

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы исследования.

Репаративная регенерация костной ткани является одной из основных проблем практической медицины, среди которых главенствующую роль занимают травматология и ортопедия, а также челюстно-лицевая хирургия и хирургическая стоматология. В связи с этим многие исследователи не прекращают поиск индукторов – веществ, усиливающих процессы остеогенеза. Опиоиды являются одним из таких классов веществ и наиболее перспективным считается даларгин, давно и систематически используемый в лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки препарат. Известно, что этот препарат не проникает через гематоэнцефалический барьер и не обладает наркотическим действием. Однако его способность в репарации костной ткани практически не изучена.

С связи с вышеизложенным актуальность проведенного автором исследования не вызывает сомнений. Цель, поставленная в данном диссертационном исследовании, - изучение влияние опиоида периферического действия даларгина на репаративную регенерацию костной ткани *in vivo* и пролиферацию нормальных и опухолевых клеток костной ткани *in vitro* логична, поскольку оценку туморогенной активности препарата следует проводить на культурах клеток, что исключит влияние интегративных систем, в то время как исследования *in vivo* дает возможность оценить влияние опиоида на целом организме.

Представленная диссертационная работа в значительной степени новаторская, о чем свидетельствует отдельная глава результатов собственных исследований, посвященная разработке и усовершенствованию методов исследования и являющаяся одной из самых больших глав. Это и понятно, поскольку автору пришлось практически разрабатывать целый ряд методических приемов и подходов, используемые в дальнейшей работе. Это и разработка способа формирования критического дефекта теменных костей, и метода двойного флуорохромного мечения, подготовки костных шлифов для анализа флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопией. Наряду с этими методами в работе использованы и традиционные методы с декальцинацией костной ткани и их окрашиванием гематоксилин-эозином.

Для изучения используется широкий набор морфологических (микроскопических) методов, часть из которых была разработана в ходе проведения работы. Основные положения диссертации, выводы основаны на результатах собственных исследований соискателя, выполненных на достаточном экспериментальном материале с помощью современных и разнообразных морфологических методов, включающих в себя световую, флуоресцентную и конфокальную микроскопию, а также анализ изображений и методы математического моделирования. Достоверность их не вызывает сомнения.

Диссертация представляет собой завершенное исследование и написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, а также выводов и списка литературы, включающего 111 источников на русском и иностранных языках. Иллюстративный материал включает 39 рисунков и 4 таблиц.

Научная новизна исследования и достоверность полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.

В работе, с использованием разработанных, оригинальных методов показано, что механизм действия даларгина как *in vitro*, так и *in vivo* реализуется путем стимуляции пролиферации, а не дифференцировки остеогенных клеток.

На разработанной модели критического дефекта теменных костей автор впервые показал, что неоостогенез подавляется под действием даларгина, однако в сочетании с налоксоном этот процесс стимулируется.

Автором впервые было выполнено сравнение пролиферативной активности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их «опухолевого эквивалента» - клеток линии HOS - под действием опиоидов. Показано противоопухолевое действие даларгина, подавляющего пролиферацию линии клеток остеосаркомы. Установлено, что в пределах одного дифферона даларгин стимулирует пролиферацию незрелых клеток и не влияет на зрелые.

Особое внимание было обращено на разработку математической модели «резанный цилиндр», позволяющей более точно оценить дефект костной ткани цилиндрической формы, а именно, критического дефекта теменных костей крыс. Эта математическая модель позволяет автоматически позиционировать срезы в пространстве и наиболее точным образом описывает контур дефекта. Это особенно важно при проведении двойного мечения флуорохромами для оценки динамики неоостогенеза в пространстве.

Все вышеизложенное позволяет сказать о достоверности и обоснованности полученных автором положений, изложенных в диссертации.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы.

Разработанные автором новые подходы для объективной оценки регенерации костной ткани позволяют провести более точную

количественную оценку этого процесса и повысить качество исследований при изучении репаративной регенерации костной ткани *in vivo*.

В то же время данные о подавлении даларгином пролиферации остеосаркомы в дальнейшем могут быть использованы для разработки новых методов лечения костных опухолей.

Также хотелось бы отметить, что новые методические разработки автора, представленные в диссертации (прежде всего заливка костной ткани в метакрилаты и приготовление костных шлифов, а также разработанная математическая модель «резанный цилиндр») найдут свое широкое применение в дальнейшей научной работе.

Полученные результаты выполнены на достаточном количестве животных с использованием адекватных статистических методов обработки и являются достоверными. Они были представлены на 4 конференциях, а по материалам диссертационной работы опубликовано 4 научные работы, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

Как при анализе любой диссертационной работы при ее чтении возникли некоторые критические замечания, которые ни в коей мере не умаляют ее значение. Показалось не очень удобным размещение списка сокращений в конце диссертации, что несколько затрудняет чтение.

Что касается орфографических ошибок, то их количество минимально, однако некоторые из них имеют серьезное значение. Так, на странице 48 (6 строка снизу) указано, что изотонический раствор хлорида натрия 0,09%, хотя в такой концентрации он уже является гипотоническим.

Следует отметить высокое качество фотографий с выверенным балансом белого, однако в подписях к ним указано увеличение объектива, в то время как удобнее было бы иметь маркерную линию на изображении.

Осталось несколько непонятным введение терминов «объемная морфометрия», «3D морфометрия» в то время как уже существует давно

термин «стереология». Если в этом нет нового наполнения, то это создает только путаницу.

На рис.30 в подписях указано, что это относительный объем регенерата, измеренный по данным рентгенографии, хотя там же на оси ординат указано, что это относительная площадь регенерата и ниже указано, что столбики разделены по данным флуоресцентной микроскопии.

Хотелось бы понять, где с диссертации используется модель «резанного цилиндра» применительно к исследованию действия даларгина?

Эти замечания не носят принципиального характера, скорее являются пожеланиями на будущее.

В целом диссертационное исследование А.В. Васильева выполнено на очень профессиональном уровне, все иллюстрации (микрофотографии, графики) безукоризненны, а все поставленные методы исследования выполнены технически грамотно. Диссертация изложена хорошим языком и логически выстроена. Представленное исследование является завершенным и обоснованным.

Автореферат полностью соответствует диссертации, а выводы диссертационного исследования полностью соответствуют поставленным задачам. Все содержание диссертационного исследования автора изложено в публикациях, в том числе в журналах списка ВАК.

Заключение

Диссертация Васильева Андрея Вячеславовича «Влияние опиоида периферического действия даларгина на клеточную пролиферацию *in vitro* и reparативную регенерацию костной ткани *in vivo*», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология, выполненная под руководством доктора биологических наук Г.Б. Большаковой и доктора

биологических наук, профессора Д.В. Гольдштейна является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача современной клеточной биологии, цитологии и гистологии – оценка влияния опиоидов периферического действия на reparативную регенерацию костной ткани на примере готового препарата опиоида периферического действия «Даларгина». Результаты диссертационного исследования имеют большое научно-практическое значение для гистологии, фармакологии, травматологии и ортопедии, хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Васильева Андрея Вячеславовича соответствует П.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842, в части требований, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

1 февраля 2016 года

Ведущий научный сотрудник
Факультета фундаментальной медицины
МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор медицинских наук (специальность
14.00.23 – гистология, цитология и эмбриология)



Буравков С.В.

ЗАВЕРЯЮ:

Декан факультета фундаментальной медицины
МГУ имени М.В. Ломоносова,
профессор, академик

119192 г. Москва,
Ломоносовский проспект, 27 стр.1
+7 (495) 932-88-14, (499) 726-55-47
info@fbm.msu.ru



Ткачук В.А.