

ОТЗЫВ

официального оппонента, Карева Вадима Евгеньевича, доктора медицинских наук на диссертационную работу Пугачевой Екатерины Николаевны на тему «Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность избранной темы

Лучевая терапия сегодня является неотъемлемой частью лечения практически всех злокачественных новообразований, однако развитие прогнозируемых осложнений такого лечения, в частности, повреждение структур яичника и нарушение овофолликулогенеза в закономерном развитии типовых патологических процессов, зачастую приводящих к преждевременной недостаточности яичников является нерешенной проблемой. Большинство методов профилактики постлучевых осложнений не всегда оказываются эффективными. В этой связи, существует необходимость в поиске радиопротекторов. Аскорбиновая кислота с ее выраженным антиоксидантным свойством, может быть перспективным кандидатом для использования в качестве радиопротектора.

Однако, для более детального анализа радиопротекторного потенциала аскорбиновой кислоты необходимы комплексные исследования с использованием молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов. Это поможет раскрытию основных механизмов регуляции интраовариального гомеостаза после воздействия электронами и введении аскорбиновой кислоты, способствовать персонализированному подбору методов радиотерапии и радиопротекции, уменьшая степень радиационно-индуцированной недостаточности яичников.

Кроме того, принимая во внимание типовой характер патологических изменений, формирующихся при естественном течении хронических диффузных заболеваний яичника, результаты, полученные в данной работе могут быть использованы в том числе для дальнейшего изучения обозначенных процессов при широком спектре нозологических форм.

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

Автор самостоятельно выполнил основные этапы диссертационной работы: постановка цели и определение задач, дизайна и методов клеточной биологии, анализ и статистическая обработка полученных результатов, обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости, основных положений и выводов. Автор лично выполнял гистологическое, морфометрическое, гистохимическое (трихромом по Массону), иммуногистохимическое (α -SMA, TGF- β , Coll-1, TUNEL-метод),

молекулярно-генетическое (маркеры PI3K/AKT/mTOR, PI3K/AKT/FOXO3a, TGF/SMAD сигнальных путей; маркеры жизненного цикла – *Ki-67*, *caspase 3*, *caspase 8*, *caspase 9*) исследования, иммуноферментный анализ (малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза). Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

Достоверность полученных в ходе выполнения диссертационного исследования данных не вызывает сомнений. 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 – самки крыс породы Вистар (вес 180 ± 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.

Таким образом, выбранные методические подходы соответствуют поставленным целям и задачам диссертационного исследования и позволяют автору сформулировать основные научные положения и выводы, объективность и достоверность которых сомнений не вызывают.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

На основании проведенного гистологического и молекулярно-биологического исследований автором впервые выявлено:

- при анализе гормонального статуса – введение аскорбиновой кислоты приводит к его сохранению, поддерживая нормальные концентрации гонадотропных гормонов, показатели овариального резерва и эстрогении при локальном воздействии электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр;

- при анализе состояния редокс-системы – предлучевое введение аскорбиновой кислоты сопровождается снижением степени оксидативного стресса и индукцией ферментов эндогенной антиоксидантной защиты в гомогенате яичников после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр согласно уровням MDA, SOD и CAT;

- при анализе повреждения ДНК – аскорбиновая кислота частично препятствует фрагментации ДНК, возникающей после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр, что показано TUNEL-методом;

- при анализе жизненного цикла – предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает апоптотическую гибель структур яичника (экспрессия *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*), индуцируя пролиферативную активность (экспрессия *Ki-67*) посредством модуляции сигнальных путей

PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, ответственных за сохранение овариального резерва и регуляцию жизненного цикла клеток гранулезного слоя. В то же время при локальном воздействии электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр активируется преимущественно внутренний путь апоптоза;

– при анализе воспалительной реакции – аскорбиновая кислота способствует подавлению экспрессии ключевых участников воспалительной реакции (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10), а также снижению количества тучных клеток (преимущественно химаза-позитивного фенотипа), наблюдаемых после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр на ранних сроках эксперимента. На третьем месяце аскорбиновая кислота приводит к активации экспрессии противовоспалительного IL-10 и преобладанию химаза-позитивного фенотипа тучных клеток, ограничивая воспалительную реакцию и фиброз в яичниках;

– при анализе фиброзирования – показано антифибротическое действие аскорбиновой кислоты в отношении радиационно-индуцированного фиброза посредством ингибирования экспрессии участников TGF/SMAD-сигнального пути, активации фибробластов и клеток эндотелия кровеносных сосудов, что способствовало снижению накопления коллагена в экстрацеллюлярном пространстве.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором

Результатами проведенного исследования подтверждены радиопротекторные свойства аскорбиновой кислоты – антиоксидантное, антиапоптотическое, противовоспалительное и антифибротическое действие при воздействии электронами, а также снижение рисков развития радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и фиброза. Подтверждено, что коэкспрессия α -SMA, TGF- β и Collagen-1 преимущественно в клетках фибробластического ряда и эндотелии кровеносных сосудов яичника является предиктором фиброгенеза. Аскорбиновая кислота способна ингибировать оба взаимодополняющих пути лучевого повреждения – прямого и косвенного; модулировать сигнальные пути PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, ответственные за сохранение овариального резерва и регуляцию жизненного цикла клеток гранулезного слоя, а также активатор фиброгенеза –TGF/SMAD путь. Аскорбиновая кислота в отдаленные сроки после облучения приводит к продукции тучными клетками химазы, разрушающей компоненты экстрацеллюлярного матрикса, что предотвращает развитие фиброза.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты о степени лучевых повреждений овариальных фолликулов после фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, а также возможности радиопротекции введением аскорбиновой кислоты

необходимо учитывать при назначении электронотерапии злокачественных новообразований органов малого таза и брюшной полости врачами-радиотерапевтами и врачами-онкологами, а также в работе врача-патологоанатома.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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.

Полнота освещения результатов диссертации в печати. Количество публикаций в журналах Перечня ВАК РФ и индексируемых в международных базах данных

Результаты, полученные в настоящем исследовании, нашли отражение в публикациях отечественных и зарубежных журналах. По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 1 научная статья в изданиях из базы данных RSCI, 2 статьи в журнале, включенном 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 издании, индексируемом в международной базе (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Оценка содержания работы, ее завершенности в целом

Диссертация выполнена в классическом стиле, состоит из введения, обзора литературы, главы, содержащей сведения о материале и методах исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, и списка использованной литературы. Работа изложена на 142 страницах, иллюстрирована 32 рисунками хорошего качества, в том числе информативными графиками и изображениями микроскопических гистологических и иммуногистохимических препаратов хорошего качества, содержит 24 таблицы, суммирующие полученные данные. Список цитируемой литературы составляет 189 источников, в том числе 23 отечественных и 166 зарубежных, опубликованных за последние несколько лет.

Во введении автором обоснована актуальность комплексного морфологического изучения патологических изменений яичника после локального облучения электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр и эффективности использования препарата аскорбиновой кислоты с целью снижения выраженности возникших морфофункциональных изменений.

В обзоре литературы автором представлены подробные сведения о методах лучевой терапии, рассмотрены аспекты радиационно-индуцированной недостаточности яичников, а также радиопротекторные эффекты некоторых препаратов.

Во второй главе подробно представлены исчерпывающие сведения о материале исследования, рассмотрены использованные методы, включающие гистологический, гистохимический, иммуногистохимический, иммуногистоморфометрический методы, иммунофлуоресцентный метод, биохимический и иммуноферментные методы, а также методы статистической обработки полученных результатов.

В главе, содержащей результаты собственных исследований автором показано, что:

- введение аскорбиновой кислоты приводит к частичному предотвращению развития признаков преждевременной недостаточности яичников на фоне воздействия электронами в СОД 30 Гр, в виде функциональных и структурных изменений: дисбаланс половых гормонов, резкое снижение числа фолликулов на всех стадиях роста и увеличение доли атретических фолликулов на ранних сроках, а также фиброгенез на поздних сроках;

- радиопротекторные свойства аскорбиновой кислоты обусловлены ее способностью к связыванию продуктов радиолиза воды (MDA) и индукции эндогенной антиоксидантной системы (SOD, CAT), что приводит к снижению уровня фрагментации ДНК (TUNEL) и клеточной гибели путем апоптоза (преимущественно внутренним, *Caspase 9*↓) и стимуляции пролиферации клеток гранулезного слоя (*Ki-67*↑) через модуляцию сигнальных путей PI3K/AKT, что снижает продукцию воспалительных цитокинов и активацию тучных клеток фолликулярного микроокружения, наиболее выраженных в группе локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр;

- введение аскорбиновой кислоты предотвращает развитие радиационно-индуцированного фиброза в яичниках посредством ингибирования сигнального пути TGF- β /SMAD4, препятствуя активации фибробластов и других клеток волокнистой соединительной ткани, оцененной по уровням α -SMA и избыточной экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллаген-1), генерируемого в ответ на воздействие локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

В главе «Заключение» осуществлено обобщение полученных результатов в сравнении с данными, полученными другими исследователями.

Выводы диссертации соответствуют цели исследования и установленным для ее достижения задачам, логично вытекают из полученных результатов.

Таким образом, диссертационная работа Пугачевой Екатерины Николаевны представляется законченным научным исследованием, выполненным автором на высоком методическом уровне. Принципиальных замечаний по работе нет. Имеющиеся немногочисленные стилистические неточности не снижают ценности работы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат диссертационной работы полностью соответствует рукописи диссертации. В автореферате отражены ключевые результаты исследования, доказывающие выносимые на защиту положения. Приведены иллюстративные материалы по результатам всех использованных автором методов исследования, а также предоставлены важнейшие результаты статистического анализа.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация Е.Н. Пугачевой не вызвала принципиальных замечаний.

В ходе изучения диссертационной работы возникли следующие вопросы:

1) По вашему мнению, какой из наиболее вероятных механизмов межклеточных взаимодействий клеток паренхимы и стромы яичника реализуется в условиях примененного радиационного воздействия?

2) Исходя из полученных результатов исследования, какие перспективные направления дальнейших научных исследований Вы видите?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Пугачевой Екатерины Николаевны на тему: «Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи современной медицинской науки – выявлено радиопротекторное действие аскорбиновой кислоты в отношении овариальных фолликулов при радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников, вызванной воздействием электронами в режиме фракционирования, имеющей существенное значение для 1.5.22. Клеточная биология (медицинской науки).

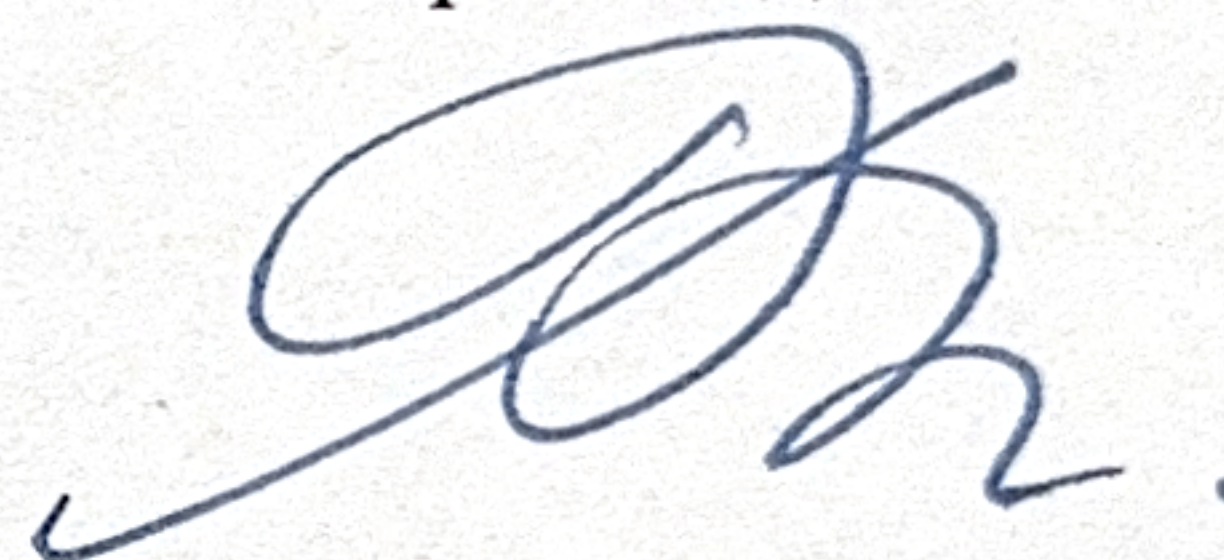
По своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов представленная диссертация полностью соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 г. (с изменениями, утвержденными: приказом №1179 от 29.08.2023 г., приказом №0787/Р от 24.05.2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Пугачева Екатерина Николаевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности – 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Заведующий научно-исследовательским
отделом патоморфологии ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА России,
доктор медицинских наук
(3.1.22. Инфекционные болезни,
3.3.2. Патологическая анатомия)

Карев Вадим Евгеньевич

Дата 16.6.2025



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА России). Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Тел.: +7(812)234-9691; <http://niidi.ru/> E-mail: niidi@niidi.ru

Подпись д.м.н. В.Е. Карева заверяю.

Учёный секретарь
ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА, К.М.Н., доцент

В.М. Волжанин

