

УТВЕРЖДАЮ

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



П.В. Шегай

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

2024 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

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

Диссертация «Морфологические особенности овофолликулогенеза 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.

Пугачева Екатерина Николаевна, 1990 года рождения, гражданство Российской Федерации, окончила государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Лечебное дело» в 2016 году.

В 2024 году прикреплена для подготовки диссертации на соискание ученой степени кандидата наук без освоения программ подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 175 от 24.06.2024 г. выдана в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

С 2022 года по настоящее время Е.Н. Пугачева работает врачом акушером-гинекологом гинекологического отделения частного учреждения

Общество с ограниченной ответственностью «Лечебный центр», город Москва.

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 «Морфологические особенности овофолликулогенеза 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 Пугачевой Екатерины Николаевны на тему «Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» выполнена в соответствии с планом научно-практических работ и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, посвященную решению актуальной задачи в области клеточной биологии – раскрытию механизмов регуляции локального гомеостаза яичника как при нарушении овофолликулогенеза после воздействия электронами в режиме фракционирования, так и его нивелирования введением аскорбиновой кислоты. Диссертация обладает научной новизной, теоретической и практической ценностью и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

- **Актуальность темы диссертационного исследования**

В настоящее время, несмотря на высокую распространенность среди женщин репродуктивного возраста преждевременной недостаточности яичников, отсутствуют отечественные рекомендации по ведению пациенток с этой патологией овофолликулогенеза, что значительно затрудняет диагностику данного состояния, частота которого неуклонно возрастает и варьирует в широких пределах, достигая в некоторых популяциях до 13 %. В многочисленных крупных исследованиях показано, что ионизирующее излучение при лучевой терапии злокачественных новообразований органов брюшной полости и малого таза помимо атипических клеток способно поражать здоровые клетки овариальных фолликулов, приводя к уменьшению их количества и развитию преждевременной недостаточности яичников и бесплодия в отдаленные сроки. Поэтому, выбор вида ионизирующего излучения, оптимизация режимов и методов радиотерапии являются высоко актуальным направлением в контексте поиска способов снижения частоты встречаемости этого состояния.

Вторым, не менее важным направлением современной радиобиологии является поиск и апробация методов, способных снижать степень выраженности постлучевого повреждения структур яичника и нарушения овофолликулогенеза. Наиболее интересным представляется комплексное исследование радиопротекторного действия субстрата из группы антиоксидантов – аскорбиновой кислоты, эффективность которого уже была продемонстрирована в других работах в моделях радиационно-индуцированного повреждения различных органов.

Аскорбиновая кислота с ее выраженным антиоксидантным свойством, может быть перспективным кандидатом для использования в качестве радиопротектора. Известно, что она эффективно нейтрализует свободные радикалы, предотвращая повреждения ДНК и снижая риск клеточной гибели в различных органах. Следует подчеркнуть, что молекулярные механизмы действия аскорбиновой кислоты, в том числе ее регулирующее влияние на

редокс-гомеостаз, репарацию ДНК, жизненный цикл фолликулярных клеток, воспалительную реакцию и сигнальные пути, ответственные за выживаемость овариальных фолликулов и развитие фиброза на поздних сроках, остаются недостаточно изученными в контексте радиопротекции яичников. Для более глубокой оценки ее потенциала необходимы комплексные исследования, которые позволят выяснить точки приложения позитивных эффектов аскорбиновой кислоты и подтвердить ее радиопротекторные свойства, которые могут быть использованы в клинической практике врачей-онкологов. Поэтому, проведение доклинических исследований в данном направлении с использованием молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов раскроет механизмы регуляции локального гомеостаза яичника как при нарушении овофолликулогенеза после воздействия электронами, так и его нивелирования введением аскорбиновой кислоты.

Таким образом, научная работа Пугачева Екатерина Николаевна посвящена актуальной проблеме – выявление радиопротекторного действия аскорбиновой кислоты в отношении овариальных фолликулов при радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников.

• **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, гистохимическое (трихромом по Массону),

морфометрическое, иммуногистохимическое (α -SMA, TGF- β , Coll-1 и TUNEL-метод), молекулярно-генетическое (маркеры PI3K/АКТ/mTOR, PI3K/АКТ/FOXO3, TGF/SMAD сигнальных путей; маркеры жизненного цикла – Ki-67, caspase 3, caspase 8, caspase 9) исследования, иммуноферментный анализ (малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза), 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 180 животных – самок крыс аутбредного стока 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.

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 подсчёта 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. Парные 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**

На основании проведенного гистологического и молекулярно-биологического исследований впервые выявлено, что локальное облучение яичника электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр через три месяца приводит к снижению количества овариальных фолликулов на разных стадиях развития, истощению овариального резерва и появлению признаков радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников.

Впервые продемонстрировано, что аскорбиновая кислота приводит к сохранению гормонального статуса, поддерживая нормальные концентрации гонадотропных гормонов, показателя овариального резерва (антимюллерова гормона) и эстрогении при локальном воздействии электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

Впервые установлено, что предлучевое использование аскорбиновой кислоты сопровождается снижением оксидативного стресса и индукцией ферментов эндогенной антиоксидантной защиты в гомогенате яичников после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр согласно уровням малонового диальдегида, супероксиддисмутазы и каталазы.

Впервые доказано, что аскорбиновая кислота частично препятствует фрагментации ДНК, возникающей после локального воздействия

электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, что показано TUNEL-методом.

Впервые установлено, что 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.

Впервые обнаружено, что 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.

Впервые 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.

- **Практическая значимость работы**

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 медикаментозной радиопротекции овариального резерва предлучевым введением аскорбиновой кислоты необходимо учитывать при назначении электронотерапии злокачественных новообразований органов малого таза и брюшной полости врачами-радиотерапевтами и врачами-онкологами. Кроме того, в радиобиологической, онкологической и гинекологической практике при назначении электронотерапии следует учитывать дозозависимое развитие фиброза, радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и бесплодия с целью возможной его протекции и профилактики, а морфологическая оценка постлучевого состояния овариальных фолликулов, в том числе – в отдаленные сроки после воздействия электронами, может быть использована в работе врача-патологоанатома.

- **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 яичников после локального облучения электронами и введения аскорбиновой кислоты. Ценность научных работ заключается в установлении гистологической, молекулярно-биологической и молекулярно-генетической характеристики овофолликулогенеза и его микроокружения в условиях радиационно-индуцированного повреждения яичников, вызванного воздействием электронами в режиме фракционирования и протекторного влияния аскорбиновой железы.

На основании результатов проведенного гистологического, молекулярно-биологического и молекулярно-генетического анализа решена актуальная научная задача – выявлено радиопротекторное действие

аскорбиновой кислоты в отношении овариальных фолликулов при радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников.

- **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 №504 от 23.09.2024 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 «Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты». Выписка из протокола №6 от 27.04.2023 г.

- **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертация на тему «Морфологические особенности овофолликулогенеза 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 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.

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

1) Демяшкин Г.А., Пугачева Е.Н., Муртазалиева З.М., Вадюхин М.А. Характеристика волокнистого компонента яичника в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2024. – Т. 14, № 1. – С. 24-28. [ВАК]

2) Особенности пролиферации и апоптоза фолликулярных клеток при введении аскорбиновой кислоты в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности / Е. Н. Пугачева, М. А. Вадюхин, З. М.

Муртазалиева, И. В. Игнатко // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2024. – Т. 14, № 2. – С. 47-51. [ВАК]

3) Демяшкин Г.А., Муртазалиева З.М., Пугачева Е.Н., Вадюхин М.А., Шукюрова М.М., Корякин С.Н., Проскурякова А.А. Морфофункциональные особенности воспаления в яичнике после воздействия локального облучения электронами и введения плазмы, обогащённой тромбоцитами // Морфология. - 2023. - Т. 161. - №4. - С. 43-52. [RSCI]

Оригинальная научная статья в научном издании, включенном в международную, индексируемую базу данных (Scopus):

1) Demyashkin G, Vadyukhin M, Murtazaliev Z, Pugacheva E., et al. Novel molecular mechanisms underlying the ameliorative effect of Platelet-rich plasma against electron radiation-induced premature ovarian failure. Int J Mol Sci. 2024;25(18):10115. [Scopus]

Материалы научных конференций по теме диссертационного исследования:

1) Оценка жизненного цикла в фолликулах яичников крыс после локального облучения электронами / Е. Н. Пугачева, З. М. Муртазалиева, Д. И. Угурчиева [и др.] // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 106-107.

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

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 Пугачевой Екатерины Николаевны «Морфологические особенности овофолликулогенеза 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: 19 человека.

Результаты голосования: «за» – 19 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 14 от 11 декабря 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