

ОТЗЫВ

на диссертацию Васильева Андрея Вячеславовича «Влияние опиоида периферического действия даларгина на клеточную пролиферацию *in vitro* и репаративную регенерацию костной ткани *in vivo*», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология

Актуальность темы выполненной работы

Регенерация костной ткани остаётся весьма актуальной проблемой особенно не только для травматологов-ортопедов и стоматологов, но и для морфологов, занимающихся этой проблемой. К настоящему времени активно изучаются как уже известные вещества, способные индуцировать репаративный неоостеогенез, так и продолжаются поиски новых веществ, принимающих участие в этом процессе. Результатом таких исследований является создание более эффективных препаратов для лечения костных патологий.

Одними из предполагаемых веществ, способных стимулировать репаративную регенерацию костной ткани являются опиоиды. Во-первых - широко известно их стресс-протекторное действие на организм человека, что выражается в виде снижения болевой чувствительности, снижении секреции таких стрессовых гормонов и стимуляции микроциркуляторного русла. Во-вторых - после обнаружения опиоидных рецепторов на клетках остеобластического дифферона и увеличении экспрессии гена проэнкефалина в клетках созревающей костной ткани во время эмбриогенеза было высказано предположение о том, что опиоиды могут использоваться как стимуляторы репаративного неоостеогенеза. Существуют единичные работы, посвящённые этой теме, однако работа Васильева А.В. является первым доказательным комплексным исследованием.

В работе изучено воздействие опиоида даларгина на пролиферацию нормальных и опухолевых клеток костной ткани на культуре клеток с целью определения безопасности использования даларгина и подбора оптимальных дозировок для стимуляции рецепторов прогениторных клеток. Эксперимен-

тальная часть работы, выполненная на крысах позволила оценить эффект от применения даларгина на репаративную регенерацию костной ткани. Результаты культуральной и экспериментально-хирургической части работы позволили сделать выводы о механизмах действия даларгина.

Научная новизна работы

Автор впервые на разработанных им экспериментальных моделях с помощью адекватных методов морфометрии показал ингибирующее действие даларгина на остеогенез и стимулирующее влияние его блокатора наркозона. Методами клеточной биологии показано, что даларгин в культуре клеток стимулирует пролиферацию клеток предшественников остеобластов (ММСК), но не влияет на дифференцировку остеогенных клеток и пролиферацию зрелых клеток. Не менее важен установленный факт подавления даларгином пролиферации клеток остеосаркомы HOS, что говорит об антионкогенном действии препарата.

Разработанный автором метод аппроксимации для 3D-реконструкции по гистологическим срезам, названный им «математическая модель «резаный цилиндр», позволяет точным образом воспроизводить контуры цилиндрических дефектов и автоматически позиционировать срезы в пространстве. В комбинации с адаптированным к модели критического дефекта теменных костей крыс методом двойного мечения тетрациклиноподобными метками предложенный способ 3D-реконструкции позволяет получить информацию о динамике первичного неоостеогенеза в объёме.

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

Материал, использованный в диссертационной работе уникален и достаточный по числу наблюдений.. Экспериментальная часть работы представлена 21 рентгенограммой и 54 недекальцинированными шлифами костной ткани, содержащими критический дефект теменных костей. Дополнительная информация о структуре регенерата представлена классическими парафиновыми срезами, окрашенными гематоксилином и эозином. По данным

гистологических шлифов выполнены реконструкции 6 образцов с использованием стандартных протоколов компьютерных программ и с использованием оригинальной методики, разработанной автором. Культуральная часть работы включает в себя подсчёт клеток с клеточных культур с 189 чашек Петри – по 61 чашки на каждую культуру. Подсчёт клеток выполнен со множеством повторений для нивелирования ошибки метода.

Использование в работе культуральных методов подтверждает и дополняет данные экспериментального раздела работы, что с учетом развёрнутого статистического анализа обеспечивает целостность, достоверность и обоснованность полученных результатов. Все это позволяет сделать заключение о высокой репрезентативности результатов и выводов диссертации.

Структура работы

Диссертация имеет обычную структуру, список литературы из 45 отечественных и 66 зарубежных источников. Она написана хорошим языком, данные представлены убедительно и объективно. Фотографии, иллюстрирующие текст (в основном морфологические) очень хорошего качества. Особую достоверность придаёт работе хороший статистический анализ количественных данных.

Во введении чётко отражены актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

Диссертация имеет обычную структуру, список литературы из 45 отечественных и 65 зарубежных источников. Она написана хорошим языком, данные представлены убедительно и объективно. Фотографии, иллюстрирующие текст (в основном морфологические) очень хорошего качества.

Обзор литературы, посвящённый опиоидным рецепторам, эндогенным опиоидам и роли опиоидов в регенерации, в том числе костной, безусловно очень хорош. Правда мне хотелось бы видеть ссылку на работу С.Е. Спивака и А.Б Шехтера об эффективности воздействия опиоидов на заживление ран, а не только представленных работ о влиянии на заживления язвы желудка.

Особое уважение вызывает методологическая направленность работы. Автор для выполнения своих задач разработал и модифицировал очень интересные и важные для всех исследователей, занимающихся костной регенерацией методы: способы формирования и двойного мечения критического дефекта теменных костей, способ оценки рентгенограмм, разработал математическую модель «резаного цилиндра» и сравнил этот метод 3D морфометрии с другими методами. В этом проявились несомненные творческие способности диссертанта. Комплексное применение в работе как классических методик, так и современных методов подготовки и анализа исследуемого морфологического материала позволяет сравнить результаты настоящей работы с другими исследованиями и в то же время получить более информативные данные о характере костного регенерата по сравнению с уже существующими работами.

Значимость для науки и практической медицины полученных автором результатов

Результаты диссертационного исследования вносят существенный вклад в теорию участия опиоидной системы в репаративной регенерации костной ткани и являются фундаментальными. Данные о влиянии даларгина и его антагониста налоксона на репаративную регенерацию костной ткани могут быть использованы в практической медицине для разработки новых протоколов лечения костных патологий.

Представленные в диссертации результаты о подавлении даларгином пролиферации линии клеток остеосаркомы могут лечь в основу дальнейших исследований молекулярных механизмов действия опиоидов и могут позволить создать новые подходы для лечения и диагностики опухолей костной ткани.

Результаты диссертационного исследования Васильева А.В. внедрены в программы обучения ФГБНУ Медико-генетического научного центра и кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии лечебного факультета Рос-

сийского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Минздрава России.

Разработанные и модифицированные автором методики для объективной оценки костного регенерата являются очень интересными и важными для всех исследователей, занимающихся проблемой регенерации костной ткани. Их использование позволяет повысить точность и качество проводимых исследований.

В автореферате и опубликованных работах отражены основные положения диссертации. По материалам работы опубликовано 7 печатных работы, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Выводы основаны на большом фактическом материале и логично вытекают из результатов, полученных лично автором.

Замечания к диссертации не имеют принципиального характера.

1. Следовало бы более точно объяснить, почему автор остановился на сроке 28 суток опыта, когда остеогенез еще не закончен.

2. На рис. 26 и 27 костный регенерат обозначен как «грубоволокнистая костная ткань». По моему мнению – это стадия перехода остеоида в незрелую костную ткань.

3. В отношении парафиновых срезов (в отличие от шлифов) нет описания различий опыта от контроля.

Заключение

Диссертация А.В. Васильева написана на актуальную тему, выполнена на очень высоком научно-методическом уровне. Основные положения её отличаются новизной и достоверностью. Диссертация основана на объективных фактах с адекватной интерпретацией последних и является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача - изучение влияния опиоидного периферического действия «Даларгина» на reparативную регенерацию костной ткани.

Результаты диссертационного исследования имеют теоретическое и практическое значение для гистологии и клеточной биологии, патологической анатомии, фармакологии, травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и выводов диссертация Васильева Андрея Вячеславовича «Влияние опиоида периферического действия даларгина на клеточную пролиферацию *in vitro* и репаративную регенерацию костной ткани *in vivo*» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени.

Зав. лабораторией
экспериментальной морфологии
НИИ молекулярной медицины
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова
проф., д.м.н.
(14.03.02 - патологическая анатомия)



Шехтер А.Б.

+7 (495) 242-91-67, +7 (495) 609-14-00
shehter@mmascience.ru
119048 г. Москва, Малая Трубецкая, 8 стр. 2



Подпись Шехтера А.Б. заверяю
Учёный секретарь ПМГМУ им. И.М. Сеченова,
д.м.н., профессор



Воскресенская О.Н.