Сетко, Л.Г. Воронина // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - № 6. - С. 272.</p> <p>5. Влияние милиацина на морфологические и биохимические параметры при экспериментальном сепсисе./ И.Н. Чайникова, В.С. Полякова, С.И. Красиков, и др. // Российский иммунологический журнал. - 2017. - Т. 11(20). - № 3. - С. 552-554.</p> <p>6. Регенерация глубоких линейных ран кожи крыс при местном воздействии метаболитами культуры bacillus subtilis 804 / В.А. Миханов, В.С. Полякова, Р.А. Абземелева и др. // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2019. - Т. 8. - № 2. - С. 55-59.</p>
--	--	--	--	--	---

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

В.С. Полякова

Подпись д.м.н., профессора В.С. Поляковой заверяю:
 Ученый секретарь
 ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
 д.б.н., профессор



Личную подпись: *В.С. Поляковой*
 заверяю: *Г.Н. Соловых*
 Начальник отдела кадров: *Г.Н. Соловых*

Г.Н. Соловых

Председателю диссертационного совета
Д 208.008.01 на базе ФГБОУ ВО «Волгоградский
государственный медицинский университет»
Минздрава России д.м.н., профессору
А.В. Смирнову

Глубокоуважаемый Алексей Владимирович.

Подтверждаю своё согласие быть официальным оппонентом диссертационной работы Наволокина Никиты Александровича «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.

Подтверждаю, что с соискателем совместных публикаций и общего места работа не имею.

Согласна на включение моих персональных данных в аттестационное дело и их дальнейшую обработку. О месте и дате защиты информирован.

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой патологической анатомии
ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России

Полякова Валентина Сергеевна

Подпись руки доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой патологической анатомии Поляковой В.С. заверяю:

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
д.б.н., профессор



Соловых Галина Николаевна

личную подпись *В.С. Поляковой*
Г.Н. Соловух
начальник отдела кадров *Г.Н. Соловух*