

Отзыв

официального оппонента доктора медицинских наук,
профессора Казачкова Евгения Леонидовича
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

Диссертационное исследование Михаила Александровича Карпова посвящено актуальной проблеме современной медицины и морфологии – фиброзу тканей различного генеза как общепатологическому процессу, который сегодня остается недостаточно изученным, а разработка методов профилактики, коррекции и терапии этого патологического процесса в настоящее время далека от совершенства. Этиология фиброза характеризуется многообразием причинных факторов, обстоятельств и условий их реализации, факторов риска возникновения фиброза, которые способны индуцировать, поддерживать развитие фиброза различной степени выраженности вплоть до формирования цирроза органа. Это различные органические и неорганические соединения, биологические, физические, травматические и многие другие группы факторов. При этом литературные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на разнообразие причин, структурные проявления фиброза на макро- и микроскопическом уровнях довольно однотипные.

Сегодня известно, что фиброз является следствием взаимодействия, прежде всего, между фибробластами и макрофагами, заключающегося в способности последних влиять на состояние фибробластов и потенцировать их к синтезу основного белка соединительной ткани – коллагена. Кроме того, показано, что обмен коллагена во внеклеточном матриксе осуществляется с участием матриксных металлопротеиназ различных типов и их ингибиторов. Исследован ряд эпигенетических факторов развития фиброза, в частности, заключающихся в экспрессии широкого спектра микроРНК. Однако имеющиеся в литературе сведения демонстрируют и ряд органических отличительных особенностей развития фиброза, зависящих от архитектоники поражённого органа и вида повреждающих агентов. Так, зарегистрированы более выраженные явления пневмофиброза, связанные с вдыханием частиц агрессивной пыли, нежели при действии вирусно-бактериальных агентов. Известна фиброгенная роль звёздчатых клеток печени (клеток Ито), способных преобразовываться в процессе так называемой эпителиально-мезенхимальной трансформации в фибробласты и миофибробласты. Вместе с тем общепринятые взгляды на развитие фиброза подразумевают выделение определённых этапов фиброгенеза, таких как повреждение ткани, трансформация клеток в миофибробласты с их последующей пролиферацией, экспрессия трансформирующего фактора роста, активация ряда сигнальных путей (SMAD, MAPK), обладающих комплексом эффектов, в частности, стимулирующих пролиферацию и синтетические потенции фибробластов.

Таким образом, многообразие причинных факторов, обстоятельств и условий их реализации, варибельность сигнальных путей и механизмов развития фиброза, не позволяют в настоящее время в достаточной мере объяснить механизмы регуляции фиброгенеза в органах и тканях, и разработать эффективные меры профилактики и патогенетически-направленной терапии фиброза. В этой связи диссертационная работа М.А. Карпова, направленная на изучение структурных и молекулярно-клеточных механизмов фиброза ожогового, токсического генеза, а также формирования спаек

брюшной полости в эксперименте и в условиях воздействия на зону поражения окисленного декстрана, безусловно является актуальной.

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

Обоснованность представленных в диссертационной работе научных положений и выводов основывается на корректно поставленных задачах, анализе большого научного материала, проведенного с использованием адекватно подобранных и современных методов исследования, а также тщательной статистической обработке полученных данных.

Результаты получены на достаточном объеме экспериментального материала. В эксперименте с термическим ожогом 3Б степени было задействовано 143 крысы, при моделировании посттоксического фиброза и цирроза печени использован материал от 150 крыс, а в экспериментальном исследовании формирования спаек брюшной полости – от 45 животных. Обработка материала осуществлена с помощью гистологических (гематоксилин-эозин), гистохимических (реакция Ван Гизона, с реактивом Шиффа, импрегнация серебром, азури 2), иммуногистохимических окрасок тканевых срезов, при этом исследовано более 1000 микропрепаратов.

Изучение результатов световой, электронной микроскопии, иммуногистохимических исследований проведено с применением морфометрических приёмов, что формирует доказательную базу для формулирования последующих выводов. Электронно-микроскопическое исследование проведено с использованием трансмиссионной электронной микроскопии на достаточном объеме материала (20 объектов, с которых получено более 700 электронограмм).

Статистическое исследование и анализ результатов проведен с использованием параметрических и непараметрических методов (критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, критерий Фишера) с предварительной оценкой нормальности распределения данных (критерий Колмагорова-Смирнова). Кроме того, выполнен корреляционный анализ по методу Пирсона.

Достоверность и новизна полученных автором результатов

Диссертационная работа направлена на изучение молекулярных механизмов фиброза с целью разработки в дальнейшем средств профилактики, методов коррекции и терапии грубых рубцовых изменений органов, возникающих в исходе разнообразных по этиологии и патогенезу повреждающих воздействий в эксперименте. Полученные при исследовании данные обсуждаются с использованием современной научной литературы, отражают новизну и существенно дополняют известные данные по изучаемой проблеме.

Автор конкретизирует и убедительно демонстрирует роль механизмов эпителиально-мезенхимального перехода в генезе фиброза, моделированного различными условиями эксперимента. Показано, что при фиброзе печени и формировании спаек в брюшной полости преобладает экспрессия маркеров клеток мезенхимального типа, а при воздействии затем окисленного декстрана в большей мере экспрессируются маркеры эпителиального типа клеток, реализующих мезенхимально-эпителиальный переход, что проявляется в пролиферативной активности фибробластов, эндотелиальных клеток, эпителия желчных протоков и мезотелия брюшины.

Выявлены и проиллюстрированы морфологические особенности реагирования различных типов клеток в процессе фиброзирования печени, формирования рубца после термического ожога кожи и спаек брюшной полости в условиях применения окисленного декстрана. Показано, что формирование и увеличение размеров ложных долек при становлении цирроза печени и воздействии окисленного декстрана связаны с эпителиально-мезенхимальным переходом паренхиматозных и иных клеток печени. Раннее отторжение струпа обусловлено пролиферацией эпидермиса и способствует «очищению» области ожога от некротических масс, формированию меньшей площади рубца при воздействии окисленного декстрана. Автором установлено, что при образовании спаек в брюшной полости эпителизация и замещение эпителиального барьера мезотелием не влияют на масштаб спаечного процесса, но значимыми в этой ситуации оказываются макрофаги с высокой активностью фагоцитоза в ранний период эксперимента, а также пролиферация и склероз сосудов спаек.

Установлено, что в различных экспериментальных условиях преобладающие экссудативные проявления воспалительной реакции, пролиферация и склероз сосудов, значимая экспрессия провоспалительных цитокинов макрофагами, низкая фагоцитарная активность способствуют раннему и выраженному развитию фиброза. При этом воздействие окисленного декстрана ведет к увеличению фагоцитарной активности макрофагов, ограничивает проявления экссудации, способствует более быстрому очищению области повреждения, пролиферации тонкостенных сосудов, что существенно улучшает трофические условия для регенераторного процесса.

Автором изучены и уточнены закономерности механизмов синтеза и деградации коллагена при фиброзировании тканей, органов в различных экспериментальных условиях, связанные с увеличением активности синтеза коллагена фибробластами, повышенной экспрессией фактора роста фибробластов и трансформирующего фактора роста бета при сохранении баланса между матриксными металлопротеиназами и их ингибиторами. При применении окисленного декстрана отмечены особенности синтеза и деградации коллагена в различных экспериментальных условиях (формировании посттоксического цирроза печени и спайках брюшной полости), характеризующиеся меньшей коллагенпродуцирующей активностью фибробластов, их апоптозом с уменьшением количества и снижением интенсивности экспрессии профиброгенных факторов (ИЛ-1, FGF и TGF- β). Кроме того, автором установлено, что воздействие окисленного декстрана способствует изменению морфофункционального состояния макрофагов, экспрессией медиаторов, характерных для M2 статуса этих клеток, увеличению фагоцитарной активности макрофагов в различных экспериментальных условиях. При этом показаны ультраструктурные отличия макрофагов с признаками M1 поляризации при формировании спаек брюшной полости и макрофагов, демонстрирующих признаки M2 поляризации, а именно, большую выраженность лизосомального аппарата, эндоплазматического ретикулума, большой объём цитоплазмы макрофагов тех животных, которые получали окисленный декстран.

Автором установлено, что в условиях формирования спаек брюшной полости при экспрессии признаков M2 поляризации макрофагов процессы фагоцитоза протекают более активно, чем при экспрессии признаков M1 поляризации. При этом продемонстрирована связь проявлений эпителиально-мезенхимального перехода с разрастаниями соединительной ткани в различных экспериментальных условиях. Так, при фиброзе печени и формировании спаек преобладает экспрессия маркеров клеток мезенхимального ряда, а при воздействии окисленного декстрана в большей мере

экспрессируются маркеры эпителиального типа клеток, реализующих мезенхимально-эпителиальный переход, проявляющийся в высокой активности фибробластов, эндотелиальных клеток, эпителия желчных протоков печени, мезотелия брюшины.

Вместе с тем следует отметить, что в новизне рецензируемого исследования автор подчёркивает приоритетность большого числа выявленных закономерностей и положений, указывая на ряд разделов работы, выполненных впервые. Однако истинного доказательства данных утверждений в виде патентов на изобретение, кроме одного, патентов на полезную модель, свидетельств о программах для ЭВМ в работе не приведено.

Оценка теоретической и практической значимости результатов исследования

Сформулированные в работе теоретические положения основываются на результатах проведенного исследования, полученных выводах и могут рассматриваться как этап доклинического исследования применения окисленного декстрана при фиброзе различной этиологии. Результаты, полученные в ходе изучения обширного экспериментального материала, позволяют автору наметить подходы к возможному применению окисленного декстрана для получения профилактического противофибротического эффекта и коррекции формирующегося фиброза в клинике, а также для использования окисленного декстрана в составе комплекса средств для достижения лечебного эффекта, снижающего интенсивность рубцовых осложнений в органах и тканях. На основании установленных в ходе исследования данных получен патент на изобретение RU 2789693 C1 (опубликовано 07.02.2023) «Средство для снижения патоморфологических проявлений посттоксического цирроза печени и его осложнений».

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе и научно-исследовательской деятельности кафедр патологической анатомии, гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М. Я. Субботина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, а также в деятельности лаборатории ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН».

Оценка структуры и содержания работы

Объём диссертации составляет 331 страницу машинописного текста. Список литературы представлен 273 источниками, среди которых 34 отечественных и 239 зарубежных.

Диссертация оформлена в виде глав, которым предшествует введение, содержащее актуальность проводимого исследования, степень разработанности избранной исследователем темы, цель и задачи, научные положения, выносимые на защиту, новизну и практическую значимость работы.

Первая глава представлена литературным обзором. Глава структурирована, хотя и не озаглавлена, содержит разделы, посвященные анализу представлений и сведений о развитии фиброза, об участии ряда клеток различных органов и тканей в формировании фиброза, особенностях фиброзировании при патологии кожи, печени, образовании спаек брюшной полости. К сожалению, для этой главы и последующего обсуждения результатов собственных исследований привлечено лишь 34

отечественных источника. Однако у меня есть все основания полагать, что в доступной литературе отечественных работ по оппонируемой теме никак не меньше зарубежных, если не больше. За рамками обсуждения остались фундаментальные положения общеизвестных трудов отечественных учёных, посвящённых вопросам развития и трансформации компонентов соединительной ткани при фиброзе, адаптации, репаративной и патологической регенерации, таких общеизвестных исследователей, как А.И. Струков, В.В. Серов, А.Б. Шехтер, Д.С. Саркисов и ряда других. Их фундаментальные труды общепризнаны мировым медицинским сообществом, переведены на иностранные языки и не имеют срока давности.

Во второй главе, посвященной материалам и методам исследования, описан процесс моделирования исследуемых патологических процессов в авторских модификациях. Полагаю, что объем исследованного материала является достаточно репрезентативным, поскольку в работе использовано более 300 лабораторных животных. Дизайн выполненного экспериментального исследования вполне корректен. Животные были распределены таким образом, чтобы стало возможным проведение сравнительного анализа между исследуемыми группами и получение важных научных выводов. Исследование проведено в различных экспериментальных условиях в динамике и позволяет взглянуть на процесс фиброза в выбранном для исследования широком временном промежутке, а также оценить механизмы развития длительно развивающегося фиброза.

В третьей главе описаны полученные в ходе исследования результаты. Здесь успешно реализован комплексный подход к исследованию клеточных и молекулярных механизмов фиброза на различных уровнях организации органов и тканей: макроскопическом, микроскопическом с изучением гистологических, гистохимических, иммуногистохимических проявлений изучаемых явлений, а также на ультраструктурном уровне с использованием электронной микроскопии. При этом корректное применение различных показателей и методов их анализа формирует совокупность результатов, отражённых позднее в убедительных сформулированных выводах.

Материал диссертации богато иллюстрирован. Результаты собственных исследований сопровождаются 42 таблицами и 112 иллюстрациями, включающими синтетическую схему морфогенеза развития фиброза. Удобству анализа и восприятия приведенных рисунков способствуют размещенные в приложении таблицы к графикам. Большинство из приведенных микрофотографий хорошего качества.

В четвертой главе полученные результаты обсуждаются с использованием литературных источников, цитируемых в первой главе, посвященной обзору литературы. Четвёртая глава построена в форме разделов, содержащих обсуждение результатов по экспериментальным исследованиям кожи при термическом ожоге, фиброза печени и спаек брюшной полости, формулируются и обосновываются особенности развития фиброза в органах и тканях. В конце приводится общее заключение, содержащее обобщающие материалы по результатам проведенного исследования, и приводится схема развития фиброза различного генеза.

Таким образом, Михаил Александрович Карпов провел исследование на большом объеме экспериментального материала, использовал современный методологический подход для планирования и проведения экспериментов, анализа и систематизации результатов. Полученные научные данные апробированы и доложены на научных и научно-практических конференциях различного уровня. Благодаря продуманным адекватным методам статистической обработки результатов работы,

достоверность полученных данных, представленных в диссертационном исследовании, не вызывает сомнений. Цель диссертации достигнута, раскрывается проведенными исследованиями. Задачи соответствуют цели исследования. Однако сформулированные выводы не всегда в полном объеме соответствуют поставленным задачам. Отдельные элементы решения поставленной задачи могут встречаться фрагментарно в нескольких выводах, что затрудняет работу с диссертацией, но, вероятно, это связано с различными условиями проведенных групп экспериментов, комплексностью исследования и большим объемом полученных результатов. В конечном итоге фактический материал, полученный при выполнении одиннадцати поставленных задач, так или иначе нашёл отражение в восьми сформулированных выводах.

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.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 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. Получен 1 патент на изобретение.

Таким образом, проведенное Карповым М.А. исследование, посвященное изучению проблемы фиброза на тканевом, клеточном, молекулярном и ультраструктурном уровнях, является актуальным и содержит решение проблемы раскрытия молекулярных и клеточных механизмов развития фиброза различного генеза, обладает научной и практической значимостью.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертации нет. Вместе с тем в порядке научной дискуссии и обсуждения работы хотелось получить ответы на следующие вопросы.

1. В современной литературе не существует однозначного разграничения понятий «склероз» и «фиброз», хотя в различных источниках иногда приводятся определения, разграничивающие эти понятия. В главе 1 настоящего исследования упоминается то фиброз, то склероз. Вы обладаете значительным опытом в этом разделе патологии. Как бы Вы определили понятия «склероз» и «фиброз»? И о каком из этих процессов идёт речь в Вашем исследовании?

2. Иногда в патологии человека выраженные разрастания соединительной ткани в интерстиция органов, постдеструктивного характера или иного генеза приводят к тяжёлым перестройкам органной архитектоники и, по сути дела, к формированию

Таким образом, 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 законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании результатов проведенных автором исследований содержится решение актуальной научной проблемы: изучены структурные и молекулярно-клеточные механизмы фиброза ожоговой, токсической этиологии и формирования спаек брюшной полости у крыс и в условиях воздействия окисленным декстраном. Проведенное исследование обладает существенным фундаментальным и прикладным значением для патологической анатомии и клеточной биологии. Выполненная диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г. и № 1382 от 16.10.2024 г.), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а Карпов Михаил Александрович заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 3.3.2. Патологическая анатомия и 1.5.22. Клеточная биология.

заведующий кафедрой патологической анатомии
и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко
ФГБОУ ВО "Южно-Уральский государственный
медицинский университет" Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор

Здрава Россия
Министр

Подпись доктора медицинских наук, профессора Е.Л. Казачкова заверяю

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО "Южно-Уральский государственный
медицинский университет" Минздрава России
доктор исторических наук

Государственный
издателя России

«14» января 2026 г.

Почтовый адрес:
454092, Челябинская область, г. Челябинск,
Воровского ул., 64.
Тел.: +7(351) 232-73-71; e-mail: kanc@chelsma.ru