

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Рогова К.А. на диссертацию Хальзовой Марии Сергеевны «Морфофункциональная характеристика печени при действии веществ с цитопротекторной активностью ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 на фоне острого алкогольного повреждения (экспериментальное исследование)», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 – Патологическая анатомия и 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология.

Актуальность темы

Значительная распространенность и высокая смертность от алкогольного поражения печени – одна из важнейших проблем здравоохранения многих стран мира, в том числе и России. Поиск эффективных и безопасных методов профилактики и лечения острой алкогольной патологии печени является важнейшим и актуальным направлением фундаментальной и клинической медицины. Для успешной разработки методов терапии алкогольной патологии печени необходимы уточнение патогенетических механизмов развития заболевания и выбор оптимальных маркеров патологического процесса.

В соответствие с современными представлениями, патогенное воздействие этанола на печень обусловлено как прямым токсическим воздействием этанола и продуктов его метаболизма на паренхиматозные клетки органа, так и опосредованной активацией альтерации с последующим некрозом гепатоцитов, формированием воспалительных реакций. Это проявляется последовательным развитием жировой дистрофии гепатоцитов и воспалением в печени с последующим развитием её фиброза и цирроза. В развитие и прогрессирование патологических процессов вовлечены внутриклеточные ферментные системы группы цитохрома, дыхательной цепи митохондрий, свободнорадикальной липопероксидации. Межклеточная кооперация осуществляется группой провоспалительных цитокинов, преимущественно ФНО-а и ИЛ-1.

Среди потенциальных гепатопротекторов весьма перспективными

группами химических соединений являются магниевое производное аминоксансульфоновой кислоты, а также композиция липоевой кислоты и деанола ацеглумата. В соответствии с требованием производителя, препараты были зашифрованы под индексами ЛБК-527 и ЛХТ-8-16.

В этой связи, диссертационная работа, выполненная М.С. Хальзовой, изучившей гепатопротективные свойства этих веществ в условиях острой алкогольной интоксикации, воздействующих на клеточные и молекулярные мишени печени, и подавляющие свободно-радикальное окисление, является весьма своевременной и актуальной.

Научная новизна диссертационного исследования

Автор исследует впервые синтезированные препараты, при этом показано, что внутрижелудочное курсовое введение препарата ЛБК-527 и фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в дозах, пропорциональных 5 и 2,5% от показателя ЛД₅₀, предотвращает некротические изменения гепатоцитов, сохраняет структуру печени, снижают выраженность дистрофии гепатоцитов и воспалительных реакций.

Впервые автором показано наилучшее гепатопротективное действие вещества ЛБК-527, превосходящее таковое фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 на фоне формирования экспериментального острого алкогольного поражения печени, что проявляется в предотвращении алкоголь-опосредованного некроза гепатоцитов и обусловлено подавлением свободнорадикальной активности паренхимы органа с пропорциональной активацией антиокислительного потенциала ткани.

Установлено, что соединение ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут в большей степени, чем ЛХТ-8-16, снижает тканевую концентрацию ФНО-альфа, восстанавливает до уровня интактных животных содержание противовоспалительного ИЛ-10, повышает экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2 на фоне сниженной экспрессии каспазы-3 и активизирует пролиферативный потенциал гепатоцитов (по уровню Ki-67 и PCNA), главным образом, в области периферии печеночной дольки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационной работы М.С. Хальзовой являются экспериментальным обоснованием эффективности перспективных средств для патогенетической терапии алкоголь-индуцированного острого поражения печени. Диссертантом показаны молекулярно-биологические механизмы патологического процесса, воздействие на которые позволяет эффективно предотвращать структурно-функциональные изменения печени, происходящие в рамках изученной патологии.

Практическую значимость исследованию придает и то обстоятельство, что оно выполнялось в рамках базовой части Государственного задания вузам на выполнение исследовательских работ.

Характеристика объема, структуры и содержания работы

Диссертация является экспериментальным исследованием. Диссертантом обоснована актуальность выбранной темы диссертационной работы. Четко сформулированы цель и задачи исследования, на которые в ходе работы даны убедительные ответы. Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 149 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, трех глав с описанием собственных результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы, включающего 222 источников, из которых 204 ссылки на работы иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована достаточным количеством микрофотографий высокого качества, таблицами и диаграммами.

В «Обзоре литературы» изложены современные представления о механизмах алкогольного повреждения печени и принципах его фармакотерапии. В данной главе автор анализирует общие закономерности и динамику повреждения печени при воздействии токсических доз этанола и обосновывает, в связи с этим, возможные точки приложения гепатопротекторов различных фармакологических групп. Автор детально описывает морфологические изменения органа и ассоциированные с ними функциональные нарушения на

всех стадиях эволюции алкогольного поражения печени. Автор указывает на коррекцию митохондриальных нарушений, антирадикальные технологии как одно из возможных перспективных направлений в патогенетической терапии алкогольного гепатита. Несомненным достоинством «Обзора литературы» является четкое соответствие изложенного материала задачам исследования, без лишней информации. При этом в каждом разделе прослеживается отношение автора к излагаемому материалу, что весьма важно для оценки выполненной работы.

Вторая глава описывает материалы и методы исследования. Весьма оригинальным подходом оказалось включение в эту главу раздела «Дизайн исследования». В этой главе автор обосновывает выбор экспериментальной модели острой алкогольной интоксикации и, не менее, подробно обосновывает выбор, значение и информативность методов исследования, которые использовались в работе. Такой подход удлиняет главу, но нисколько не умаляет достоинство диссертации. Однако, на наш взгляд, сведения об экспериментальной модели и характеристике известных методов целесообразно размещать в обзоре литературы. Вместе с тем, обоснования доз использованных лекарственных препаратов в этой главе не приводятся. Следует отметить, чрезвычайно важный, комплексный подход к использованию методов исследования – сочетание морфологических, количественных морфометрических, иммуногистохимических и биохимических методик, иммуноферментного анализа, с которым диссертант успешно справилась.

В третьей главе изложены результаты исследования макро и микроструктурных изменений печени крыс при внутрижелудочном введении исследуемых соединений на фоне острого алкогольного повреждения. Автор показывает способность ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 предотвращать формирование патологических изменений в печени.

При этом, если у препарата ЛБК-527 эффект формируется в обеих дозах, то действие фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 проявляется преимущественно в высокой терапевтической дозе. У крыс, получающих

ЛБК-527 в обеих дозах, не наблюдается гибели гепатоцитов, отсутствует активная воспалительная реакция, а в высокой дозе не формируется жировая дистрофия печеночных клеток. При проведении морфометрического анализа автором показано, что ЛБК-527 повышает, при сравнении с контролем, долю двухъядерных гепатоцитов и связывает этот факт со способностью стимулировать регенераторные процессы в органе. В целом, по мнению автора, вещество ЛБК-527 не уступает по своему действию известному гепатопротектору аденозилметионин (гептралу). Морфологические доказательства эффективности ЛХТ-8-16 выглядят скромнее: композиция эффективна лишь в высокой вводимой дозе, при этом, хотя и снижает, при сравнении с контролем, площадь некроза гепатоцитов, выраженность дистрофических изменений и активность воспалительной реакции, однако не сопоставимо с препаратом сравнения и ЛБК-527.

В четвертой главе автор на основе регистрации некоторых показателей периферической крови и гомогенатов ткани печени изучает активность основных окислительных ферментов при алкогольном поражении печени и роль цитопротекторов в профилактике нарушения обмена. Так, автором показано, что сохранение структурной целостности печеночной ткани крыс при внутрижелудочном введении ЛБК-527 в дозах 100 и 50 мг/кг на фоне токсических доз этанола проявляется сохранением белоксинтезирующей функции печени, предотвращением развития некроза и холестаза. Диссертант показала, что одновременно и пропорционально снижается плазменная концентрация продуктов ПОЛ, в то время как активность ферментов-антиоксидантов – каталазы в плазме и супероксиддисмутазы в печени – повышается. Фармацевтическая композиция ЛХТ-8-16 в высокой дозе (120 мг/кг) снижает некроз и холестаз, не предотвращая их развития полностью. Снижение дозы вдвое сопровождается потерей гепатопротекторной активности фармацевтической композиции.

В пятой главе исследованы процессы программируемой гибели и пролиферации гепатоцитов при фармакологическом воздействии в условиях

острой алкогольной интоксикации. Для определения активности апоптоза изучена экспрессия цитоплазматического фермента каспазы-3, вызывающей фрагментацию ДНК, а также антиапоптотического мембранного маркера Bcl-2. Пролиферация клеток определялась по уровню экспрессии PCNA и Ki-67. В работе показано, что гепатопротекторная активность исследуемых фармакологических агентов уменьшает апоптоз гепатоцитов и активирует их пролиферацию, причем, наибольшим потенциалом обладает соединение ЛБК-527, не уступающее препарату сравнения (гептралу).

В главе “Заключение” диссертант анализирует полученные результаты, однако определенный анализ уже был выполнен в главах, посвященных собственным исследованиям.

“Выводы” вытекают из полученных автором результатов исследования и отражают основное содержание работы, являются логичными ответами на поставленные для решения задачи. Достоверность выводов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационного исследования. Результаты работы достаточно полно представлены в публикациях по теме диссертации.

Достоверность и степень обоснованности полученных результатов

Экспериментальная работа проведена с использованием нелинейных белых крыс обоего пола, полученных из сертифицированных питомников. Количество экспериментальных животных (160 животных в 8 группах) достаточно для решения поставленных задач и получения репрезентативных результатов. В работе использованы морфологические, гистохимические, ИГХ - отражающие гибель клеток и пролифативно-регенераторные процессы (Bcl-2, каспаза-3, Ki-67, PCNA). Биохимическими методами определена активность АЛТ и АСТ, гамма-глутаминтранспептидазы. В сыворотке крови и гомогенатах печени изучена активность ПОЛ: каталазы и СОД. Иммуноферметными методами определялась концентрация ФНО, IL-1 и фактора роста гепатоцитов.

Высокий методический уровень исследований, достаточное количество животных, комплексный подход к решению поставленных задач, широкий спектр важнейших и необходимых методик позволил автору уверенно судить о процессах, выявленных в печени при её алкогольном повреждении и эффективности воздействия лекарственных препаратов.

Все количественные результаты, полученные автором, были обработаны параметрическими и непараметрическими статистическими методами.

Научные положения, вынесенные автором на защиту, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, несомненно, в высокой степени обоснованы, достоверны и надежны.

Личный вклад соискателя

М.С. Хальзова сформулировала концепцию настоящего исследования, разработала дизайн и план его проведения, осуществляла анализ отечественной и зарубежной научной периодики. Лично автором выполнены все эксперименты по воспроизведению острого алкогольного повреждения печени, введению лекарственных веществ. Автор принимала непосредственное участие в приготовлении гистологических препаратов, их изучении, проведении морфометрического анализа. Автор самостоятельно проводила биохимические исследования крови животных, а также иммуноферментный анализ гомогенатов паренхимы печени. При участии автора проведено иммуногистохимическое исследование. Лично автором велись все записи исследования, сбор, группировка и статистический анализ полученных результатов, их математическая обработка. Автор принимала непосредственное участие в подготовке публикаций по теме диссертации.

Общие замечания по диссертационной работе

Работа хорошо оформлена, и принципиальных замечаний не вызывает. Вместе с тем, автор, при описании морфологических изменений, использует термин «цитоллиз» не принятый в патологической анатомии, однако подобная погрешность не снижает её достоинства. Наряду с высокой оценкой выполненной работы, в пределах научной дискуссии, хотелось бы получить ответ

на вопрос. Почему Вы рассматриваете увеличение размеров гепатоцитов (с нечеткой мембраной и гомогенизированной цитоплазмой) как проявление гипертрофии, а не дистрофии (белковой, гидропической) клеток, обусловленной активацией свободнорадикального окисления и наиболее выраженное в группе контрольных животных.

Обоснование защиты диссертации по двум специальностям

Диссертационная работа посвящена исследованию (в значительной мере, морфологическому) острого алкогольного поражения печени, а также разработке перспективных способов патогенетической терапии, что соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия. При этом автор исследует свойства оригинальных, впервые синтезированных, лекарственных веществ, в т. ч. механизмы их действия, что, согласно паспорту научной специальности 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология, является предметом изучения данной специальности. В связи с этим, считаю обоснованным представление настоящей работы к защите по двум указанным специальностям.

Заключение

Представленная к защите Диссертационная работа Марии Сергеевны Хальзовой «Морфофункциональная характеристика печени при действии веществ с цитопротекторной активностью ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 на фоне острого алкогольного повреждения (экспериментальное исследование)» является самостоятельно выполненной завершенной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи, как патологической анатомии, так и фармакологии и клинической фармакологии – исследование морфофункциональных точек приложения и механизмов патогенетического действия, новых гепатопротекторов для лечения и профилактики острого алкогольного повреждения печени. Полученные данные, несомненно, имеют ценность для теоретической и практической медицины.

Научно-практическая значимость работы, актуальность выбранной темы, высокий методический уровень и достоверность полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в действующей редакции, а ее автор, Хальзова Мария Сергеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 – Патологическая анатомия и 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник Центральной патологоанатомической лаборатории Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека»,
доктор медицинских наук по специальности патологическая анатомия-14.03-02, профессор



Рогов Константин Аркадьевич

Сведения об оппоненте: место работы - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Должность: ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории

Адрес: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3; Телефон: 8 (499)120-80-65 E-mail: morfolhum@mail.ru

Подпись д.м.н. профессора К.А. Рогова заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека», доктор медицинских наук




Лилия Петровна Михайлова