

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Голенкова Анатолия Константиновича, профессора кафедры терапии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» на диссертацию Карповой Регины Васильевны «Иммуноадгезионные механизмы в развитии экспериментальных опухолей», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия

### Актуальность темы

Диссертационная работа Карповой Регины Васильевны посвящена изучению иммуноадгезионных механизмов взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток-мишеней при развитии экспериментальных опухолей.

Актуальность представленной работы определяется тем, что на современном этапе развития теоретических аспектов патогенеза злокачественных новообразований изучение роли нарушений межклеточных адгезионных взаимодействий в возникновении и прогрессировании опухолей, а также недостаточности противоопухолевого иммунитета является важным направлением исследований.

Экранирование опухоли от иммунологического надзора обеспечивается в том числе снижением экспрессии на опухолевых клетках гистонеспецифических адгезионных молекул ICAM-1, а на клетках эффекторов иммунитета – их лигандов,  $\beta 2$  лейкоцитарных интегринов LFA-1 Mac-1. Нарушение регуляторных сигналов адгезионных механизмов при опухолевом процессе связано также с изменением уровня медиаторов межклеточных взаимодействий - цитокинов, в частности, повышением уровня интерлейкинов 6 и 10.

Вместе с тем учитывая известные из научной литературы геропротекторные, антидепрессантные и противоопухолевые свойства

нейромедиатора дофамина, автор предполагает вероятную роль центральных нейрональных процессов в контроле опухолевого роста.

Очевидно, разработка подходов адекватной коррекции нарушений иммуноадгезионных взаимодействий актуальна для усиления иммунореактивности в отношении злокачественных опухолей, снижения уровня опухолеобразования и повышения продолжительности жизни.

**Степень новизны, достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Автором впервые установлено, что развитие опухолей у генетически предрасположенных мышей СВА сопровождается снижением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, концентрации анаболического гормона тестостерона в сыворотке крови, численности дофаминергических нейронов и пролиферирующих молодых нейронов в головном мозге, а также повышением концентрации ИЛ-6, ИЛ-10 и стресс-гормона кортикостерона в сыворотке крови животных.

Новизна исследования также обусловлена получением новых данных о возможности снижения частоты опухолеобразования, уменьшения количества и объема опухолей, повышения продолжительности жизни животных при сохранении удовлетворительного соматического статуса, сочетающиеся с нормализацией экспрессии лейкоцитарных интегринов на лимфоцитах периферической крови, численности дофаминергических нейронов в головном мозге, концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови.

Несомненно новаторскими можно считать результаты об инфильтрации спонтанных гепатокарцином цитотоксическими CD8+лимфоцитами, экспрессирующими молекулы лейкоцитарных интегринов LFA-1 Mac-1, что может иметь значение для элиминации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни животных.



Оценка изменений параметров с учетом продолжительности жизни проведена автором при воздействии стандартизованного нетоксичного агента – комплексного фитоадаптогена, разработанного на основе принципа рационального взаимодополняющего сочетания биологически активных компонентов, имеющих разные точки приложения в организме. Выбор этот можно считать целесообразным, так как фитоадаптогены, которые давно изучаются в разных аспектах, обладают широким спектром защитного действия на организм, в том числе повышая его противоопухолевую устойчивость.

Режимы воздействия комплексным фитоадаптогеном научно обоснованы на основании широкого спектра предыдущих исследований. Диссертантом было использовано 2 режима воздействия: профилактический - в течение первого месяца жизни животных, включая время завершения дифференцировки нормальной ткани печени; и лечебный - с 6 месячного возраста (время появления первых опухолей) до естественной гибели животного. Для повышения статистической достоверности были использованы жидкая и сухая форма (практически субстанция) комплексного фитоадаптогена, которые не отличаются друг от друга по адаптогенной активности.

В данном исследовании применена адекватная модель спонтанного канцерогенеза. Работа проведена на большом количестве экспериментальных животных – 997 мышей-самцов линии СВА, генетически предрасположенных к развитию опухолей печени, с привлечением современных иммунологических (имуногистохимический, иммунофлуоресцентный, иммуноферментный анализ), морфологических, поведенческих методов. Воздействие фитоадаптогеном в двух формах проведено в профилактическом и лечебном режимах, показатели оценивали в трех точках онтогенеза. Для статистической обработки материала и оценки корреляционных связей параметров использованы соответствующие статистические программы. Объем выборок в группах вполне достаточен для применения статистических критериев оценки и позволяет считать полученные результаты достоверными, а выводы обоснованными.

## **Оценка содержания и оформления диссертации**

Структура диссертации традиционна. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 9 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 216 страницах. Иллюстрации включают 29 таблиц и 28 рисунков. Список литературы содержит ссылки на 449 источников литературы, в том числе 76 - отечественных и 373 - зарубежных.

Во **введении** соискатель представляет актуальность темы исследования и степень ее разработанности, формулирует цель и конкретные задачи работы, научную новизну и теоретически-практическую значимость исследования. Представлены данные о работах, опубликованных по теме диссертации: всего - 70, в том числе 2 патента РФ, 28 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

**В литературном обзоре** автор подробно рассматривает механизмы межклеточной адгезии при опухолевом процессе. Широко представлена характеристика молекул адгезии и цитокинов. Проанализирован вклад дофаминергической системы и, прежде всего, дофамина в противоопухолевую реактивность организма. Описаны известные на сегодняшний день свойства как отдельных растительных адаптогенов, индивидуальных биологически активных компонентов (например, гинзенозидов из женьшеня), так и многокомпонентных фитокомпозиций в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Обоснованы режимы воздействия комплексного фитоадаптогена, используемые в работе.

**Глава 2** «Материалы и методы исследования» дает полное представление о грамотном и современном методическом уровне экспериментальных исследований, который соответствует целям и задачам работы.

**В главах 3-11** приводится обширный материал, посвященный оценке в динамике наблюдения экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови; концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, стресс-гормона



кортикостерона и анаболического гормона тестостерона в сыворотке крови; численности дофаминергических нейронов и молодых пролиферирующих нейронов в головном мозге; частоты опухолеобразования, количества и объема гепатокарцином, продолжительности жизни и соматического статуса мышей СВА, а также степени коррекции показателей при профилактическом и лечебном воздействии комплексным фитоадаптогеном.

Показано, что длительное по времени повышение числа лимфоцитов с экспрессией лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 может быть обеспечено как кратковременным так и долговременным воздействием жидкой и сухой формой комплексного фитоадаптогена. Учитывая свойства этих молекул способствовать контактными взаимодействиями эффекторов иммунитета и клеток-мишеней, проведенные исследования позволяют полагать, что усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов связано с более высокой иммунореактивностью в отношении развивающихся опухолей.

Автором установлено, что спонтанный гепатоканцерогенез у мышей СВА сопровождается повышением концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови. В то же время было показано, что кратковременное и продолжительное применение как жидкого, так и сухого экстракта комплексного фитоадаптогена снижало уровень ИЛ-6 и ИЛ-10 по отношению к контролю. Таким образом, механизмы иммунопротективного действия ИЛ-6 в отношении опухоли могут быть преодолены путем введения фитоадаптогена.

Обобщая полученные результаты по усилению иммунной реактивности мышей СВА в отношении развивающихся опухолей, автором было выявлено замедление злокачественного роста у животных, получавших комплексный фитоадаптоген. Полученные в данной работе результаты увеличения средней продолжительности жизни мышей СВА на 16 % (при кратковременном воздействии комплексным фитоадаптогеном) и 24 % (при долговременном воздействии препаратом) имеют существенное значение, учитывая тот факт, что при этом выявлен противоопухолевый эффект.

Кроме того, у мышей-самцов СВА в процессе онтогенеза на примере двух гормонов – анаболического тестостерона и катаболического кортикостерона - выявлена определенная степень нарушения гормонального баланса, свидетельствующего об усилении катаболических процессов, в частности в лимфоидных органах. В результате исследования было определено уменьшение в крови контрольных животных концентрации тестостерона (который относят к гормонам молодости) и увеличение концентрации кортикостерона (гормона старения). Кратковременное и длительное воздействие комплексным фитоадаптогеном предотвращало возрастное снижение тестостерона. В отношении катаболического гормона кортикостерона фитоадаптоген способствовал торможению возрастающего в онтогенезе параметра. При этом наиболее выраженный эффект наблюдался при длительном применении препарата.

Важно отметить, что гормономодулирующий эффект препарата сочетался с усилением экспрессии лейкоцитарных интегринов, нормализацией уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, лимфоцитарной инфильтрацией и деструкцией гепатокарцином, предотвращением снижения численности дофаминергических нейронов в головном мозге мышей, а также снижением частоты опухолеобразования, количества и объема опухолей, увеличением продолжительности жизни мышей СВА при сохранении удовлетворительного соматического статуса.

В результате морфологического исследования опухоли печени мышей СВА были охарактеризованы автором как умеренно дифференцированные трабекулярные и низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы. При этом у мышей, получавших комплексный фитоадаптоген в профилактическом режиме, опухолей в возрасте 8 месяцев не наблюдали в отличие от контрольных животных. В группе, где животные начали получать препарат с 6 месяцев, в этом же возрасте на срезах опухоли определяли отдельные лейкоциты. В позднем онтогенезе (в возрасте 22 месяцев) у животных и профилактической, и лечебной группы, в опухолях



были ярко выражены деструктивные процессы и выявлена инфильтрация опухолей лимфоцитами. У контрольных животных подобных процессов не отмечено.

В результате иммуногистохимического анализа было выявлено, что эффекторы иммунитета, мигрировавшие в гепатокарциномы мышей, получавших комплексный фитоадаптоген в обоих режимах введения, представляют собой цитотоксические CD8<sup>+</sup>лимфоциты, экспрессирующие CD11a и CB11b лейкоцитарные интегрин, что значимо для торможения опухолеобразования, увеличения продолжительности жизни животных и улучшения их соматического статуса.

В ходе исследований было установлено, что у мышей-самцов СВА к позднему онтогенезу наблюдали ослабление двигательной активности, снижение массы тела с признаками алопеции шерстного покрова с учетом развития опухолевого процесса у всех животных. У животных, принимавших комплексный фитоадаптоген при разных схемах введения, не зафиксированы признаки похудания и аллопеции в сочетании с лучшей выживаемостью и снижением уровня опухолеобразования.

Изучение показателей дофаминергических нейронов головного мозга мышей СВА в онтогенезе показало, что и кратковременное и длительное воздействие комплексным фитоадаптогеном предупреждало снижение уровня дофаминергических нейронов. Поскольку в данном случае развиваются не только процессы старения, но и процессы спонтанного гепатоканцерогенеза, вышеуказанный эффект может быть опосредован влиянием как на то, так и на другое, а также на оба процесса одновременно.

В разделе «Заключение» автор обобщает собственные результаты исследования и анализирует их в сравнении с данными отечественных и зарубежных работ. Четко сформулированные выводы логически вытекают из результатов исследования.

Автореферат полностью отражает проведенные исследования.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Научно-практическая значимость результатов диссертации определяется тем, что автором на примере экспериментального спонтанного канцерогенеза обоснована возможность регуляции периферических иммуноадгезионных механизмов с участием лейкоцитарных интегринов и сигнальной реактивности цитокинов, сывороточного содержания стресс-гормона кортикостерона и тестостерона, численности дофаминергических нейронов в головном мозге, имеющей значение для замедления процесса опухолеобразования, повышения выживаемости при сохранении удовлетворительного соматического статуса.

Полученные результаты могут внести существенный вклад в ослабление механизмов ускользания опухоли от иммунологического надзора и усиление реализации противоопухолевой иммунореактивности организма, имеющей важное значение для онкологии.

Учитывая, что на современном этапе развития методов иммунотерапии онкологических заболеваний индукция цитотоксических CD8<sup>+</sup>лимфоцитов является одной из основных задач, полученные в работе результаты о лимфоцитарной инфильтрации гепатокарцином, сочетающиеся с повышением выживаемости высокоразвитых животных, имеют научно-практическое значение.

Выбранная линия мышей, а также представленный комплекс параметров (экспрессия лейкоцитарных интегринов LFA и Mac-1 на клетках периферической крови, уровень ИЛ-6, ИЛ-10, гормонов кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови, численность дофаминергических нейронов, фенотип опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, а также уровень опухолеобразования, продолжительность жизни и соматический статус животных) могут быть применены для изучения нетоксичных препаратов, перспективных для профилактики у лиц с повышенным риском развития злокачественных новообразований, а также с целью замедления процесса, особенно при гепатокарциномах.



## **Апробация работы и внедрение результатов в практику**

Основные результаты диссертации отражены в публикациях по теме исследования. Карповой Р.В. в соавторстве опубликовано 70 научных работ, в том числе 28 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Разработаны 2 методических руководства: 1) - способ оценки противоопухолевой активности иммуномодуляторов *in vivo* на модели спонтанного гепатоканцерогенеза; 2) - способ оценки профилактической активности иммуномодуляторов в отношении опухолей на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей. Работа поддержана двумя патентами Российской Федерации. Основные положения диссертации были представлены автором на российских и международных научных конгрессах и конференциях.

Тест-система с учетом иммуноадгезионных показателей периферической крови и фенотипа опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, численности дофаминергических нейронов в головном мозге, уровня опухолеобразования, а также выживаемости и соматического состояния мышей-самцов СВА применяется для поиска потенциальных компонентов профилактических и биотерапевтических воздействий для онкологических больных.

## **Заключение**

Диссертационная работа Карповой Регины Васильевны «Имуноадгезионные механизмы в развитии экспериментальных опухолей» является законченным научно-квалификационным трудом, в котором получена совокупность фундаментальных данных, открывающих новое направление разработки профилактических и лечебных мер в отношении злокачественных новообразований на основе направленной коррекции иммуноадгезионных механизмов, имеющих важное значение для усиления иммунореактивности организма против опухолей. Диссертация соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013

года №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168, от 11 сентября 2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а соискатель Карпова Регина Васильевна достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Профессор кафедры терапии  
ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского  
д.м.н., профессор

Голенков А.К.

« 14 » декабрь 2021 г.

Подпись д.м.н., профессора  
Голенкова А.К. удостоверяю

Учёный секретарь ГБУЗ МО МОНИКИ  
им. М. Ф. Владимирского  
д.м.н., профессор



Берестень Н.Ф.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области  
«Московский областной научно-исследовательский клинический институт им.  
М. Ф. Владимирского»

Адрес: 129110, г. Москва, ул. Щепкина 61/2, корпус 1.

Тел.: 8(499)674-07-09

E-mail: [moniki@monikiweb.ru](mailto:moniki@monikiweb.ru)