

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.м.н., профессора Бутолина Евгения Германовича о диссертации Булавинцевой Татьяны Сергеевны на тему «Влияние макрофагов на состояние инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. - патологическая физиология

Актуальность избранной темы. Исследование патофизиологических механизмов развития сахарного диабета, биохимических сдвигов в метаболических процессах при данной патологии, безусловно, является актуальным направлением в изучении фундаментальных основ развития сахарного диабета. В связи с тем, что гипогликемическим эффектом обладает лишь инсулин, особую остроту приобретает проблема надежности функционирования системы, продуцирующей этот гормон.

В тоже время ряд исследований последних лет позволяет констатировать, что дисфункция бета-клеток может быть частично компенсирована инсулин-синтезирующими клетками поджелудочной железы, локализованными вне островков Лангерганса, а именно в составе экзокринного эпителия в виде одиночных клеток или агломератов. Механизмы способствующие образованию инсулин-синтезирующих клеток на всех этапах развития поджелудочной железы, их значительный рост в неонатальном периоде, проблемы репарации и регенерации их после повреждения изучены недостаточно и до конца не известны, однако наличие доказательств участие макрофагов в образовании инсулин-синтезирующих клеток свидетельствует о макрофагальной регуляции их образования и функционирования. Доказана также роль макрофагов в регуляции развития островков Лангерганса; известна их способность стимулировать пролиферацию бета-клеток и реваскуляризацию островков после повреждения. Такое разнообразие регуляторных влияний макрофагов реализуется посредством выработки как широкого спектра цитокинов, факторов роста, а также способностью макрофагов к миграции стволовых клеток в поврежденные органы.

В диссертационной работе Т.С. Булавинцевой проведено экспериментальное исследование на крысах линии Вистар с целью выяснения морфо-функциональных характеристик различных инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы и патофизиологических механизмов макрофагальной регуляции на инсулин-синтезирующие клетки у здоровых животных и в условиях аллоксанового диабета. С учетом провоспалительной направленности действия макрофагов на поджелудочную железу для возможной коррекции использовали аминоксидогидрофталазид натрия, противовоспалительный препарат снижающий секрецию провоспалительных цитокинов, активированными макрофагами.

Таким образом, тема диссертационного исследования Т.С. Булавинцевой носит фундаментальный характер, является актуальной для выяснения влияния макрофагов на инсулин-синтезирующие клетки поджелудочной железы в физиологических условиях и ее повреждении, а также возможных способах коррекции активности макрофагов при экспериментальном диабете и способствует решению одной из важных задач медицины и биологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В ходе реализации цели исследования, заключающейся в выявлении отдельных патофизиологических механизмов макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-

синтезирующих клеток поджелудочной железы и при коррекции активности макрофагов аминоксидрофталазидом натрия, автором было поставлено и решено ряд научных задач.

Работа является самостоятельно выполненным научным исследованием, проведенным на адекватном доказательном уровне. Объем научных исследований достаточен. Проведено экспериментальное исследование на 100 половозрелых крысах-самцах линии Вистар в возрасте 12-13 недель, массой 200-250 г, из которых 50 животных было использовано для модели аллоксанового диабета без терапии аминоксидрофталазидом натрия, 20 крыс с терапией. 30 грызунов использовались в качестве контрольных. В качестве экспериментальной модели диабета использовалась модель аллоксанового диабета, которая воспроизводит инсулинзависимый сахарный диабет, характеризующийся разрушением инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы, дефицитом инсулина, гипергликемией и глюкозурией. При этом диссертантом использовалась собственная модификация экспериментального аллоксанового диабета, защищенная патентом.

В работе использованы как классические, так и современные методы исследования: биохимические (уровень гликемии и гликированного гемоглобина), гематологические, методы иммуноферментного анализа (определение инсулина, кортикостерона, провоспалительных факторов, интерлейкинов, инсулиноподобного фактора роста), гистологические, иммуногистохимические, в том числе с двойным окрашиванием, конфокальные исследования образцов поджелудочной железы. Полученные экспериментальные данные, статистически обработаны с использованием пакетов прикладных программ и оценивались по непараметрическому критерию Краскила-Уоллеса для множественных сравнений.

По итогам диссертационной работы сформулированы пять выводов, соответствующих материалам исследования и отражающих поставленные задачи; обоснованы практические рекомендации, в том числе по использованию аминоксидрофталазида натрия в качестве перспективного средства при разработке новых способов фармакологической коррекции нарушений углеводного обмена.

Таким образом, объем исследуемого материала, адекватно выбранная модель эксперимента, примененные современные методы лабораторных и инструментальных методов исследований, проведенный статистический анализ не позволяют усомниться в обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертационной работе Т.С. Булавинцевой.

Достоверность и новизна исследований полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Дизайн исследования, тщательный анализ и адекватная статистическая обработка экспериментальных данных не вызывает сомнений в достоверности полученных результатов, на основании которых были сформулированы выводы и практические рекомендации.

Результаты экспериментальных исследований позволили диссертанту проанализировать и раскрыть отдельные аспекты патофизиологических механизмов макрофагальной регуляции на синтетическую активность, чувствительность к повреждению и регенерации инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы в условиях модели аллоксанового диабета. Новизна исследования подтверждена многочисленными публикациями (14) в изданиях, рекомендованных ВАК РФ по специальности 3.3.3. - патологическая физиология и индексируемых в международных наукометрических базах: Web of Science, Scopus и др.

Содержащиеся в работе данные получены автором лично или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы: постановка цели и задач исследования, выбор методов и методик исследования, проведение экспериментов, статистическая обработка полученных данных, оценка и анализ результатов экспериментов, написание научных работ, оформление диссертации и автореферата.

Основные положения и результаты исследования были доложены и обсуждены на научных форумах различного уровня, в том числе международных.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Полученные результаты диссертационной работы носят фундаментальный характер. Проведенное экспериментальное исследование позволило существенно пополнить знания о некоторых патофизиологических механизмах регуляции образования внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток; выявлена неоднородность их морфофункциональных характеристик, чувствительность к повреждению и репарации как в физиологических условиях, так и при аллоксановом диабете. Автором впервые показано, что внеостровковые инсулин-синтезирующие клетки являются более устойчивыми к действию повреждающих факторов, чем островковые инсулин-синтезирующие клетки, что вероятно связано как с большей плотностью капилляров островков в сравнении с экзокринной частью поджелудочной железы, так и снижению пролиферации бета-клеток.

С помощью иммуногистохимических методов исследования установлено влияние макрофагов на повреждение инсулин-синтезирующей системы: повышение при этом провоспалительных цитокинов и активных радикалов, обладающих выраженным цитотоксическим действием, также способно угнетать синтез и секрецию инсулина в инсулин-синтезирующих клетках. Введение аминодигидрофталазида натрия на фоне повреждения инсулин-синтезирующих клеток способствует снижению количества макрофагов, провоспалительных цитокинов и уровня апоптоза инсулин-синтезирующих клеток. В то же время количество инсулин-синтезирующих клеток возрастает равно как и их синтетическая функция вне зависимости от локализации.

Таким образом автором исследования доказано, что при повреждении инсулин-синтезирующих клеток модуляция секреторной активности макрофагов с помощью аминодигидрофталазида натрия способствует снижению макрофагальной инфильтрации и концентрации цитотоксических провоспалительных цитокинов в поджелудочной железе, что в свою очередь приводит к снижению уровня апоптоза инсулиноцитов, повышению их синтетической активности и, как следствие, количества.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Полученные результаты экспериментальных исследований создают теоретическую основу для разработки методов стимулирования, образования и функционирования внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток путем изменения функциональной активности макрофагов. Новые сведения о механизмах макрофагальной регуляции образования указанных клеток поджелудочной железы могут быть внедрены в образовательные программы подготовки обучающихся по медицинским и биологическим специальностям, а также использоваться в деятельности научно-исследовательских лабораторий. Кроме того результаты, полученные автором, могут быть использованы при разработке новых способов коррекции инсулин-дефицитных состояний.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности. Диссертация изложена на 175 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 23 рисунка. Структура диссертации традиционная и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 198 источников, из которых 30 русскоязычных и 168 англоязычных.

Во введении автор обосновывает выбор темы, ее актуальность и степень разработанности, формулирует цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, раскрывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, пишет о внедрении результатов исследования в практику и апробации их на научных форумах разного уровня.

Глава «Обзор литературы» посвящена оценке влияния макрофагов как на островковые, так и внеостровковые клетки инсулин-синтезирующие клетки поджелудочной железы. На 30 страницах представлен подробный анализ научных работ,

посвященных морфофункциональной характеристике инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы, влиянию микроокружения на формирование инсулин-синтезирующих структур, роли макрофагов в повреждении инсулин-синтезирующих клеток, а также возможным механизмам их неогенеза и регенерации. Обзор литературы написан в соответствии с требованиями, тщательно выверен. Последние литературные источники датированы 2023 годом.

В главе «Материалы и методы исследования», автором дана подробная характеристика примененным современным методам исследования биологического материала, представлена модель патологии инсулин-продуцирующей системы с использованием химического диабетогена – аллоксана, представлен дизайн исследования. Т.С. Булавинцева убедительно обосновывает выбор аллоксана для моделирования экспериментального инсулинозависимого сахарного диабета, а также использование аминоксидогидрофалазида натрия в качестве агента воздействия на функциональное состояние макрофагов. Статистические методы исследования включают непараметрические критерии, а также выявление корреляционных связей. В целом комплекс примененных лабораторных, инструментальных и статистических методов исследования современен и информативен.

Результаты собственных исследований представлены тремя главами. В главе «Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы в физиологических условиях» автором показано, что в физиологических условиях инсулин-синтезирующие клетки островков и внеостровков поджелудочной железы характеризуются гетерогенностью синтетических функций, различной интенсивностью процессов пролиферации и апоптоза, что вероятно повышает устойчивость инсулин-синтезирующих клеток к действию повреждающих факторов.

Глава «Повреждение инсулин-синтезирующей системы» посвящена изучению изменений анализируемых показателей в ранние (3,7 сутки) и поздние (30,60 сутки) сроки повреждения инсулин-синтезирующей системы аллоксаном. Показано, что панкреатические островки оказались наиболее чувствительными к действию аллоксана, что доказано как снижением количества самих островков, так и их инсулин-синтезирующих клеток. В то же время, на фоне действия повреждающих факторов в инсулин-синтезирующей системе одновременно развивались компенсаторно-репаративные процессы, характеризующиеся активизацией пролиферативной активности инсулин-синтезирующих клеток тесно связанной с макрофагальной инфильтрацией.

Глава «Влияние условий микроокружения (резидентных макрофагов) на инсулин-синтезирующую систему в физиологических условиях и при ее повреждении» посвящена изучению влияния аминоксидогидрофалазида натрия на реакцию клеток моноцитарно-макрофагального ряда здоровым крысам и животным с экспериментальным аллоксановым диабетом. Автором доказан положительный эффект препарата на инсулин-синтезирующие клетки поджелудочной железы: уменьшается уровень апоптоза, повышается синтетическая активность и новообразование инсулин-синтезирующих клеток в результате активации их пролиферации. При этом бета-клетки островков с низким содержанием инсулина обладают наибольшим репаративным потенциалом.

В главе «Закключение» на 11 страницах текста диссертантом подробно обсуждены полученные результаты, проведен глубокий анализ данных, полученных в ходе экспериментальных исследований, раскрыты возможные патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования островковых и внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы в физиологических условиях и при их повреждении аллоксаном. Автором убедительно, по нашему мнению, доказано, что морфофункциональная неоднородность инсулин-синтезирующих структур связана с особенностями их микроокружения, основным компонентом которого являются макрофаги. Именно макрофаги, являющиеся одним из основных «координаторов» метаболического и тканевого гомеостаза способны повлиять на

синтез инсулина в инсулин-синтезирующих клетках, их пролиферацию и интенсивность апоптоза как в физиологических условиях, так и при повреждении. В тоже время диссертантом сделаны предположения, что влияние модуляции функциональной активности макрофагов на инсулин-синтезирующую систему в большей степени обусловлен изменением их функциональной активности, чем изменением количества инсулин-синтезирующих клеток.

Выводы отражают основные результаты диссертационного исследования. Все они конкретны, объективны, соответствуют поставленным задачам, отражают суть и результаты работы, подтверждаются представленным материалом.

Практические рекомендации вытекают из собственных исследований автора, могут быть использованы в работе специализированных лабораторий.

Содержание автореферата отражает основные положения работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом. Структура и содержание работы свидетельствуют о самостоятельно выполненном научном исследовании, получены новые данные о механизмах макрофагальной регуляции образования и функционирования островковых и внеостровковых инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы при экспериментальном аллоксановом диабете, а также способах коррекции активности макрофагов. Результаты диссертационного исследования отражены в 18 публикациях, в том числе 14 в изданиях рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ по специальности 3.3.3. - патологическая физиология. Работа поддержана грантами УрО РАН и РФФИ. Материалы работы широко представлены и обсуждены на научных форумах различного уровня.

Диссертационная работа хорошо оформлена, написана литературным языком, практически отсутствуют ошибки, неудачные выражения.

Принципиальных возражений ни основная концепция работы, ни положения, выносимые на защиту, ни полученные фактические данные не вызывают.

В качестве замечаний можно отметить следующее:

1. Было бы целесообразно, наравне с определением инсулина исследовать и С-пептид.
2. Препарат, модулирующий активность системы фагоцитирующих мононуклеаров в работе называется по-разному: аминодигидрофталазид натрия, аминодигидрофталазидион натрия.

Указанные замечания не умаляют значимости работы.

В плане продолжения научной дискуссии хотелось бы задать диссертанту ряд вопросов:

1. С чем связаны сроки экспериментов: ранние (3,7 сутки) и поздние (30, 60 сутки) после введения аллоксана без использования аминодигидрофталазида натрия и 30, 60 сутки после введения аллоксана с терапией?
2. Какие тест-системы Вы использовали для изучения содержания инсулина и кортикостерона в крови методом ИФА: специфические тест-системы для определения указанных гормонов у крыс или тест-системы для определения изучаемых показателей у человека?
3. Каков по-Вашему ведущий механизм различной чувствительности к повреждению инсулин-синтезирующих клеток панкреатических островков и одиночных инсулин-синтезирующих клеток?
4. Объясните механизм влияния аминодигидрофталазида натрия на снижение или даже нормализацию уровня гликемии и количества гликированного гемоглобина в крови?
5. Могут ли изменения размеров инсулин-синтезирующих клеток при аллоксановом диабете привести к усилению или, наоборот, к снижению количества вырабатываемого им инсулина, или этот показатель не зависит от их размеров?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Таким образом, диссертационная работа, Булавинцевой Татьяны Сергеевны на тему: «Влияние макрофагов на состояние

инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. - патологическая физиология, является самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором экспериментальных исследований выявлено участие макрофагов в регуляции образования и функционирования островковых и внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы при физиологических условиях и экспериментальном аллоксановом диабете; изучены и проанализированы молекулярные механизмы корректирующего действия аминодигидрофталата натрия на морфофункциональную активность макрофагов в условиях инсулинзависимого диабета. Разработаны теоретические и практические рекомендации, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное значение для медицины и биологии, а именно патофизиологии, изучающей механизмы нарушений метаболических процессов при сахарном диабете.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертация Булавинцевой Татьяны Сергеевны полностью соответствует критериям, установленным пунктом 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, с изм., утв. 21.04.2016 № 335), а ее автор Булавинцева Татьяна Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. - патологическая физиология.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой клинической биохимии
и лабораторной диагностики факультета
повышения квалификации и профессиональной
переподготовки ФГБОУ ВО «Ижевская государственная
медицинская академия» Минздрава России, доктор
медицинских наук, профессор

Е.Г. Бутолин

Подпись Бутолина Е.Г. заверяю
Ученый секретарь ученого совета
доктор медицинских наук



С.А. Лукина

Дата 11.03.2024

МП

Полное название учреждения, адрес с индексом: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России. 426033, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д.281, тел. 8 (3412) 52-62-01

Адрес электронной почты: rector@igma.udm.ru.

Официальный сайт: <http://www.igma.ru/>

Отзыв официального оппонента Бутолина Е.Г. поступил «14» марта 2024 г.
Ученый секретарь Совета 24.1.063.01,
к.б.н.



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента ознакомлена «14» марта 2024 г.
Соискатель



Т.С. Булавинцева

