

Отзыв

официального оппонента

доктора медицинских наук, Бланк Ольги Алексеевны
на диссертацию и автореферат Губаревой Екатерины Александровны
на тему «Влияние постоянного освещения и введения мелатонина на
канцерогенез и экспрессию часовых генов в опухолях у мышей»,
выполненную под научным руководством доктора медицинских наук,
профессора, члена-корреспондента Российской академии наук

В.Н. Анисимова

и представленную на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы диссертационного исследования

Известно, что десинхроноз, вызванный нарушениями светового режима природного, техногенного и социального происхождения, способствует повышению заболеваемости злокачественными новообразованиями. В то же время, установлено, что течение опухолевого процесса сопровождается нарушением циркадианной составляющей биологических ритмов организма больного человека и появлением «патологических» ритмов с другой периодичностью. Молекулярно-генетический механизм этих явлений изучен недостаточно. Также остаётся неисследованной иерархия этих патологических состояний. Не ясно, является ли десинхроноз одним из предрасполагающих к канцерогенезу факторов, или его можно расценивать как паранеопластический синдром, отражающий активность опухолевого процесса. Возможно, что оба эти свойства присущи десинхронозу.

Результаты изучения механизмов действия мелатонина также неоднозначны, несмотря на то, что этот препарат широко используют в терапии различных, в том числе и неопухолевых, заболеваний. Влияние мелатонина на химический канцерогенез у животных с индуцированным постоянным освещением десинхронозом не изучено.

Всё перечисленное объясняет актуальность и целесообразность предпринятого Е.А. Губаревой исследования.

Научная новизна исследования и достоверность, полученных результатов

Автором впервые произведено сравнение уровней экспрессии часовых генов и содержания их белковых продуктов в опухолях различного гистогенеза и в нормальных тканях животных – опухоленосителей. Выявлены различия в содержании часовых белков в нормальных тканях экспериментальных животных и в индуцированных у них опухолях лёгкого и кожи, а также увеличение содержания часовых белков-активаторов транскрипции в ткани опухолей разного гистогенеза.

Изменение суточной динамики экспрессии часовых генов в нормальных тканях супрадиафрагматического ядра и печени у животных со злокачественными опухолями молочной железы также описано впервые.

Существенным аспектом, определяющим научную новизну исследования Е.А. Губаревой, является изучение противоопухолевого действия экзогенного мелатонина, проявившего эффективность только в условиях постоянного освещения.

Достоверность представленных автором результатов обусловлена чётким и прозрачным дизайном экспериментов с формированием путём рандомизации достаточных, сопоставимых групп лабораторных животных, а также использованием конвенциональных моделей канцерогенеза и современных методов патоморфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований. Статистическая обработка полученных данных проведена надлежащим образом, с использованием целого спектра современных и надёжных математических процедур.

Научно-практическая значимость

На новом уровне, с использованием молекулярно-генетических

методов, автором доказана сопряжённость десинхроноза и опухолевого процесса. Так, нарушение суточных ритмов, вызванное постоянным освещением, служит промотором химического канцерогенеза, а течение опухолевого процесса приводит к изменению ритмов экспрессии генов как в опухолевой ткани, так и в супрахиазматическом ядре, влияющем на циркадианные ритмы всего организма. Полученные данные расширяют теоретические представления о роли часовых генов и белков в развитии опухолевого процесса.

Результаты исследования, проведённого Е.А. Губаревой, являются экспериментальным обоснованием, необходимым для развития зарождающегося направления в лечении онкологических заболеваний путём восстановления нормальной временной структуры организма-опухоленосителя. Они доказывают перспективность дальнейших исследований противоопухолевого эффекта мелатонина в группах риска.

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа изложена на 162 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка иллюстраций и списка литературы. Последний включает в себя 273 источника, из них 261 на иностранных языках. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 41 рисунком.

Во **введении**, обосновывая актуальность исследования, автор констатирует недостаточный уровень современных знаний о взаимосвязи десинхроноза и канцерогенеза, о механизмах противоопухолевого действия мелатонина и об изменениях молекулярно-генетических характеристик опухоли и здоровых тканей организма опухоленосителя во времени.

Цель исследования сформулирована как «оценка влияния постоянного освещения и введения мелатонина на химически

индуцированный канцерогенез у мышей; оценка экспрессии часовых генов и их белковых продуктов в опухолях различных локализаций». Шесть задач исследования соответствуют поставленной цели и охватывают все аспекты диссертационной работы.

В этом же разделе Е.А. Губарева описывает научную новизну и научно-практическую значимость выполненной работы, методологию и методы исследования, а также приводит положения, выносимые на защиту. Полагаю, что подраздел «Методология и методы исследования», не подкреплённый конкретными сведениями, выглядит несколько декларативно. Было бы уместнее разместить его во 2 главе диссертации.

Далее традиционно приведены сведения о степени достоверности и апробации работы, публикациях и личном вкладе автора, соответствии диссертации паспорту научной специальности, структуре и объёме диссертации. Венчают раздел благодарности научному руководителю и коллективу.

Первая глава (**Обзор литературы**) содержит подробный анализ эволюционной обусловленности циркадианных ритмов, их физиологических механизмов, включая молекулярные, принципы регуляции «внутренних часов» клеток, тканей, органов и организма в целом. Автор подчёркивает роль смены дня и ночи как внешнего синхронизатора циркадианных ритмов и приводит данные о десинхронозах, вызываемых нарушениями режима освещённости как природного, так и техногенного характера. В полном соответствии с заявленной темой исследования Е.А. Губарева анализирует роль мелатонина в регуляции часовых генов и циркадианных ритмов.

Наибольший интерес вызвал раздел 1.2., озаглавленный «Нарушение циркадианных ритмов и опухолевый процесс». Екатерина Александровна чутко уловила нерешённую до сих пор проблему: является ли десинхроноз фактором, предрасполагающим к развитию опухоли, или сопутствует опухолевому росту как патологический синдром.

В этом же разделе Екатерина Александровна анализирует уже известные механизмы противоопухолевого действия мелатонина, противоречия в результатах исследований других авторов и выделяет ещё нерешённые вопросы.

Вторая глава (**Материалы и методы**) построена чётко и лаконично, при этом она содержит все необходимые сведения, поэтапно характеризующие проведённые эксперименты. Дизайн, материалы и методы исследования полностью отвечают условиям, необходимым для решения поставленных автором задач. Описание методов статистической обработки, использованных для оценки полученных результатов, убеждает в их достоверности.

В 3 главе последовательно, в соответствии с порядком поставленных задач, автор изложила **результаты собственных исследований**. Описание результатов каждого эксперимента хорошо иллюстрировано таблицами и рисунками.

На моделях химически индуцированных опухолей лёгкого и кожи доказано неблагоприятное действие постоянного освещения, проявившееся в увеличении доли крупных опухолевых узлов и повышении частоты образования опухолей соответственно. Применение экзогенного мелатонина статистически значимо нивелировало это негативное воздействие в группах животных, содержащихся в условиях постоянного освещения.

Изучение экспрессии часовых генов и содержания часовых белков в химически индуцированных опухолях и нормальных тканях животных, содержащихся в режимах смены дня и ночи или постоянного освещения, выявило разнонаправленные изменения. Полагаю, что дальнейшие исследования особенностей «молекулярно-генетических часов» новообразований, различающихся гистогенезом, локализацией, степенью дифференцировки и проч., покажут насколько разнородны принципы и механизмы временной организации злокачественных опухолей.

Эксперименты, посвящённые изучению изменений экспрессии часовых генов и динамики пролиферации клеток здоровых тканей и спонтанных опухолей у животных, были лично для меня особенно интересны. На молекулярно-генетическом и морфологическом уровнях они подтвердили нарушения временной организации организма, сопровождающее течение опухолевого процесса, которое мы обнаружили на уровне общих показателей жизнедеятельности (частота сердечных сокращений и температура тела) у людей больных злокачественными лимфомами и солидными опухолями.

В 4 главе (**Обсуждение результатов собственных исследований**) также последовательно и систематично автор анализирует и сопоставляет результаты собственных экспериментов с данными, полученными другими исследователями и интерпретирует возможные причины различий в оценках противоопухолевого действия мелатонина, использованного на разных моделях и в отличающихся условиях, и приводит краткое **Заключение**.

Глубокий и методичный анализ результатов проведённых Е.А. Губаревой экспериментов позволил ей сформулировать 6 хорошо аргументированных фактическим материалом **выводов**, полностью соответствующих задачам исследования. Третий и пятый выводы довольно объёмны, для облегчения их восприятия каждый можно было без ущерба представить в виде двух выводов (один – об экспрессии генов, другой – о содержании часовых белков).

Основные положения диссертации отражены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах. Результаты исследования были доложены на 10 специализированных конференциях. Автореферат и опубликованные по теме диссертации работы полностью отражают основное содержание диссертационного исследования.

Несмотря на общую высокую положительную оценку диссертационного исследования Е.А. Губаревой, не могу скрыть, что некоторые фрагменты обзора литературных источников вызвали искреннее недоумение и огорчение. По формальным признакам это не может быть

представлено в виде замечаний, поскольку глубина поиска при подготовке кандидатской диссертации ограничена 5, максимум 10 годами.

Так, на стр. 14 среди «основателей хронобиологии» я не обнаружила имени автора теории хронома Франца Хальберга. Эта честь отдана исключительно Колину Питтендраю и Юргену Ашоффу.

Позволю себе также процитировать отрывок работы, исходящей из Национального медицинского исследовательского центра онкологии, носящего имя Н.Н. Петрова, в 1914 году опубликовавшего определение злокачественной опухоли и сформулировавшего признаки злокачественности. На стр. 28 написано: «Концепция ключевых признаков злокачественных опухолей (hallmarks of cancer) была впервые отражена в работе Д. Ханаана и Р. Вайнберга в 2000 г., в 2011 г. она была дополнена и пересмотрена». После прочтения этого фрагмента отсутствие упоминания об исследованиях суточных ритмов пролиферации в нормальных и опухолевых тканях человека и лабораторных животных, выполненных в стенах Центра во второй половине прошлого века, уже не удивило.

Повторю, что по формальным признакам это не может быть расценено как замечание. Диссертация Е.А. Губаревой оформлена в строгом соответствии с современными требованиями, которые, к сожалению, лишают молодых учёных возможности воспользоваться наследием предыдущих поколений, несмотря на то, что стоя на плечах титанов легче дотянуться до вершин.

Замечания непринципиальны, касаются исключительно оформления диссертации и не влияют на её общую высокую положительную оценку.

1. Используемый автором термин «хронобиотики» является сленговым и останется таковым до включения этой группы препаратов в общепринятые классификации и действующую Фармакопею.
2. На стр. 35 в Таблице 1 первый столбец следовало бы назвать не «Локализация», а «Характер», поскольку в перечень включена В-клеточная

диффузная лимфома – опухоль, не имеющая определённой локализации, как и все саркомы.

3. В тексте встречаются цифровые представления числительных и аббревиатуры в начале предложения, а также немногочисленные опечатки.

В качестве рекомендаций, которые могут быть полезны автору в последующей работе, прошу обратить внимание на следующие аспекты. В научных работах, представляемых на территории России, если список литературы сформирован не в порядке упоминания источников в тексте, а в алфавитном порядке, принято первым блоком размещать публикации на русском языке, затем – публикации на иностранных языках. Приведение списка сокращений в начале диссертации свидетельствует о вашей заботе об удобстве читателей.

В плане научной дискуссии прошу автора высказать мнение по следующему **вопросу**: «Является ли десинхроноз фактором, предрасполагающим к развитию опухоли, или сопутствует опухолевому росту как патологический синдром?»

Таким образом, тщательно изучив представленную мне диссертацию и автореферат, я пришла к следующему заключению.

Заключение

Диссертационное исследование Екатерины Александровны Губаревой «Влияние постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез и экспрессию часовых генов в опухолях у мышей», выполненное под руководством члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора В.Н. Анисимова является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих фундаментальное и научно-практическое значение в онкологии. Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных

степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а Е.А. Губарева заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Официальный оппонент
доктор медицинских наук,
старший научный сотрудник,
учёный секретарь

Бланк О.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
имени академика А.М. Гранова» Минздрава России
Адрес: 197758, Санкт-Петербург, поселок Песочный, ул. Ленинградская, д. 70
Телефон: +7 (812) 596-87-68
e-mail: oa_blank@rrcrst.ru

Подпись д.м.н. О.А. Бланк заверяю
Директор ФГБУ
«РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова»
д.м.н. Д.Н. Майстренко



«17» февраля 2020 г.