

Отзыв

официального оппонента д.м.н. Карева Вадима Евгеньевича
на диссертацию Карпова Михаила Александровича
«Структурно-молекулярные механизмы фиброза различной этиологии и при
воздействии окисленным декстраном в эксперименте»,
представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по
специальностям 3.3.2. Патологическая анатомия, 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность избранной темы

Вопросы фиброгенеза, механизмов инициации и реализации патологического фиброза являются крайне важной фундаментальной проблемой современной медицинской науки, решению которой уже на протяжении многих десятилетий посвящено множество научных исследований, однако, в силу многосложности и многогранности изучаемой проблемы, не формирующих исчерпывающих представлений об этом типовом невероятно сложном патологическом процессе. Исследованиями последних лет показан векторный характер направленности фиброгенеза, определяемый совокупностью реализации про- и противофиброгенных факторов, которых на сегодняшний день насчитывается не менее сотни.

Таким образом, диссертационное исследование Карпова М.А. посвящена актуальной проблеме современной медицины и патологии и связана с недостаточной изученностью механизмов инициации и реализации физиологического и патологического фиброза. Выбор автора в качестве экспериментальных моделей индуцированного фиброгенеза в эпителиальной, мезотелиальной ткани и в паренхиматозном органе позволяет составить общее представление о течении патологического процесса в зависимости от гистогенетической принадлежности ткани, в которой он развивается.

Многообразие этиологических факторов, их возможное сочетание и специфика гистогенетической структуры органов, в которых развивается фиброз, исходя из результатов многочисленных исследований, существенно

влияют на развитие этого патологического процесса. В настоящее время разработаны препараты, направленные на коррекцию фиброза преимущественно легочной локализации, однако их применение ограничено невысокой эффективностью, неоднозначностью получаемых эффектов, а также скудной доказательной базой о результатах применения и негативными влияниями, в том числе в виде иммуносупрессии, в связи с чем, исследование механизмов влияния окисленного декстрана в качестве противофибротического средства, представленное в диссертационной работе Карпова М.А. является актуальным и перспективным.

Диссертационное исследование Карпова М.А. содержит новые данные о молекулярных и клеточных механизмах фиброгенеза, его регуляции, особенностях реактивных изменений паренхиматозных и непаренхиматозных клеток органов и тканей в зависимости от различных этиологических факторов, в частности, экспрессии про- и провоспалительных цитокинов, медиаторов, обеспечивающих регенерацию ткани. Остается недостаточно ясной роль макрофагов и их поляризации, механизмы регуляции их функции в процессе прогрессирования фиброза, избыточном накоплении коллагена во внеклеточном матриксе, недостаточно изучены органнне и топографические особенности исследуемого патологического процесса.

Несмотря на наличие некоторых отличий в процессе физиологического и патологического фиброгенеза с исходом в фиброз органов и тканей, патологический процесс обладает некоторыми универсальными, типовыми звеньями патогенеза. Исследование, проведенное Карповым М.А. касается вопроса клеточных и молекулярных проявлений эпителиально-мезенхимального перехода, который запускается и развивается разнообразными путями, связанными с активацией сигнальных путей SMAD (Smad2/3, Smad1/5/8), MAPK, JNK, ERK, NF- κ B. Участие различных сигнальных путей в развитии фиброза и их проявления изучены совершенно недостаточно, что не позволяет в полной мере объяснить механизмы

развития фиброза в органах и тканях, существенно повлиять на процесс фиброгенеза с исходом в фиброз.

Таким образом, изучение механизмов фиброгенеза и развития фиброза, его пато- и морфогенеза, органных проявлений, а также научного обоснования для разработки новых, патогенетических обусловленных методов профилактики и лечения патологического фиброза, является чрезвычайно актуальным.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность представленных в диссертационной работе Карпова М.А. научных положений и выводов основывается на корректно поставленных задачах, анализе большого количества экспериментального материала. Всего в экспериментальных исследованиях использовано более 300 лабораторных животных. В эксперименте с термическим ожогом 3Б степени было использовано 143 крысы, при моделировании посттоксического фиброза и цирроза печени – 150 крыс, в экспериментальном спаечном процессе брюшной полости – 45 животных. Используются рутинные гистологические и гистохимические методы, в том числе окраски гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, сернокислым серебром, азуром 2 с докрашиванием реактивом Шиффа, современные иммуноморфологические методы с применением разнообразных антител (ИЛ-1, ИЛ-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , FGF, P53, Collagen 1, MMP-9, TIMP-1, Vimentin, CK-19, E-Cadherin, SNAIL/SLUG), а также трансмиссионной электронной микроскопии на достаточном объёме материала (исследовано более 700 электронограмм).

Статистическое исследование и анализ результатов проведен с использованием адекватных параметрических и непараметрических методов, критерия Колмагорова-Смирнова, критерия Стьюдента, U-критерия Манна-

Уитни, критерия Фишера, а также выполнен корреляционный анализ по методу Пирсона.

Достоверность и новизна полученных автором результатов

В диссертационной работе проведено исследование фиброгенеза и формирования фиброза в различных экспериментальных условиях, изучены молекулярные аспекты регуляции этого патологического процесса. Исследованы особенности реакции клеток поврежденных тканей и органов при склерозе с использованием иммуногистохимического метода и метода трансмиссионной электронной микроскопии. Получены новые сведения о молекулярных механизмах фиброза, являющиеся научным обоснованием для выполнения последующих исследований, направленных на разработку принципиально новых патогенетических обоснованных методов коррекции и профилактики рубцовых изменений органов и тканей.

Впервые продемонстрирована связь проявлений эпителиально-мезенхимального перехода с фиброзом в различных экспериментальных условиях – при фиброзе печени и формировании спаек преобладает экспрессия маркеров клеток мезенхимального типа, а при воздействии окисленного декстрана в большей мере экспрессированы маркеры эпителиального типа клеток, реализующих мезенхимально-эпителиальный переход в фибробластах, эндотелиальных клетках сосудов, эпителии желчных протоков печени, мезотелии брюшины.

Выявлены особенности реагирования различных типов клеток в процессе фиброзирования печени, формирования рубца после термического ожога кожи, формирования спаек брюшной полости в условиях применения окисленного декстрана. Формирование и увеличение размеров ложных долек при формировании цирроза печени и воздействии окисленного декстрана связаны с эпителиально-мезенхимальным переходом паренхиматозных и непаренхиматозных клеток печени. Раннее отторжение струпа обусловлено пролиферацией эпидермиса и способствует «очищению» области ожога от

некротических масс, формированию меньшей площади рубца при воздействии окисленного декстрана. При формировании спаек брюшной полости эпителизация и восстановление эпителиального барьера мезотелием не влияют на масштаб спаечного процесса, но влияние оказывают макрофаги и активность фагоцитоза в ранний период эксперимента, пролиферация и склероз сосудов спаек.

Впервые показано, что экссудативные проявления воспалительной реакции, пролиферация и склероз сосудов, сохраняющаяся экспрессия провоспалительных цитокинов макрофагами, низкая фагоцитарная активность, способствуют раннему и выраженному развитию фиброза в различных экспериментальных условиях. Воздействие окисленного декстрана ведет к увеличению фагоцитарной активности макрофагов, ограничивает проявления экссудации, способствует более быстрому очищению области повреждения, пролиферации тонкостенных сосудов, таким образом улучшая трофику для регенераторного процесса.

Впервые исследованы закономерности механизмов синтеза и деградации коллагена при фиброзировании тканей, органов в различных экспериментальных условиях, связанные с увеличением активности синтеза коллагена фибробластами, повышенной экспрессией FGF и TGF- β при сохранении баланса между матриксными металлопротеиназами и их ингибиторами.

Впервые исследованы особенности синтеза и деградации коллагена при воздействии окисленного декстрана в различных экспериментальных условиях (формировании посттоксического цирроза печени и спайках брюшной полости), характеризующиеся меньшей коллагенпродуцирующей активностью фибробластов, апоптозом фибробластов и уменьшением их количества, меньшей экспрессией профиброгенных факторов ИЛ-1, FGF и TGF- β .

Впервые показано, что воздействие окисленного декстрана способствует изменению морфофункционального состояния макрофагов,

экспрессией медиаторов, характерных для их M2 статуса, увеличению фагоцитарной активности макрофагов в различных экспериментальных условиях.

Впервые показаны ультраструктурные отличия макрофагов с признаками M1 поляризации при формировании спаек брюшной полости и макрофагов, демонстрирующих признаки M2 поляризации при воздействии окисленного декстрана, заключающиеся в большей выраженности лизосомального аппарата, эндоплазматического ретикулума, большем объеме цитоплазмы у макрофагов крыс, получавших окисленный декстран.

Впервые показано, что в условиях формирования спаек брюшной полости при наличии признаков M2 поляризации макрофагов процессы фагоцитоза выражены значительно сильнее, чем при экспрессии признаков M1 поляризации. Впервые продемонстрирована связь проявлений эпителиально-мезенхимального перехода с фиброзом в различных экспериментальных условиях: при фиброзе печени и формировании спаек преобладает экспрессия маркеров клеток мезенхимального типа, а при воздействии окисленного декстрана в большей мере экспрессированы маркеры эпителиального типа клеток, реализующих мезенхимльно-эпителиальный переход в фибробластах, эндотелиальных клетках сосудов, эпителии желчных протоков печени, мезотелии брюшины.

Оценка теоретической и практической значимости результатов исследования

Проведенное экспериментальное исследование раскрывает фундаментальные основы регуляции фиброгенеза и является существенным вкладом в изучение сложного и недостаточно изученного типового патологического процесса - фиброза.

Практические рекомендации основываются на результатах проведенного исследования и сформулированных на их основании выводах. Полученные результаты исследования влияния окисленного декстрана на механизмы

фиброгенеза (регуляция процесса фиброгенеза, синтез и сборка коллагена) могут являться научным обоснованием для разработки новых методов профилактики и лечения фиброза, основанные на применении окисленного декстрана.

На основании полученных в ходе исследования результатов получен патент на изобретение RU 2789693 C1 (опубликовано 07.02.2023) «Средство для снижения патоморфологических проявлений посттоксического цирроза печени и его осложнений».

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедры патологической анатомии, кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М. Я. Субботина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, а так же в исследовательскую деятельность лаборатории ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН».

Оценка структуры и содержания работы

Диссертация оформлена в классическом стиле, изложена на 331 странице машинописного текста. Список литературы содержит 273 источника (в иностранных и российских изданиях), в том числе 211 источников, опубликованных за последние 5 лет.

Диссертация состоит из введения, содержащего актуальность исследования, степень разработанности избранной темы, цель и задачи исследования, научные положения, выносимые на защиту, новизну и практическую значимость работы, обзора литературы, главы, содержащей материалы и методы исследования, а также из глав, содержащих результаты собственных исследований, их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, списка иллюстративного

материала и приложения, содержащего таблицы анализируемых данных, полученных в ходе диссертационного исследования.

В первой главе представлен литературный обзор. Глава содержит разделы, посвященные обзору современных представлений о фиброгенезе, роли паренхиматозных и непаренхиматозных клеток в изучаемом патологическом процессе, о его молекулярных и генетических аспектах. Приводится краткий обзор особенностей фиброгенеза в коже, печени, а также при формировании спаек брюшной полости, приведено описание свойств окисленного декстрана. В работе автор ссылается на современные литературные источники.

Вторая глава посвящена представлению материала и методов исследования. Описан процесс моделирования исследуемых патологических процессов. Объем исследованного материала является достаточным, поскольку в работе использовано более 300 лабораторных животных. В главе подробно описаны условия эксперимента. Исследование проведено в широком временном диапазоне, позволяющем оценить динамику и механизмы развития длительно развивающегося процесса фиброгенеза. Глава содержит описание методов гистологической обработки экспериментального материала, проведения дополнительных окрасок, подготовки срезов для иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследований, методов морфометрического и иммуноморфометрического исследований. Приводится описание примененных методов статистической обработки и анализа данных.

В третьей главе изложены основные полученные результаты комплексного исследования, подробно отражены макроскопическое описание исследуемых патологических изменений, микроскопическое описание обнаруженных изменений тканей органов и спаек при световой микроскопии, и при использовании гистологических, гистохимических и иммуногистохимических методов. В разделе, посвященном результатам исследования спаек брюшной полости содержатся результаты

ультраструктурного исследования. Описание полученных в ходе исследования результатов сопровождаются 42 таблицами и 112 иллюстрациями, включая схему развития фиброза, основанную на результатах проведенного исследования. Удобству анализа и восприятия полученных исследователем данных, отраженных в графиках, способствуют таблицы приложения.

В четвертой главе содержится обсуждение результатов собственных исследований в сравнении с результатами, полученными другими исследователями, содержащимися в современных литературных источниках. Глава построена в форме разделов, содержащих обсуждение результатов по экспериментальным исследованиям кожи при термическом ожоге, фиброза печени, спаек брюшной полости. В 4-й главе формулируются и обосновываются особенности фиброгенеза в исследуемых органах и тканях.

В заключении представлен обобщенный результат проведенного исследования, раскрываются механизмы развития фиброза при различных экспериментальных условиях, устанавливается роль компенсаторно-приспособительных реакций поврежденных органов и тканей, а также приводится обобщающая схема развития фиброза.

Анализ работы Карпова М.А. свидетельствует о достижении цели диссертационного исследования. Сформулированные задачи соответствуют цели исследования и логично вытекающими из них выводами. Для достижения цели исследования автором применен современный методологический подход при планировании и проведения экспериментов, анализа и систематизации данных. Полученные научные данные апробированы, представлены и обсуждены на научных и научно-практических конференциях. Таким образом, достоверность полученных данных, представленных в диссертационном исследовании не вызывает сомнений.

Структура и содержание автореферата

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями п.25 Положения о присуждении ученых степеней. Структура автореферата в полной мере отражает содержание диссертации, включая все основные положения и выводы, практические рекомендации.

Публикации

По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 1 патент на изобретение и 12 статей в научных журналах и изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 5 статей в журналах категории K1, 5 публикаций в журналах категории K2, в том числе 6 статей в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Web of Science, что соответствует требованиям к публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук, предусмотренных п. 11 и п. 13 Положения о присуждении ученых степеней Постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г.

Таким образом, проведенное Карповым М.А. исследование, посвященное изучению проблемы фиброза на тканевом, клеточном, молекулярном и ультраструктурном уровне, является актуальным и содержит решение проблемы исследования молекулярных и клеточных механизмов развития фиброза, особенностей регуляции фиброза при термическом ожоге, циррозе печени и спайках брюшной полости и при воздействии окисленным декстраном, обладает научной и практической значимостью.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертации нет. В тексте диссертации имеются немногочисленные стилистические

неточности и опечатки, однако, не влияющие на общую положительную оценку работы. Вместе с тем, в порядке научной дискуссии и обсуждения работы, имеются вопросы:

1. Исходя из результатов исследования и на основании результатов других исследователей предполагаете ли Вы возможность обратного развития фиброза печени при состоявшейся цирротической трансформации печени с изменением ее ангиоархитектоники?

2. Какой из механизмов инициации апоптоза фибробластов Вы предполагаете?

3. Имелись ли проявления клеточно-опосредованного иммунного повреждения паренхимы печени (гепатоцитов и клеток билиарного эпителия) вследствие длительного токсического воздействия, если имелись, каково его значение в инициации и реализации патологического фиброгенеза в печени?

Заключение

Диссертация Карпова Михаила Александровича «Структурно-молекулярные механизмы фиброза различной этиологии и при воздействии окисленным декстраном в эксперименте», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.2. Патологическая анатомия, 1.5.22. Клеточная биология, является самостоятельной и законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании результатов проведенных автором исследований содержится решение актуальной научной проблемы – проведено исследование особенностей формирования и регуляции фиброза при термическом ожоге, циррозе печени и спайках брюшной полости и при воздействии окисленным декстраном, исследованы клеточные и молекулярные механизмы противотромботического влияния окисленного декстрана, имеющей важное фундаментальное и прикладное значение для развития патологической анатомии, клеточной биологии.

