

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
по науке
ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России,
кандидат медицинских наук



П.В. Шегай

«23 декабря» 2024 г.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет),
доктор медицинских наук, профессор



Т.А. Демура

20 24 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

на основании решения заседания совместной конференции Центра доклинических исследований и лаборатории фармакокинетики и метаболомного анализа Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии, лаборатории медико-экологической дозиметрии и радиационной безопасности, отдела радиационной биофизики Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдела цифровой онкоморфологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного

федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация «Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук выполнена в Центре доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и в лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Якименко Владислав Андреевич, 1987 года рождения, гражданство Российской Федерации, окончил государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по специальности «Педиатрия» в 2010 году.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 178 от 24.06.2024 г. выдана в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

С 2023 г. по настоящее время В.А. Якименко работает специалистом Центра доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); с 2021 года по настоящее время работает врачом-анестезиологом-реаниматологом в частной медицинской организации общества с ограниченной ответственностью «Детская стоматология» .

Научный руководитель:

Демяшкин Григорий Александрович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией гистологии и иммуногистохимии Центра доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты», представленного на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, принято следующее заключение:

- **Оценка выполненной соискателем работы**

Диссертация Якименко Владислава Андреевича на тему «Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» выполнена в соответствии с планом научно-практических работ и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, посвящённую решению актуальной задачи в области клеточной биологии – выявлению морфофункциональных нарушений структур печени в условиях радиационно-индуцированного повреждения, вызванного локальным облучением электронами и их протекция введением аскорбиновой кислоты. Диссертация обладает научной новизной, теоретической и практической ценностью и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

- **Актуальность темы диссертационного исследования**

Лучевой гепатит развивается как при непосредственном облучении злокачественных новообразований печени, так и органов брюшной полости. Кроме того, радиационно-индуцированное повреждение печени может

возникнуть в условиях действия радиации на организм человека вследствие техногенных катастроф. Использование методов лучевой терапии при лечении онкологических пациентов регламентируется стандартными оказаниями медицинской помощи и клиническими рекомендациями, однако меры профилактики и лечения острого и хронического лучевого гепатита еще нуждаются в уточнении.

В некоторых исследованиях продемонстрировано изменение гистоархитектоники печени при использовании X- или γ -облучения. Воздействие γ -излучения в дозе 30 Гр в 5–10 % случаев приводит к поражению всей печени, при увеличении дозы до 43 Гр в 50 % случаев. Эффективной дозой при радиотерапии гепатоцеллюлярного рака считается доза выше 60 Гр, однако она увеличивает риск летальности до 76 % из-за наступления печеночной недостаточности.

Печень является одним из наиболее чувствительных к радиации органов, и ее повреждение сопровождается каскадом молекулярных реакций, таких как разрывы ДНК, прежде всего, в гепатоцитах, окислительный стресс и воспаление. Эти процессы активируют механизмы репарации ДНК, апоптоза и клеточной сенесценции, в которых ключевую роль играют такие маркеры, как каспазы, p53 и др. Бета-облучение является одним из перспективных методов современной лучевой терапии, ввиду его низкой проникающей способности и обладающие меньшим повреждающим действием на окружающие здоровые ткани. Поэтому его можно использовать как альтернативу, в том числе при интраоперационном облучении опухолей печени и органов верхнего этажа брюшной полости. Воздействие электронов на ключевые регуляторные механизмы пролиферации, дифференцировки и апоптоза гепатоцитов и других структурных компонентов печени остаются малоизученными.

В настоящее время существующие методы профилактики лучевого гепатита не обладают в должной мере радиопротективным свойством на гепатоциты, что нуждается в дальнейших исследованиях, в том числе экспериментальных.

До сих пор ведется активный поиск субстратов, которые могли бы предотвращать развитие печеночных осложнений у онкологических пациентов при радиотерапии. Одним из немногих рекомендованных лекарственных препаратов с доказанной эффективностью в отношении лучевых повреждений является амифостин, однако он вызывает ряд побочных действий. Это еще более актуализирует разработку средств-аналогов для радиопротекции печени. Так, аскорбиновая кислота уже была ранее апробирована в некоторых органных моделях в исследованиях *in vivo*. В тоже время отсутствуют комплексные исследования, доказывающие эффективность этого субстрата в печени.

Актуально проведение комплексного анализа морфологических и молекулярно-биологических изменений структур печени после воздействия электронами и введения аскорбиновой кислоты: оценки пролиферации, дифференцировки и апоптоза гепатоцитов, степени выраженности степени воспалительной реакции, активации эндогенной редокс-системы, а также поиск предикторов фиброза.

Таким образом, научная работа Якименко Владислава Андреевича посвящена актуальной проблеме – исследованию морфологических и молекулярно-биологических изменений структур печени, вызванных локальным облучением электронами и предлучевым введением аскорбиновой кислоты.

• **Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Все этапы проведенного научного исследования: постановка цели и задач, выбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической значимости, а также новизны полученных результатов, выполнены автором самостоятельно. Автором лично проведен подбор и анализ научной литературы в русле выбранной темы, разработан дизайн исследования, скомплектованы базы данных и цифровой архив изображений, к анализу привлечен комплекс современных методов клеточной биологии. В ходе реализации научной работы диссертант лично выполнял гистологическое,

морфометрическое, гистохимическое (реакции по Массону), иммуногистохимическое (на маркеры Ki67, Caspase 3, TUNEL-метод) исследования, мультиплексную иммунофлуоресцентную микроскопию (на Alpha-Smooth Muscle Actin, TGF-beta), иммуноферментный анализ (на малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, TNF- α), проводил статистический анализ полученных результатов. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

- **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой из животных – самцов крыс аутбредного стока породы Вистар (вес 220 ± 20 грамм; возраст 9–10 недель; $n=180$).

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну.

Для всех количественных данных проводилась проверка на нормальность. При нормальном распределении вычислялось групповое среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка (SE) / стандартное отклонение (SD) с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Полученные в результате подсчета данные иммуногистохимического и морфометрического исследований обрабатывались с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Сравнения проводились с использованием дисперсионного анализа. Для проверки выборки на

нормальность распределения использовался Критерий Шапиро-Уилка. Для определения корреляции использовался Н-критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна. Множественные сравнения проведены при помощи U-теста Манна-Уитни. Статистически значимыми считались результаты при $p < 0,05$.

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

- **Научная новизна результатов проведенных исследований**

В рамках исследования определены структурные и функциональные изменения печени после воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, с оценкой этапов жизненного цикла гепатоцитов, анализом системной и локальной воспалительной реакции и степени фиброзирование, а также при предлучевом введении аскорбиновой кислоты, на протяжении трёх месяцев.

На основании проведенного морфологического анализа определены степень постлучевых повреждений гепатоцитов, диапазон токсических эффектов, их адаптационная способность после локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр (СОД 30 Гр), согласно разработанной шкале морфологических изменений печени, которые характеризуются баллонной дистрофией большинства гепатоцитов, фокальной атрофии 1/3 – 2/3 части печеночных долек, частичному некрозу (менее 50% окружности большинства портальных трактов), клеточной воспалительной инфильтрацией 1/3 – 2/3 части портальных трактов, расширению и застойным явлениям в синусоидных гемокапиллярах, преимущественно на ранних сроках эксперимента.

Показано, что в ответ на локальное облучения печени электронами в СОД 30 Гр происходит индукция как системной, так и локальной воспалительной реакции, последняя из которых сохраняется в течение длительного времени, что приводит к активации фиброгенеза и усилению печеночной недостаточности,

проявляющейся повышением уровней аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и общего билирубина.

Показано, что локальное воздействие электронами на структуры печени в режиме фракционирования в СОД 30 Гр сопровождается повышением уровня малонового диальдегида и понижением концентрации супероксиддисмутазы, преимущественно на ранних сроках эксперимента.

Выявлено уменьшение количества пролиферирующих (Ki-67↓) при одновременном увеличении доли апоптотических (каспаза 3↑) гепатоцитов, сопровождающееся повышением уровней экспрессии генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3* на ранних сроках после локального облучения электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр с последующим частичным восстановлением этих параметров к третьему месяцу эксперимента.

Доказано, что локальное воздействие электронов в СОД 30 Гр приводит к резкому увеличению количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК, показанное TUNEL-методом в ранний период и полное восстановление TUNEL-сигналинга через два месяца.

Показано, что локальное облучение электронами печени в режиме фракционирования (СОД 30 Гр) характеризуется повышением концентрации ключевых участников иммунной реакции – цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- α , ИЛ-10) на системном уровне – транзиторно, а на местном – на протяжении всего времени наблюдения.

Установлены маркеры-предикторы для раннего выявления в печени отсроченных осложнений лучевой терапии, таких как радиационно-индуцированный фиброз: коэкспрессия α -SMA и TGF- β указывает на активацию механизма фиброобразования. Выявлены функциональные особенности клеток Ито и других непаренхиматозных клеток.

Доказаны радиопротективные свойства аскорбиновой кислоты в отношении структур печени, прежде всего – гепатоцитов, обеспечивающее поддержание локального внутрипеченочного гомеостаза (при сравнении с фармакологическими эффектами амифостина) за счет ее антиоксидантной

активности, проявляющейся балансом редокс-системы и субнормальных уровней маркеров этапов жизненного цикла гепатоцитов, снижением степени воспалительной реакции и фиброзированию.

Полученные данные открывают новые перспективы в понимании патогенетических механизмов лучевого гепатита, которые будут способствовать совершенствованию диагностики, подходов к лечению и профилактики данной патологии.

- **Практическая значимость работы**

По результатам проведенной научно-прикладной работы предложена шкала морфологических изменений печени, которую можно использовать при диагностике гепатитов различной этиологии.

Практический вклад работы отражается в предоставлении новых ценных данных об изменениях в структуре и функциях печени после локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр с предварительным интраперитонеальным введением аскорбиновой кислоты, которые могут быть использованы для определения оптимальных доз электронотерапии в области клеточной биологии, патологической анатомии, радиобиологии и онкологии. Эти результаты также могут способствовать разработке методов профилактики постлучевых осложнений органов брюшной полости. Дополнительно, полученные результаты настоящего исследования могут быть использованы в клинических рекомендациях для врачей-патологоанатомов, врачей-радиотерапевтов, онкологов и врачей других смежных специальностей.

- **Ценность научных работ соискателя ученой степени**

В представленных работах в рамках одного исследования на основании систематизации и анализа собственных данных и данных международных исследований реальной клинической и морфологической практики даны ответы на ряд вопросов, активно обсуждаемых в мировой научной литературе, посвящённых морфофункциональным изменениям структур печени после локального облучения электронами и введения аскорбиновой кислоты в

качестве протектора. Ценность научных работ заключается в установлении морфофункциональных и молекулярно-биологических особенностей структур печени после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, а также влияния аскорбиновой кислоты.

На основании результатов проведенного морфологического и молекулярно-биологического решена актуальная научная задача – выявлены структурные и функциональные изменения структур печени, раскрыты механизмы регуляции местного внутрипеченочного гомеостаза в условиях радиационно-индуцированного поражения, вызванного локальным воздействием электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр и влияния аскорбиновой кислоты.

- **Внедрение результатов диссертационного исследования в практику**

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Акт внедрения (использования) новой технологии б/н от 11.09.2024 г.

Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины, читаемой аспирантам по направлению подготовки / научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Акт о внедрении №494 от 11.09.2024 г.

- **Этическая экспертиза научного исследования в Локальном этическом комитете (по медицинским и фармацевтическим наукам)**

Комиссия по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных в научных целях федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации одобрила проведение научного исследования на тему «Структурно-

функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты». Выписка из протокола №25 от 10.11.2023 г.

- **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертация на тему «Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует шифру специальности 1.5.22. Клеточная биология. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 10, 13, 14 паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология: пункту 10. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов; пункту 13. Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели; пункту 14. Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды.

- **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 4 научных статьи в изданиях из RSCI и в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Оригинальные научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Университета/ВАК при Минобрнауки России, в журналах, включенных в базу RSCI:

1) Характеристика стромального компонента печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г.А. Демяшкин, В.А. Якименко, М.А. Вадюхин, Д.И. Угурчиева, С.Н. Корякин// Биомедицина. – 2024. – Т. 20, № 4. – С. 70-77. – DOI: 10.33647/2074-5982-20-4-70-77 [ВАК].

2) Морфофункциональная характеристика печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Демяшкин Г.А., Якименко В.А., Вадюхин М.А., Китиева А.А., Васильева Н.В.// Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 134-140. – DOI: 10.19163/1994-9480-2024-21-2-134-140. [ВАК, RSCI]

3) Оценка воспалительной реакции после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г. А. Демяшкин, В. А. Якименко, М. А. Вадюхин, Д. И. Угурчиева // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2024. – № 3. – С. 98-106. – DOI 10.34014/2227-1848-2024-3-98-106. [ВАК]

4) Характеристика пролиферации и апоптоза гепатоцитов после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Демяшкин Г.А., Атяшкин Д.А., Якименко В.А., Вадюхин М.А., Абуев А.А., Угурчиева Д.И.// Морфология. – 2023. – Т. 161, № 3. – С. 31-38. – DOI: 10.17816/morph.624714. [RCSI]

Оригинальные научные статьи в научных изданиях, включенных в международную, индексируемую базу данных Scopus:

1) Demyashkin, G.; Parshenkov, M.; Koryakin, S.; Skovorodko, P.; Shchekin, V.; Yakimenko, V.; Urus Khanova, Z.; Ugurchieva, D.; Pugacheva, E.; Ivanov, S.; et al. Targeting oxidative stress: the potential of Vitamin C in protecting against liver damage after electron beam therapy. Biomedicines 2024, 12, 2195. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102195> [Scopus]

Материалы научных конференций по теме диссертационного исследования:

1) Потенциал аскорбиновой кислоты в протекции острого лучевого повреждения / Паршенков М.А., Урусханова Ж.Э., Якименко В.А., Угурчиева Д.И., Муртазалиева З.М., Екатерина Н.П. // VII Международный форум онкологии и радиотерапии «Ради жизни», сборник материалов. Москва, 2024. - С. 81-82.

2) Пролиферация и апоптоз гепатоцитов крыс после локального облучения электронами / В. А. Якименко, Д. И. Угурчиева, М. А. Вадюхин, Г. А. Демяшкин // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 143-144.

Заключение

Диссертация соответствует требованиям п. 21 Положения о присуждении ученых степеней в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом от 06.06.2022 г. № 0692/Р, и не содержит заимствованного материала без ссылки на автора.

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа Якименко Владислава Андреевича «Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Заключение принято на заседании совместной конференции Центра доклинических исследований и лаборатории фармакокинетики и метаболомного анализа Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии, лаборатории медико-экологической дозиметрии и радиационной безопасности, отдела радиационной биофизики Медицинского

радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдела цифровой онкоморфологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Присутствовало на заседании: 22 человека.

Результаты голосования: «за» – 22 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 12 от 29 октября 2024 года.

Председательствующий на заседании

Доктор фармацевтических наук,
профессор, член-корр. РАН,
заместитель директора по научной работе
Института трансляционной медицины
и биотехнологии
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
имени И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Н.В. Пятигорская

Секретарь заседания

Старший научный сотрудник лаборатории
экспериментальной морфологии и цифровой патологии
Медицинского радиологического научного центра
имени А.Ф. Цыба – филиала
федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
кандидат биологических наук



И.Э. Ингель