

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Евгения Владимировича Инжеваткина
«Закономерности изменений внутриклеточных обменных процессов в
условиях канцерогенеза у мышей с асцитной карциномой Эрлиха
(экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой
степени доктора биологических наук по специальности
14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания находятся на втором месте по смертности после патологий сердечно-сосудистой системы и, несмотря на успехи современной медицины, остаются одной из сложнейших и нерешенных проблем здравоохранения. Поэтому анализ молекулярно-клеточных механизмов патогенеза опухолевых заболеваний несомненно является актуальной задачей медико-биологических исследований, так как открывает новые пути для коррекции этой патологии. Диссертационная работа посвящена анализу закономерности изменений внутриклеточных обменных процессов в условиях канцерогенеза у экспериментальных животных на модели перевиваемой карциномы Эрлиха. Нарушение обменных процессов в малигнизированных клетках играет немаловажную роль в патогенезе онкологических заболеваний, так как активация энергетического обмена, обмена белков, липидов и нуклеиновых кислот в опухолевых клетках определяет их высокую пролиферативную активность, а также обуславливает их ингибирующее действие на функции клеток иммунной системы.

Учитывая важную роль иммунной системы в реализации противоопухолевой защиты организма, проведенное в диссертационной работе исследование обменных процессов, протекающих в клетках иммунной системы в процессе роста опухоли, а также сравнительный анализ изменений обменных процессов, происходящих в клетках самой опухоли и в клетках нормальной не иммунной ткани организма, направленный на выявление общих закономерностей внутриклеточных обменных процессов, несомненно является актуальной задачей, так как предоставляет информацию для разработки новых методов и подходов в терапии онкологических заболеваний, направленных на коррекцию нарушений обмена веществ в клетках иммунной системы, участвующих в противоопухолевой защите организма.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Приведенные в рассматриваемом диссертационном исследовании выводы и рекомендации обоснованы, логично следуют из полученных результатов. При выполнении исследования были использованы

современные адекватные поставленным целям и задачам модели и методики. Избранной моделью перевиваемых опухолей лабораторных животных послужила асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), применение которой позволило контролировать условия возникновения опухоли и проводить детальный анализ изменений в опухолевых и нормальных клетках в динамике развития опухолевого процесса. Достоверность полученных данных подтверждается результатами статистической обработки, проведенной с помощью корректных методов, применение которых в данной работе хорошо обосновано автором. Сделанные выводы соотносятся с поставленной целью, задачами исследования и соответствуют полученным автором результатам. Работа прошла апробацию на различных уровнях, результаты диссертационного исследования докладывались на международных и российских конференциях, а также были опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Таким образом, научные положения, выводы и практические рекомендации можно считать корректными и обоснованными.

Оценка научной новизны исследования

Результаты диссертационного исследования оригинальны и отличаются научной новизной. Получены новые данные, раскрывающие молекулярные механизмы патогенеза опухолевых заболеваний. Впервые проведено комплексное исследование показателей обменных процессов в клетках опухоли и нормальных клетках (лимфоцитах, макрофагах, гепатоцитах) при инициации, развитии и на терминальной стадии опухолевого процесса на модели АКЭ у мышей.

Показано, что при инициации процесса опухолевого роста в клетках АКЭ, а также в лимфоцитах крови животных, макрофагах, гепатоцитах повышается интенсивность гликолиза, цикла Кребса и других обменных процессов. На терминальной стадии заболевания интенсивность всех исследованных внутриклеточных обменных процессов в лимфоцитах крови у мышей с АКЭ, клетках опухоли, гепатоцитах снижается. Впервые выявлена пространственная метаболическая неоднородность солидной формы карциномы Эрлиха. Получены новые данные, доказывающие, что наблюдаемые при развитии опухоли изменения обмена веществ имеют сходный характер и в малигнизированных клетках, и в нормальных клетках мышей с перевиваемой АКЭ (лимфоцитах крови, макрофагах, инфильтрирующих опухоль, гепатоцитах) и определяются интенсивностью воздействия факторов канцерогенеза. Скорость этих изменений зависит от анатомо-физиологических особенностей тканей: наибольшая скорость изменений характерна для макрофагов, инфильтрирующих опухоль, наименьшая – для гепатоцитов.

Таким образом, в рассматриваемой диссертационной работе впервые проведено комплексное исследование, раскрывающее детальные изменения показателей обменных реакций, происходящие в различных клетках при

развитии опухолевого процесса на модели АКЭ. В целом, результаты, полученные автором, представляют новое научное знание в области патофизиологии опухолевого роста.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что в ней раскрыты новые механизмы онкологического заболевания на экспериментальной модели, проанализировано, как изменяются важнейшие процессы жизнедеятельности клеток иммунной системы при опухолеобразовании - от начальной стадии до терминальной. Детально исследованы и процессы, протекающие в макрофагах, инфильтрующей опухоль, что раскрывает молекулярные механизмы участия этих клеток в канцерогенезе. Важным для понимания фундаментальных основ патогенеза онкологических заболеваний является исследование обменных процессов в опухолевых клетках и их взаимосвязь с обменными процессами в нетрансформированных клетках. Практическая значимость исследования определяется тем, что обосновано применение экспериментальной модели карциномы Эрлиха для исследования тонких механизмов канцерогенеза, что дает возможность применять данные подходы для широкого круга исследований в области онкологии, патофизиологии, иммунологии, биохимии. Разработаны новые экспериментальные методики: методика биOLUMИнесцентного определения концентрации субстратов НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, а также концентрации НАД⁺ в лимфоцитах и опухолевых клетках у мышей с АКЭ.

Таким образом, проведенный в диссертационном исследовании всесторонний анализ изменений обменных процессов в неопластических клетках и в клетках иммунной системы, в процессе роста опухоли, имеет важное фундаментальное и прикладное значение.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации связаны с возможностью создания, на основе полученных результатов, новых методов диагностики и прогноза онкологических заболеваний, опирающихся на данные о характере внутриклеточных обменных процессов, а также методов фармакологической коррекции обмена веществ в нормальных клетках организма и избирательного воздействия на обменные процессы в клетках опухоли.

Результаты исследования могут быть внедрены в учебный процесс в ВУЗах медико-биологической направленности в рамках лекционных курсов по патологической физиологии, медицинской химии, иммунологии.

Выполненный объем исследования, достоверность результатов, новизна и практическая значимость подтверждают большую научную ценность диссертационной работы.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа Инжеваткина Е.В., изложенная на 227 страницах, построена по традиционному плану и состоит из основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации. Диссертация иллюстрирована 74 рисунками, 9 таблицами, список цитированной литературы включает 329 наименований, из них 51 отечественный и 278 зарубежных источника. Диссертация логически выстроена, разделы исследования дополняют друг друга.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также представлены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации и внедрении результатов работы в практику. Обоснован выбор экспериментальной модели – карциномы Эрлиха у мышей, доказано, что применение данной модели обеспечивает решение поставленных в работе задач.

В обзоре литературы, включающем четыре раздела, рассмотрены особенности обменных процессов в опухолевой ткани, проанализированы имеющиеся в литературе представления о роли нарушения этих процессов в патогенезе опухолевых заболеваний, подробно освещены механизмы иммуносупрессивного действия опухоли, приведены данные работ, описывающих кинетические характеристики опухолевого роста, уделено внимание рассмотрению процесса адаптации клеток и целостного организма к неблагоприятным воздействиям.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе методы исследования. Методическое обеспечение соответствует поставленным задачам, методы изложены подробно и могут быть легко воспроизведены. Ряд новых методик разработан диссертантом. В конце главы описаны способы статистической обработки результатов.

Глава «Результаты исследований и их обсуждение» состоит из семи разделов, в которых автор приводит данные, обосновывающие положения, выдвинутые на защиту, проводит их сопоставление с имеющимися в литературе сведениями. Получены важнейшие показатели, характеризующие развитие опухолевого процесса у экспериментальных животных, которым были перевиты клетки карциномы Эрлиха. Использовались различные количества инокулируемых клеток – 1×10^4 или 3×10^6 на животное. Выживаемость мышей, как и показатели обменных процессов в различных типах клеток животных, зависели от количества введенных им опухолевых клеток, что позволило получить различные кинетические модели роста АКЭ у мышей. При введении 3×10^6 клеток АКЭ на животное, уровень смертности мышей достигал 100 % в течение 24-х суток, а после введения 1×10^4 клеток АКЭ, смертность составила 43 % при наблюдении в течение 100 суток. Проанализированы изменения комплекса показателей, характеризующих обменные процессы в различных типах клеток при инициации и развитии

процесса опухолевого роста. Показано, что у животных с АКЭ на стадиях выраженных проявлений заболевания наблюдается рост показателей энергетического обмена: повышение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ - изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, а также активности глутатионредуктазы, возрастание концентрации пирувата и глутамата в лимфоцитах крови. Сходные изменения установлены для клеток печени мышей в процессе роста АКЭ, а также клеток опухоли, показано, что в лимфоцитах, гепатоцитах и опухолевых клетках интенсифицируется процесс гликолиза, активизируется пентозофосфатный путь, кроме того происходит усиление реакций биосинтеза и антиоксидантной защиты, повышается пролиферативная активность клеток. В целом, для обобщения наблюдаемых изменений автор использует термин «функциональная адаптация». На терминальной стадии болезни показатели, характеризующие интенсивность процессов энергетического обмена в лимфоцитах, гепатоцитах, клетках опухоли, снижаются, падает пролиферативная активность клеток, наблюдается угнетение реакций биосинтеза и антиоксидантной защиты. Сходные процессы показаны и для инфильтрирующей опухоль макрофагов в процессе роста АКЭ. Диссертант определяет данные феномены, как «функциональная дизадаптация» или срыв адаптации и делает вывод о том, что наблюдаемые изменения являются неспецифическими по отношению к типу исследуемых клеток. Отдельный раздел данной главы посвящен описанию особенностей обмена веществ в клетках солидной карциномы Эрлиха, показана их пространственная метаболическая неоднородность.

Несмотря на то, что в работе использован широкий круг биохимических методов и подходов и анализируется ряд биохимических показателей, рассматриваемая диссертация имеет выраженную доминирующую патофизиологическую направленность, так как решает задачу изучения причин возникновения, механизмов развития и исходов патологических процессов, выявления ранее неизвестных закономерностей функционирования организма, его органов и систем в условиях болезни. В работе проводится исследование патогенетических механизмов развития опухолевого заболевания и реакций организма на воздействие патогенного фактора.

Диссертация хорошо иллюстрирована. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики, достоверность результатов не вызывает сомнений.

В целом, в главе «Результаты исследований и их обсуждение», последовательно изложены данные экспериментальной работы, проведен их анализ и обсуждение в сопоставлении с результатами исследований, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе. В главе «Заключение» обобщены основные положения диссертации, содержится

концептуальная схема, в которой логично и четко изложены наиболее значимые итоги работы и выявленные закономерности.

Выводы обоснованы и корректны, соответствуют поставленным задачам и логично вытекают из результатов работы и заключения. Проведенное исследование позволило автору предложить актуальные практические рекомендации. Выводы и практические рекомендации соответствуют основным положениям диссертации и обоснованы.

Работа является завершенным научным исследованием.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Критические замечания и вопросы

Хотя работа написана очень хорошим стилем и логически выстроена, имеются некоторые не совсем удачные обороты, опечатки и недочеты. Например, на стр. 64 вместо «интерквартильный» размах написано «интерквартильный» размах.

В тексте раздела 3.1 на стр. 66 при описании данных, отраженных на Рис. 3.1, указано, что к 15-м суткам смертность животных достигала 20 %, в то время как из рисунка 3.1 следует, что этот показатель к 15-м суткам достигал примерно 50 %.

Некоторые аббревиатуры не расшифрованы при первом их употреблении в тексте.

При изложении некоторых методик отсутствует информация о количестве животных в экспериментальных группах.

В автореферате при описании содержания ряда рисунков или таблицы не указано, какое количество опухолевых клеток инокулировали животным – 10^6 или 10^4 клеток на мышь, что затрудняет восприятие материала.

На мой взгляд, выводы несколько перегружены аббревиатурами.

Мне кажется, работа бы очень выиграла, если в ней было бы приведено несколько больше данных морфологических исследований, в частности при анализе изменений в солидной опухоли.

Раздел «Заключение» написан очень развернуто и скорее мог бы служить в качестве главы «Обсуждение результатов».

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление от рассматриваемой работы.

В порядке дискуссии хочу задать диссертанту несколько **вопросов**:

1) Цель работы состояла в установлении закономерностей изменений внутриклеточных обменных процессов в условиях канцерогенеза у мышей с АКЭ для патогенетического обоснования разработки методов коррекции обмена веществ при онкологических заболеваниях. В связи с этим хочу спросить, можно ли на основании результатов и выводов диссертационной работы высказать какие-то конкретные предложения о новых подходах к

использованию тех или иных лекарственных препаратов для коррекции обмена веществ при опухолевых заболеваниях?

2) Хотя диссертант заключает, что, в целом, описанные в работе изменения обмена веществ в различных клетках, полученных от мышей с АКЭ, являются неспецифическими не только по отношению к типу исследованных тканей, но и по отношению к типу действующего патогенного фактора, хочется уточнить – выявлены ли все-таки какие-либо изменения измеряемых показателей, специфические именно для процесса опухолевого роста, в частности, на начальной его стадии, что могло бы послужить основой для создания новых методов дифференциальной диагностики онкологических заболеваний?

3) Имеются ли литературные данные о динамике изменения относительного содержания различных популяций лимфоцитов в периферической крови животных при аналогичных экспериментальных подходах – прививке мышам сходного количества клеток АКЭ, а также об изменении функциональной активности естественных киллерных клеток периферической крови (экспрессии активирующих рецепторов, маркеров активации и созревания ЕК клеток и т.п.), изменении цитокинового профиля на разных стадиях заболевания, позволяющие провести комплексное сравнение различных показателей, отражающих функционирование защитных систем при развитии опухолевого процесса, и возможно дать дополнительные объяснения наблюдаемому явлению срыва адаптации клеток?

4) Можно ли транслировать полученные в работе данные по определению показателей интенсивности обменных процессов в клетках крови на разных стадиях процесса опухолеобразования - в практическую медицину, в качестве критериев для оценки эффективности химиотерапии у больных с онкологической патологией или для выбора оптимальной схемы терапии?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Е.В. Инжеватина «Закономерности изменений внутриклеточных обменных процессов в условиях канцерогенеза у мышей с асцитной карциномой Эрлиха (экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является фундаментальным исследованием в области патофизиологии, посвященным изучению молекулярно-клеточных механизмов патогенеза опухолевых заболеваний. В этом исследовании разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение.

По актуальности, поставленным целям и выполненным задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости, настоящая работа полностью отвечает

требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Инжеваткин Евгений Владимирович несомненно заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03. – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

Шамова Ольга Валерьевна,
доктор биологических наук, доцент
(14.03.03 –патологическая физиология, 03.01.04 – биохимия)
Зам. директора по научной работе,
заведующий отделом общей патологии и патофизиологии
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Институт экспериментальной медицины»

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376 Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д. 12
Тел. +7(812) 234-94-93
Email: oshamova@yandex.ru, shamova@iems.spb.ru

Согласна на обработку моих персональных данных



Подпись и контактные данные д.б.н. доцента Шамовой Ольги Валерьевны
заверяю

Начальник отдела кадров
ФГБНУ «ИЭМ»

Подпись Шамовой О.В.
Удостоверяется
Нач. отдела УП и Д ФГБНУ «ИЭМ»



Шамова О.В.