

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.м.н. Цейликман Ольги Борисовны на диссертационную работу Шафигуллиной Златы Александровны «Характеристика регенерации печени при диффузном токсическом повреждении и его коррекция», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Шафигуллиной З.А. посвящена одной из актуальных проблем гепатологии. К числу частых патологий печени относятся острые токсические поражения, осложняющиеся развитием печеночной недостаточности при отравлении гепатотоксичными ядами, приеме больших доз анальгезирующих, противовоспалительных, антибактериальных и других лекарственных препаратов. Все это определяет необходимость поиска новых резервов, а также методов коррекции, направленных на поддержание структурной целостности и функциональной стабильности печени. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению регенерации печени, изменения в органе, которые определяют характер восстановительных процессов на ранних сроках токсического повреждения, остаются недостаточно изученными. Именно поэтому целью диссертационного исследования Златы Александровны Шафигуллиной было охарактеризовать регенераторные процессы в печени на ранних стадиях диффузного токсического повреждения и его коррекции аминофталгидразидом натрия.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы Шафигуллиной З.А. имеют ценность для науки и практики. Все сформулированные автором положения и выводы, без сомнения, расширяют представление об особенностях регенераторного процесса в печени на ранних сроках после воздействия гепатотропного яда тетрахлорметана. Практическая значимость работы обусловлена новыми данными об изменении количественного соотношения непаренхиматозных клеток печени на ранних стадиях диффузного токсического повреждения. Материалы работы могут быть применены в качестве дополнительных клинико-диагностических методов, а также для разработки подходов коррекции токсического повреждения печени, основанных на изменении морфофункционального состояния макрофагов.

Обоснованность и достоверность результатов исследования. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой, основанной на достаточном объеме выборки экспериментальных животных и выполнена с применением современных методов исследования. Научные положения, выводы и практические рекомендации,

представленные в диссертации, изложены четко и конкретно. Выводы достоверны, достаточно аргументированы и отвечают поставленной цели и задачам.

Достоверность и новизна полученных результатов. Диссертация оформлена грамотно, имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием используемых материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований. Достоверность материалов, включенных в диссертацию, подтверждается правильным выбором дизайна эксперимента и достаточным количеством объектов исследования (работа выполнена на 90 крысах самцах линии Wistar). Автором применены современные биохимические, гистологические и иммуногистохимические, иммуноферментные методы исследования, адекватные поставленной цели и решаемым задачам, позволяющие наиболее полно и точно охарактеризовать течение регенераторных процессов в печени на ранних сроках после введения гепатотропного яда.

В диссертационной работе Шафигуллиной З.А. впервые на ранних сроках токсического повреждения печени гепатотропным ядом тетрахлорметаном проведена оценка показателей клеточной и внутриклеточной регенерации гепатоцитов, степени апоптоза и фиброза, количественного изменения макрофагов (F4/80⁺), синусоидальных эндотелиальных клеток, CD45⁺, CD3⁺, тучных клеток в ткани печени, а также продукции белков теплового шока (HSP60, HSP70), концентрации основных про- и противовоспалительных цитокинов. Показано, что воздействие на макрофаги аминофталгидразидом натрия при CCl₄-интоксикации способствует увеличению числа макрофагов (F4/80) и синусоидальных эндотелиальных клеток в ткани печени, уменьшает количество очаговых некрозов гепатоцитов, снижает степень фиброза и инфильтрации ткани лейкоцитами CD3⁺, CD45⁺. Действие аминофталгидразида натрия, обладающего свойством модуляции активности моноцитов-макрофагов и антиокислительной активностью, сопровождается нормализацией биохимических показателей, а также снижением концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-18 в плазме крови и уменьшением уровня IL-6 и IFN- γ в ткани печени.

Публикации. Результаты исследований З.А. Шафигуллиной прошли апробацию на российских и международных научно-практических конференциях. Основные результаты исследования опубликованы в 12 печатных работах, из которых 3 статьи - в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах (2 – в Scopus, 1 – в Web of Science), 6 статей в изданиях, рецензированных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки РФ и 3 – тезисы и материалы конференций.

Оценка содержания работы. Диссертация изложена на 151 странице печатного текста и состоит из введения, обзора литературы по исследуемому вопросу, описания экспериментальных животных и методики эксперимента, четырёх глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 250 источников, среди которых 44 русскоязычных и 206 англоязычных. Работа содержит 16 таблиц и 10 рисунков.

Во введении к работе автор четко обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель исследования и задачи, поставленные для ее реализации, а также положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы подробно освещено представление о регенераторном потенциале печени в условиях физиологической нормы и при токсическом повреждении. Автором подробно описаны как классические сведения, так и современные результаты исследований, касающиеся особенностей диффузного токсического гепатита, а также вклад в регенерацию печени паренхиматозных клеток, синусоидальных эндотелиальных клеток, резидентных макрофагов, лимфоцитов и тучных клеток.

В обзоре литературы также отражены особенности регуляции печени цитокинами и ростовыми факторами. Детально рассмотрены белки HSP70 и HSP60 в качестве факторов, ограничивающих масштабы повреждений органов на клеточном уровне. Подробно проанализирована способность этих белков препятствовать апоптозу.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методологические подходы, применяемые для решения задач диссертационного исследования. Для решения поставленных задач автор использовал валидированную экспериментальную модель индукции диффузного токсического гепатита тетрахорметаном. Для коррекции токсического повреждения печени у экспериментальных животных использовали аминофталгидразид натрия. Иммуногистохимическое исследование печени проводили с использованием антител для выявления пролиферирующих гепатоцитов, макрофагов печени, CD3⁺, CD45⁺ клеток, HSP60- и HSP70-положительных гепатоцитов. Апоптозные гепатоциты визуализировались с помощью TUNEL метода. Концентрации IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α и SCF в плазме крови и IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , SCF в ткани печени экспериментальных животных определяли методом иммуноферментного анализа. Применение автором современных методов исследования обеспечило надежность полученных результатов.

Результаты собственных исследований автора изложены в четырех последующих главах. Глава 3 посвящена характеристике особенностей процесса регенерации печени на ранних стадиях диффузного токсического повреждения и его коррекции

аминофталгидразидом натрия. В главе 4 рассмотрены функциональные показатели повреждения печени (биохимические и гематологические параметры) при экспериментальном токсическом гепатите и его коррекции. Глава 5 посвящена изучению реакции клеточного компонента стромы ($CD45^+$, $CD3^+$ лейкоцитов, F4/80 макрофагов, синусоидальных эндотелиальных и тучных клеток) в регуляции регенераторных процессов печени при диффузном токсическом повреждении и при воздействии аминофталгидразида натрия. В главе 6 приведен сравнительный анализ цитокинового профиля плазмы крови и ткани печени экспериментальных животных в условиях физиологической нормы, а также в динамике диффузного токсического повреждения и его коррекции.

Автором установлено наличие у экспериментальных животных признаков повреждения печени в виде цитолиза, внутреннего холестаза, умеренном снижении синтетической функции органа уже на ранних этапах развития токсического гепатита. Причем, деструктивные изменения нарастали по мере увеличения срока токсического воздействия и проявлялись в виде очаговых некрозов, анизоцитоза и анизонуклеоза гепатоцитов, наличия клеток с признаками крупнокапельной вакуолярной дистрофии, полнокровия центральных вен и вен портальных трактов печени, лимфо-лейкоцитарной инфильтрации. Тем не менее, отмечена активизация адаптивно-компенсаторных механизмов.

Наличие внутриклеточной регенерации отмечено на 7-е сутки после воздействия токсиканта, которая выражалась в снижении митотического индекса при одновременном повышении количества двуядерных гепатоцитов и в увеличении количества гепатоцитов с гранулами, содержащими HSP60. Так, при токсическом диффузном гепатите было зафиксировано увеличение числа тучных клеток и снижение их оптической плотности, свидетельствующей о высвобождении содержимого во внеклеточное пространство. Однако этих адаптивных реакций оказалось недостаточно и к 14 суткам от введения токсиканта отмечено фиброзирование органа. Установлено, что процессы регенерации поврежденной печени сопровождалась миграцией иммунокомпетентных клеток. Количественная оценка $CD45^+$ и $CD3^+$ клеток показала, что при интоксикации CCl_4 , в ранние сроки, возрастала лимфо-лейкоцитарная инфильтрация паренхимы печени и периваскулярных областей, что привело к изменению концентрации цитокинов как на системном, так и на локальном уровне. Установлено, что в ответ на диффузное токсическое повреждение печени на системном уровне, в плазме крови, увеличивалось содержание провоспалительного цитокина TNF- α и подавлялась выработка IL-10.

Автором доказана эффективность гепатопротекторного действия аминофталгидразида натрия. При этом продемонстрирована способность препарата снижать лейкоцитарную инфильтрацию, нивелировать воспалительные процессы в печени за счет влияния на

секреторную активность иммунокомпетентных клеток, уменьшать концентрацию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-18 в плазме крови и IL-6, IFN- γ в органе. На фоне применения препарата в условиях токсического гепатита на 3-е сутки отмечалось увеличение количества макрофагов, возрастание синусоидальных эндотелиальных клеток, что сопровождалось ростом показателей клеточной и внутриклеточной регенерации. В более поздние сроки эксперимента воздействие на макрофаги приводило к повышению метаболической активности клеток паренхимы и уменьшению выраженности деструктивных изменений паренхимы, что проявлялось в снижении индекса альтерации и апоптоза гепатоцитов.

Положительные эффекты препарата автор объясняет присутствием антиоксидантных противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств, а также способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов, восстанавливать их антигенпрезентирующую и секреторную функции.

Работу завершает общее заключение, в котором систематизированы полученные результаты, приведена обобщающая схема и выводы, логично вытекающие из содержания диссертации. К сожалению, в работе встречаются некоторые недочеты. В частности, автор позволяет себе некоторые некорректные суждения при интерпретации полученных результатов. Например, на стр. 12 автореферата присутствует следующее предложение «Повышенная продукция HSP70 вероятно защищает клетку от воздействия токсиканта и продуктов метаболизма, а также препятствует переходу начальных реакций апоптоза в необратимую стадию». На наш взгляд, апоптоз, как программируемая гибель клетки, не имеет обратимых моментов. Скорее всего, автор подразумевал изначальный блок вступлению гепатоцитов в апоптоз. Однако высказанное замечание несколько не умаляет высокую научную значимость выполненных исследований.

Положительно оценивая диссертационную работу, хотелось бы задать вопросы в плане обсуждения:

1. Чем обусловлен выбор именно аминофталгидразида натрия для экспериментальной коррекции диффузного токсического повреждения печени?
2. В связи с чем в ткани печени определялось больше разновидностей цитокинов, чем в плазме крови?
3. Уточните, пожалуйста, почему Вы рассматриваете клетки Купфера в качестве потенциальных мишеней для коррекции при диффузном токсическом гепатите?

Отзыв официального оппонента поступил «31» мая 2021 г.
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02



И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлена «31» мая 2021 г.
Соискатель



З.А. Шафигуллина