

Отзыв официального оппонента

доктора медицинских наук (14.00.23 - гистология, цитология, эмбриология), профессора, профессора кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России Дубовой Татьяны Клеоникиной на диссертационную работу Налобина Дениса Сергеевича «Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности – 03.03.05 «биология развития, эмбриология»

Диссертационная работа Налобина Д.С. посвящена актуальной проблеме биологии развития и гепатологии. В ней исследованы важные вопросы регенерации печени на модели фиброза и цирроза и влияния на этот процесс тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови животных. Общеизвестно, что цирроз печени – это полиэтиологическое прогрессирующее заболевание. Важно отметить, что механизмы развития цирроза под влиянием различных факторов неодинаковы и сопровождаются выраженными нарушениями функции печени. В этой связи одна из основных задач лечения циррозов заключается в нормализации морфофункционального состояния печени путем увеличения отношения массы паренхиматозной ткани к фиброзной. Для этого часто используются методы введения гепацитарного фактора роста (HGF), различных цитокинов, дифференцированных и низкодифференцированных гепатоцитов и антиоксидантов. Это приводит к определенному, но явно недостаточному положительному эффекту, поскольку количество соединительной ткани остается избыточным, а функциональная активность органа – недостаточной. Установлено, что в основе развития цирроза лежит дисбаланс (разрегулированность) соотношения популяции клеток, входящих в состав печени и нарушение их взаимодействия между собой. Поиск веществ, способствующих одновременному улучшению состояния паренхимы органа и снижению интенсивности фиброза при циррозах печени совершенно

очевидно является актуальной задачей современной биомедицины. Неоспоримо установлено, что цирроз печени является конечной стадией многих патологических состояний печени, вызывающих ее диффузное поражение. Морфологическими проявлениями этих состояний являются: дистрофия и некроз гепатоцитов, нарушение архитектоники органа (узловая перестройка паренхимы), интенсивное разрастание соединительной ткани (фиброз).

В экономически развитых странах цирроз входит в число основных причин смертности людей в возрасте от 35 до 60 лет. Мультидисциплинарные исследования обусловили существенный прогресс в лечении цирроза печени. Накоплен большой опыт в трансплантации печени при фатальных случаях цирроза. Однако, многие аспекты этиологии и патогенеза циррозов остаются невыясненными. При этом активно обсуждается значение генетической предрасположенности, иммунологических факторов, бактериальных, вирусных и других антигенов, а также гипоксии. В настоящее время рост числа хронических заболеваний печени (в основном алкогольного, вирусного и метаболического происхождения) и недостаточная эффективность существующих методов лечения обуславливает необходимость дальнейшего развития новых подходов к решению проблемы цирроза печени. С этих позиций работа Налобина Д.С., несомненно, является **актуальной** и для практической, и для теоретической медицины.

Цель исследования заключалась в изучении влияния биорегуляторов, выделенных из печени крыс и из сыворотки крови крупного рогатого скота, на заместительную регенерацию печени мыши.

Новизна полученных результатов несомненна. В работе получены **новые**, ранее не известные данные:

- Разработана экспериментальная модель роллерного органотипического культивирования фрагментов печени *in vitro*. С использованием этой модели автором впервые было проведено

исследование биологического влияния мембранотропного гомеостатического тканеспецифического биорегулятора (МГТБ) печеночного происхождения и выделенного из сыворотки крови. Такой подход представляется логичным и информативным, поскольку позволяет исключить воздействие организменных (интегративных) факторов на исследуемые процессы.

- Автором впервые был выявлен гепатотропный эффект используемого биорегулятора, выделенного из печени, на моделях острого и хронического повреждения печени тетрахлорметаном.
- Также впервые был выявлен гепатотропный эффект МГТБ, выделенного из печени, на морфофункциональное состояние печени. Он заключался в снижении площади очагов некроза печеночной паренхиме по сравнению с соответствующим контролем. Весьма существенным с точки зрения новизны является обнаруженное автором уменьшение степени коллагенизации стромы печени, а также снижение уровня АЛТ в сыворотке крови, уровня экспрессии генов α -SMA, $TGF-\beta$, $TIMP-1$ на фоне индуцированного фиброза под влиянием МГТБ, выделенного из печени. На модели роллерного органотипического культивирования фрагментов фиброзно измененной печени также было подтверждено гепатотропное действие МГТБ.
- Было обнаружено, что МГТБ, выделенные из сыворотки крови, вышеописанными гепатопротекторными свойствами не обладает.
- Автором получена существенная информация о возможности сочетанного применения МГТБ, выделенных из печени и сыворотки крови животных, для снижения степени коллагенизации поврежденной печени.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному принципу и содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы. Она изложена на 110 страницах машинописи, иллюстрирована 6 таблицами и 20 рисунками. Список литературы включает 67 отечественных и 96 зарубежных источников. Во **введении** автор убедительно обосновывает актуальность, новизну, значение исследования для теории и практики, а также четко формулирует цель, задачи, положения, выносимые на защиту. В **обзоре литературы** представлены современные представления о различных аспектах изучаемой проблемы. В том числе, подробно описаны хронические заболевания печени, сопровождающиеся активацией фиброза и нарушением взаимодействия клеток различных популяций на этом фоне. Понимание и критический анализ этой ситуации имеет существенное значение для достижения поставленной диссертантом цели. В целом этот раздел работы свидетельствует о широком кругозоре автора и его ориентации в литературе по специальности. Глава «**Материалы и методы исследования**» содержит подробное и квалифицированное описание методических приемов выделения, очистки используемого в работе биорегулятора и определения его характеристик. В работе использован широкий арсенал методов: физико-химических, биохимических, молекулярно-биологических, морфологических, гистохимических, роллерного органотипического культивирования и статистической обработки полученных результатов. При этом следует отметить полное соответствие выбранных методов и моделей поставленным автором цели и задачам. Результаты исследований описаны полно, грамотно, сопровождаются иллюстрациями высокого качества и таблицами. Несмотря на большой объем проведенного исследования, его результаты и обсуждение написаны лаконично, научным литературным языком с учетом современных сведений в области гепатологии и клеточной биологии.

Достоверность результатов и степень их обоснованности обусловлены четкостью поставленной цели и задач исследования, адекватностью выбранных методов, достаточным фактическим материалом и количеством использованных животных, применением соответствующих методов статистической обработки результатов. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. **Выводы** полностью соответствуют полученным данным.

Научно-практическое значение работы.

Результаты проведенного исследования имеют важное теоретическое и практическое значение, поскольку они дополняют существующие методы разработки и применения новых методов профилактики и лечения хронических заболеваний печени с последующим формированием цирроза. Кроме того, разработанная автором модель роллерного органотипического культивирования фрагментов печени расширяет методические возможности для апробации препаратов с предполагаемым гепатопротекторным эффектом. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что исследуемые в диссертации биорегуляторы вносят существенный вклад в регуляцию межклеточных и межтканевых взаимодействий при хронических диффузных поражениях печени. Существенно, что МГТБ оказывают выраженный гепатотропный эффект в низких дозах, они не токсичны, тканеспецифичны (но не видоспецифичны) и могут использоваться перорально.

Рекомендации по применению результатов исследования.

Полученные результаты могут представлять интерес для научных коллективов, занимающихся изучением регенерации патологически измененной печени, в частности, при хронических гепатитах и циррозах. Кроме того, эти результаты целесообразно использовать в лекционных курсах по молекулярной и клеточной биологии, биологии развития, гепатологии, гистологии.

Автореферат полностью отражает содержание работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, и 5 тезисов научных конференций.

Принципиальных замечаний по диссертации нет; некоторые оформительские и стилистические недочеты не портят хорошего общего впечатления о проделанной работе; при этом возникают некоторые вопросы:

- Объясните, пожалуйста, почему в главе «Материалы и методы» указано, что при взятии материала для гистологического исследования брались кусочки из каждой доли печени; однако в главе «Результаты исследования» соответствующие сведения не фигурируют?
- В чем, по вашему мнению, может быть причина неэффективности в некоторых сериях экспериментов применения МГТБ, выделяемых из сыворотки крови, в качестве гепатопротектора?
- Какую позицию Вы занимаете по вопросу возможности положительного влияния изученных биорегуляторов на фоне уже развившегося цирроза печени?

Заключение

Диссертация Налобина Дениса Сергеевича «Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши», выполненная под научным руководством доктора биологических наук, профессора Голиченкова Владимира Александровича и кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Краснова Михаила Сергеевича, является законченной научно-исследовательской работой, содержащей новые решения актуальной научной задачи – изучение влияния биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши, имеющей важное значение для гепатологии и биологии развития. По актуальности, достоверности полученных данных, научной новизне и практической значимости диссертация Д.С. Налобина «Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови

млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016) предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук. Налобин Д.С. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.05 «биология развития, эмбриология»

Официальный оппонент –
доктор медицинских наук
(14.00.23 - гистология, цитология, эмбриология),
профессор, профессор кафедры гистологии,
эмбриологии и цитологии лечебного факультета
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России

Дубовая Т.К.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1,

Тел: 8 (495) 434-40-83,

E-mail: gusvbr@mail.ru

28.09.2016



Сведения об официальном оппоненте

по кандидатской диссертации Налобина Дениса Сергеевича «Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши»

ФИО	Дубовая Татьяна Клеониковна
Ученая степень, отрасль науки, шифр и наименование специальности	доктор медицинских наук по специальности 14.00.23 – гистология, цитология, эмбриология
Ученое звание	профессор
Место работы и занимаемая должность	профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес учреждения	117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
Телефон учреждения	8 (495) 434-40-83
Адрес электронной почты	gusvbr@mail.ru
Список публикаций за последние 5 лет по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях	1. В. Я. Бродский, Н. П. Шарова, Л. А. Мальченко, Д. С. Конченко, Т. К. Дубовая, Н. Д. Звездина. Блокирование активности протеасом нарушает ритм синтеза белка – маркера прямых межклеточных взаимодействий // Онтогенез, 2015, том 46, № 1, с. 44–52 2. Бродский, В. Я.; Мальченко, Л. А.; Дубовая, Т. К.; Конченко, Д. С.; Звездина, Н. Д. Дофамин, введенный крысе, дезорганизует ритм синтеза белка в гепатоцитах. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т. 157, № 2. - С. 182-185. 3. В.Я. Бродский, Т.К. Дубовая, Н.Д. Звездина,, Д.С.

	Конченко, Л.А. Мальченко. Дофамин дезорганизует ритм синтеза белка, нарушая самоорганизацию гепатоцитов <i>in vitro</i>/ Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013, Том 156 № 7, с. 298-301. 4. А.И. Щеголев, А.П. Эттингер, Е.А. Поскребышева, Т.И. Баранич, Т.К. Дубовая. Состояние микроциркуляторного русла и водного метаболизма денервированной печени при интоксикации тетрахлорметаном. Вестник Российского государственного медицинского университета №1, 2013, с.49-52.
--	---

Официальный оппонент –
доктор медицинских наук
(14.00.23 - гистология, цитология, эмбриология),
профессор, профессор кафедры гистологии,
эмбриологии и цитологии лечебного факультета
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России

Дубовая Т.К.

26.09.2016



ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Налобина Дениса Сергеевича «Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Актуальность работы

Диссертационная работа Налобина Дениса Сергеевича посвящена сравнительному анализу гепатопротекторных свойств биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки млекопитающих, на модели фиброза. Фиброз печени является широко распространенным заболеванием, развивающимся вследствие вирусного, токсического или травматического повреждения печени. Его развитие связано с нарушением процесса репарации печени, обусловленным трансдифференцировкой собственных клеток печени и активацией синтеза белков внеклеточного матрикса в портальных фибробластах. В результате паренхима печени замещается соединительной тканью, ухудшается питание клеток печени, что приводит к их гибели и летальной интоксикации организма. Терминальной стадией фиброза является цирроз печени, когда изменения органа являются необратимыми. В настоящее время, фиброз излечим на начальных стадиях, тогда как диагностика заболевания возможна лишь на поздних. Поэтому выбранная диссертантом тема анализа биорегуляторов, способных препятствовать фиброзу печени, является актуальной и своевременной. Для улучшения понимания этиологии и патогенетических механизмов фиброза печени требуется и создание новых моделей исследования. В своей работе диссертант, помимо классических моделей исследования фиброза *in vivo*, предложил новую модель, позволяющую проводить анализ *in vitro*. Предложенный Денисом Сергеевичем подход является актуальным с практической и биоэтической точек зрения, так как позволяет в дальнейшем проводить стандартизированные исследования биоэффективности различных препаратов и снизить количество задействованных в эксперименте лабораторных животных.

Научная новизна

В своей работе Налобин Денис Сергеевич впервые подробно изучил физико-химические свойства, а также состав мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), выделенных из печени. Диссертант впервые провел сравнительный анализ мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), выделенных из различных источников – печени крыс и сыворотки крови крупного рогатого скота – на моделях острого и хронического повреждения печени *in vivo*, а также на модели *in vitro* – органотипической культуре фибротической печени. В ходе исследования Денисом Сергеевичем впервые было установлено, что в случае фиброза МГТБ из печени крыс обладает более высоким гепатопротекторным действием в сравнении с МГТБ из сыворотки крови.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные Налобином Денисом Сергеевичем результаты могут стать основой для разработки лекарственных препаратов нового поколения для восстановления функции печени после повреждения. Как показали данные диссертации, предложенный автором подход к культивированию эксплантатов фибротической печени может быть использована для поиска и проверки эффективности новых гепатопротекторных препаратов. Обзор литературы и результаты данного исследования могут быть включены в курсы лекций по биологии развития, клеточной биологии, гистологии и биотехнологии.

Полученные автором результаты несомненно имеют высокую теоретическую и практическую значимость.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе Налобина Д.С. был проведен анализ не менее 5 повторностей для каждой экспериментальной группы. При обработке данных автором было использовано специальное программное обеспечение для статистического анализа. При нормальном распределении Денис Сергеевич приводил данные в

виде среднего±стандартное отклонение, если распределение изучаемых параметров отличалось от нормального, для сравнения двух независимых групп диссертант использовал медиану, квартили (25-75%) и вариацию (минимальное и максимальное значения) величины.

Иллюстративный материал безукоризнен, подробно описан, тканеспецифические маркеры для анализа подобраны корректные, методы, выбранные автором для исследования, являются высокоточными. Результаты диссертации были апробированы на трех международных конференциях. В связи с вышесказанным, достоверность представленной автором работы не вызывает сомнений.

Содержание работы

Диссертационная работа Налобина Д.С. изложена на 110 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков и 6 таблиц. В диссертации представлены все необходимые по требованиям ВАК разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Последний раздел включает в себя 163 источника, из которых 67 написаны на русском языке и 96 – на английском.

В главе «Введение» автор подтверждает актуальность данного исследования, кратко описывает причины и патогенез фиброза печени, поясняет, что собой представляют биорегуляторы, относящиеся к группе МГТБ. Также во «Введении» диссертант четко формулирует цель и задачи работы и дает обоснование ее научной новизны, теоретической и практической значимости. Но следует отметить, что разделы «Научная новизна», «Теоретическая и практическая значимость» слишком сокращены, автору следовало быть более подробным.

Глава «Обзор литературы» представляет собой подробный анализ, который позволил автору спроектировать и выполнить сложную экспериментальную часть диссертации. «Обзор» включает в себя несколько разделов, в которых автор описывает эмбриогенез и регенерацию печени, рассматривает этиологию различных заболеваний печени, приводящих к фиброзу, и систему оценки степени его развития. В своем обзоре Денис

Сергеевич подробно разбирает различные модели фиброза печени и способы его терапии. Отдельная глава обзора посвящена описанию мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов.

Обзор литературы четко сформулирован, несет всю необходимую для понимания исследования информацию и может быть рекомендован для отдельной публикации в виде нескольких обзорных статей или главы в учебнике.

Работа выполнена на высоком методическом уровне, что включает применение комплекса таких сложных методов, как масс-спектрометрический анализ, определение вторичной структуры методом кругового дихроизма, культивирование эксплантатов печени, работа с животными и другие методы молекулярной биологии, гистологии и эмбриологии. Все эксперименты и анализ результатов были выполнены лично автором или при его участии. Используемые методы подробно описаны и адекватны поставленным задачам.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из четырех разделов. В каждом разделе, автор тщательно описывает и подробно обсуждает представленные данные в виде рисунков и графиков, заканчивая каждый раздел небольшим заключением.

Глава «Заключение» и «Выводы» полностью соответствуют полученным данным.

Диссертационная работа Налобина Д.С. не вызывает принципиальных замечаний. Однако после прочтения диссертации некоторые вопросы остаются неразрешенными. Почему автор в своей работе культивирует эксплантаты печени в течение 28 суток без смены среды? Почему в работе не представлена культура эксплантатов интактной печени? В качестве замечаний: автору следовало привести на графиках площади очагов некроза и соединительной ткани для контрольной группы.

Заключение

Диссертация Налобина Дениса Сергеевича соответствует требованиям, предъявляемым к научно-квалификационным работам. Автором были получены новые уникальные данные о составе МГТБ и их

Сведения об официальном оппоненте

по кандидатской диссертации Налобина Дениса Сергеевича «Влияние биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на заместительную регенерацию печени мыши»

ФИО	Горкун Анастасия Алексеевна
Ученая степень, отрасль науки, шифр и наименование специальности	кандидат биологических наук по специальностям: 14.03.03 – патологическая физиология, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
Ученое звание	нет
Место работы и занимаемая должность	ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Адрес учреждения	125315 Москва, ул. Балтийская, 8
Телефон учреждения	+7(499)151-17-56
Адрес электронной почты	stgork@gmail.com
Список публикаций за последние 5 лет по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях	1. Шагидулин М.Ю., Горкун А.А., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко М.П., Башкина Л.В., Сабурина И.Н., Севастьянов В.И., Готье С.В. Использование МСК различной онтогенетической зрелости для коррекции хронического фиброзирующего повреждения печени (экспериментальное исследование) // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2013. – Т.XV. – №3 – С.73-82. 2. Shagidulin M., Saburina I., Pulin A., Gorkun A., Zurina I., Repin V., Onishchenko N., Gautie S. Liver tissue regeneration after transplantation of human umbilical cord derived MSCs spheroids at modeling of chronic liver failure // The international journal of artificial organs. –2013. – Vol.36. – N8– P.584. 3. Горкун А.А., Сабурина И.Н., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Пулин А.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Репин В.С. Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероидах пупочного канатика и их

	участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности // Патологическая физиология. – 2012. - №4. – С.50-43.
--	--

Ведущий научный сотрудник
лаборатории клеточной биологии и патологии развития
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»,
кандидат биологических наук
125315 Москва, ул. Балтийская, 8
(499)151-17-56; stgork@gmail.com

Горкун А.А.

Подпись Горкун А.А. заверяю

Ученый секретарь
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»,
кандидат медицинских наук

Скуратовская Л.Н.

27.09.16

