

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д001.004.01 НА БАЗЕ ФГБНУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА МЕДИЦИНСКИХ НАУК

аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 25 февраля 2016 г. №1

о присуждении Васильеву Андрею Вячеславовичу, гражданину Российской Федерации ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Влияние опиоида периферического действия даларгина на клеточную пролиферацию *in vitro* и репаративную регенерацию костной ткани *in vivo*» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология принята к защите 22 октября 2015 года протокол №16 диссертационным советом Д 001.004.01 на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418 г. Москва, ул. Цюрупы, д.3), сайт организации [www. morfolhum.ru](http://www.morfolhum.ru), созданном в соответствии с приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Васильев Андрей Вячеславович 1989 года рождения. В 2012 году соискатель окончил Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова. Работает научным сотрудником в лаборатории роста и развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека».

Диссертация выполнена в лаборатории роста и развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и лаборатории генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетической научный центр». Научные руководители: 1. Большакова Галина Борисовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией роста и развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»; 2. Гольдштейн Дмитрий Вадимович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетической научный центр».

Официальные оппоненты: 1. Шехтер Анатолий Борисович, доктор

медицинских наук, профессор, зав. лабораторией экспериментальной морфологии НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова 2. Буравков Сергей Валентинович, доктор медицинских наук, в.н.с. лаборатории анализа изображения клеточных структур кафедры экологической и экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация ГБОУ ВПО Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук, профессором кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета Сухоруковым В.С. и заведующей кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета, доктором медицинских наук, профессором Глинкиной В.В. указано, что диссертация Васильева А.В. 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, гистология, а сам автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук. Соискатель имеет 11 опубликованных научных работ, в том числе 7 - по теме диссертации, из них 3 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 1 статья в журнале, не входящем в список ВАК РФ, 3 публикации в материалах научных конференций. Все публикации написаны в соавторстве, в 6 из них соискатель является первым автором, общий объем публикаций 51 страница.

Наиболее значимые работы:

1. Влияние даларгина на reparативную регенерацию критического дефекта теменных костей крыс / Васильев А.В., Большакова Г.Б. // Морфологические ведомости. – 2014. – № 4. – С.11-18
2. Влияние даларгина на пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стromальных клеток, дермальных фибробластов и клеток остеосаркомы человека

in vitro / Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Большая Г.Б., Гольдштейн Д.В. // Гены и клетки. – 2014. – № 4. – С. 76-80

3. Характеристика неоостеогенеза на модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью традиционной и трёхмерной морфометрии. / Васильев А.В., Волков А.В., Большая Г.Б., Гольдштейн Д.В. // Гены и клетки. – 2014. – № 4. – С. 121- 127

На диссертацию и автореферат поступили отзывы: 1. От доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой патологической анатомии Медицинского института РУДН Бабиченко Игоря Ивановича; 2. Доктора биологических наук, главного научного сотрудника, руководителя группы экспериментальной нейробиологии ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Александровой Марии Анатольевны.

Отзывы положительные, критических замечаний в отзывах по представленной работе нет. Отзывы содержат информацию об актуальности настоящего исследования, новизне полученных результатов и значимости их для науки и практики. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на достаточном научном уровне, выводы диссертации достоверны и полностью отражают поставленные задачи.

Выбор ГБОУ ВПО Российской национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова МЗ РФ в качестве ведущей организации обоснован тем, что на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета ведущими специалистами в течение многих лет проводятся исследования по морфологии костной ткани в норме и при различной патологии. **Выбор оппонентов обоснован тем, что :** 1. Шехтер Анатолий Борисович, доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией экспериментальной морфологии НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова является одним из ведущих специалистов в области экспериментальной морфологии соединительной ткани, регенеративной медицины 2. Буравков Сергей Валентинович, доктор медицинских наук, в.н.с. лаборатории анализа изображения клеточных структур кафедры экологической и

экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова является одним из ведущих специалистов в области трехмерного анализа структуры биологических объектов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: **разработана** новая научная идея о модулирующем влиянии опиоидов на регенерацию костной ткани; **предложена** оригинальная научная гипотеза о разнонаправленных эффектах действия агонистов δ -опиоидных рецепторов на пролиферативные процессы при репаративной регенерации и опухолевом росте; полученные результаты открывают перспективы для разработки новых подходов к применению лекарственных препаратов, модулирующих активность опиоидных рецепторов и регенераторные процессы в костной ткани; **доказана** перспективность использования разработанных методов морфологической и стереометрической оценки костного регенерата при критических дефектах плоских костей.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказаны следующие положения: длительное курсовое введение агониста периферических δ -опиоидных рецепторов - даларгина - замедляет репаративную регенерацию костной ткани. Одновременное введение даларгина и налоксона (антагониста δ -опиоидных рецепторов) стимулирует пролиферацию клеток-предшественников и не влияет на их последующую дифференцировку, что приводит к снижению объема костного регенерата. Даларгин не оказывает влияния на пролиферацию зрелых клеток соединительной ткани – дермальных фибробластов - и оказывает выраженное антитролиферативное действие на клетки остеосаркомы линии HOS, уменьшая их прирост к 3-м суткам на 22- 34%. По сравнению с существующими, разработанный метод стереометрии – математическая модель «резаный цилиндр» - позволяет провести более точную оценку объема регенерата.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования регенерата костной ткани, включающих модифицированный протокол двойного мечения

тетрациклиноподобными метками регенерирующей костной ткани; изготовление серийных шлифов с последующей флуоресцентной и конфокальной микроскопией; трехмерную реконструкцию регенерата с последующей стереометрией, основанной на оригинальном математическом способе оценки («резаный цилиндр»), позволяющим получить объемные морфометрические характеристики на основе плоскостных параметров; морфологическое исследование клеточного состава регенерата; культуральные методы; **изложены** доказательства того, что под действием даларгина происходит снижение объёма костного регенерата. **Представлены** доказательства механизмов действия даларгина и выявлена его оптимальная для стимуляции пролиферации концентрация; **раскрыты** существенные механизмы разнонаправленных эффектов стимуляции опиоидных рецепторов относительно процессов пролиферации нормальных и опухолевых клеток в культуре. **Проведена модификация** протокола двойного мечения тетрациклиноподобными метками применительно к модели критического дефекта теменной кости у крыс. **Разработана** трехмерная стереометрическая математическая модель реконструкции цилиндрических объектов на основе гистологических срезов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: данные о подавлении даларгином пролиферативной активности клеток остеосаркомы линии HOS могут быть **использованы для разработки** новых подходов к исследованию его антиобластомогенных свойств и определены механизмы влияния даларгина на процессы репаративной регенерации костной ткани; разработаны новые подходы для объективной стереометрии костных регенераторов, позволяющие повысить информативность этих исследований. **Определены перспективы** разработки новых подходов для воздействия на процессы репаративной регенерации костной ткани.

Оценка достоверности результатов работы выявила: результаты получены на сертифицированном оборудовании с использованием современных приборов и специализированных программ анализа. Гистологическое оборудование:

конфокальный микроскоп (Leica TCS SP8 X), флуоресцентный микроскоп Leica DM 4000 (Германия), цифровая камера Leica DFC 310 FX) с использованием систем светофильтров GFP (возбуждающий фильтр – 470/40, пропускающий – 525/50), «S-Orange» (546/12, 585/40), DAPI ET (350/50, 460/50), микроскоп Биомед 6 ЛЮМ (Корея), санный микротом (Microm HM 430, Thermo Scientific, Германия); программное обеспечение - Visage Imaging Amira v5.5 (США), GraphPad Prism 6, (США) SigmaStat 3.5 (SyStat Software), аппарат автоматического счёта клеток - "Пикоскель ПС-4М" (ООО «НПВ Лабовэй», Россия). **Теоретическое обоснование** исследования построено на известных данных о том, что агонист δ -опиоидных рецепторов даларагин оказывает стимулирующее воздействие на репаративную регенерацию эпителиальных тканей и улучшает показатели микрогемодинамики; **идея исследования базируется** на анализе данных других авторов о том, что существует связь между экспрессией гена проэнкефалина в созревающих остеобластах, их дифференцировкой в эмбриональном периоде, что опиодные рецепторы обнаружены на остеобластоподобных клетках линии остеосаркомы MG-63; **использовано сравнение** собственных результатов и данных, полученных ранее другими исследователями по тематике, посвященной влиянию факторов роста на репаративную регенерацию костной ткани и опиоидов на регенерацию других тканей; **установлено совпадение части полученных результатов** с данными, представленными в независимых источниках по данной тематике, в частности о том, что опиоиды ингибируют пролиферацию опухолевых клеточных линий, но стимулируют пролиферацию не опухолевых клеток в системе *in vitro*; **использованы** репрезентативные опытные и контрольные группы животных, а также современные методики сбора и анализа полученных результатов.

Личный вклад соискателя состоит в: анализе литературы и определении научной проблемы, планировании исследования, культуральной работе и проведении эксперимента, обработке и анализе результатов, выполнении стереометрического анализа и трехмерной реконструкции исследуемых образцов, проведении рентгенологического исследования, разработке новых и

модификации существующих методов подготовки и количественного анализа критических дефектов теменных костей крыс, статистическом анализе данных, интерпретации результатов и подготовке публикаций по выполненной работе.

На заседании 25 февраля 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Васильеву А.В. ученую степень кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали: за - 18, против - нет недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета Д 001.004.01

Член-корр. РАН



погружной

Л.В. Кактурский

Ученый секретарь диссертационного совета Д 001.004.01

Д.М.Н.

Ми

Л.П.Михайлова

«26» февраля 2016 г.