

ОТЗЫВ

официального оппонента д.м.н. Волкова Александра Михайловича на диссертационную работу Мотина Юрия Григорьевича «Исследование факторов детерминации нарушений структурно-функционального гомеостаза почки при развитии оксалатного нефролитиаза», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология и 14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность. Высокая распространенность мочекаменной болезни и значительный рост заболеваемости в Российской Федерации обуславливают актуальность исследований, связанных с выявлением отдельных звеньев ее этиопатогенеза, лечения и профилактики. Теории камнеобразования широко обсуждаются в современной научной литературе, однако единой концепции патогенеза нефролитиаза до сих пор не сформировано. Также окончательно не решен вопрос, действуют ли факторы, приводящие к нефролитиазу изолированно или совместно, в различных комбинациях.

Формированию мочевых камней предшествуют ранние структурнофункциональные изменения клеток и тканей почек, которые у большинства больных нефролитиазом протекают бессимптомно и могут быть корректно изучены в эксперименте. Указанным нарушениям придают особое значение в патогенезе мочекаменной болезни, поскольку они служат тканевым субстратом прогрессирования процессов камнеобразования, а с другой стороны их патогенетически обоснованная коррекция может служить эффективным способом метафилактики и консервативного лечения заболевания.

Исходя из вышесказанного, актуальность диссертационной работы Мотина Ю.Г., посвященной изучению молекулярно-клеточных проявлений нарушений гомеостаза, детерминирующих развитие оксалатного нефролитиаза в эксперименте, не вызывает сомнений.

Новизна работы. Соискатель выдвинул рабочую гипотезу о том, что в условиях пресыщения мочи оксалат-ионом и образованием нерастворимого соединения CaC_2O_4 , создаются условия для комплексного воздействия

различных механизмов повреждения клеток и тканей (процессов кристаллизации, воспаления, оксидативного стресса и, возможно, стресса эндоплазматического ретикулума), опосредующих структурно-функциональную перестройку тканевых элементов почки на ранних сроках развития литогенных процессов до формирования интерстициальных бляшек и клинически значимых крупных мочевых камней, локализованных в чашечках и лоханках. Результаты работы диссертанта подтверждают эту гипотезу.

Так, определены морфофункциональные и ультраструктурные изменения почки на ранних этапах развития оксалатного нефролитиаза в эксперименте, а также в условиях коррегирующих воздействий на отдельные звенья патогенеза α -токоферолом и цитратом натрия с учетом особенностей экспрессии маркеров оксидативного повреждения и антиоксидантной защиты, ингибиторов процессов кристаллизации, экспрессии ядерного фактора-kB. Автором впервые изучены морфоструктурные проявления стресса эндоплазматического ретикулума при развитии литогенных процессов, доказана активация проапоптозной ветви и снижение активности компенсаторной ветви стресса эндоплазматического ретикулума уже на 3 неделе моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Таким образом, диссертантом получены новые данные, уточняющие механизмы повреждающих эффектов процессов камнеобразования и дополняющие имеющиеся сведения о патогенезе мочекаменной болезни. В пользу новизны работы говорят и публикации в журналах списка ВАК, а также статьи в журналах «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» и «Архив патологии», которые входят в список Scopus.

Цель работы сформулирована точно и конкретно, поставленные **задачи** полностью раскрывают план исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов. Достоверность, обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе, базируются на высоком научно-методическом уровне исследования, большом объеме фактического материала, использовании современных и адекватных поставленным задачам методов гистологического, гистохимического, иммуноморфологического и электронно-микроскопического исследования и квалифицированной статистической обработке полученных данных.

Научная и практическая значимость работы. Научная значимость работы заключается в том, что получены новые данные, раскрывающие последовательность преобразовательных процессов тканевых элементов почки на ранних этапах литогенеза при экспериментальном оксалатном нефролитиазе. Проведенные исследования дополняют имеющиеся сведения о патогенезе развития мочекаменной болезни, что может иметь значение для разработки новых способов лечения, профилактики и метафилактики нефролитиаза.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа Мотина Ю.Г. написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования», шести глав, в которых приведены результаты исследования, заключения, выводы и списка использованной литературы. Работа изложена на 223 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц, иллюстрирована 89 рисунками. Библиографический список включает 521 источник.

Во введении автор дает обоснование выбранной цели, поставленным задачам, научной новизны, теоретической и практической значимости работы. В обзоре литературы освещается современный взгляд на причины развития процессов литогенеза, автор дает аналитический обзор современной литературы, приводит различные теории процессов камнеобразования. Хорошо описана роль внутрипочечных белков-ингибиторов кристаллизации в развитии процессов литогенеза. Обсуждается вероятная роль медиаторов тканевого повреждения (оксидативный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума) в патогенезе нефролитиаза. Знакомство с данной главой показывает широкую эрудицию автора, умение аналитически осмысливать литературные сведения.

В главе «Материал и методы исследования» приведено подробное описание экспериментального материала и методов исследования, при этом Мотин Ю.Г. владеет современными гистологическими, гистохимическими, иммуногистохимическими и электронномикроскопическими методами исследования и обоснованно их сочетает. Так, общая характеристика преобразовательных процессов производилась на светооптическом уровне при помощи общепринятых гистологических окрасок; для визуализации отложения тканевых депозитов кальция применялся метод импрегнации серебром по Коссу, а для оценки реакции интерстиция использовались сразу

несколько методов (окрашивание препаратов по методу MSB в модификации Д.Д. Зербино, по ван Гизону, по Гордону-Свиту, ставили ШИК-реакцию). Функциональная активность клеток интерстиция и эпителия канальцевых элементов почки оценивалась методом определения активности ядрышковых организаторов путем окрашивания тканей раствором коллоидного серебра, что позволяет оценить напряженность рибосомального синтеза и пролиферативную активность клеток. Обращает на себя внимание широкое использование иммуногистохимических методов исследования. В работе дается характеристика экспрессии и гистотопографической локализации в почке целого ряда маркеров: оксидативного повреждения (МДА, СОД-2), стресса эндоплазматического ретикулума (GRP78, GADD153), транскрипционного регулятора генов, вовлеченных в воспалительный ответ (NF- κ B), внутрипочечных белков-ингибиторов процессов кристаллизации (протеин Тамма-Хорсфалла, бикунин, остеопонтин). Особую ценность имеют подробные электронномикроскопические исследования почки, что позволяет не только изучить ультраструктурные изменения клеток, но и оценить реакцию клеточных органелл, объяснить наблюдаемые на светооптическом уровне явления и процессы. Обоснованное применение метода спектроскопии энергетических потерь электронов (EELS) на базе электронной микроскопии с энергетической фильтрацией (EFTEM) дает возможность достоверно визуализировать фиксацию соединений кальция на органеллах и мембранах клеток. Полиметодический подход позволяет получить уникальные данные, необходимые для всесторонней характеристики процессов, происходящих в почке при развитии литогенеза, в сроки, когда первые клинические проявления заболевания еще отсутствуют.

Полученные результаты тщательно оценены с помощью адекватных методов статистической обработки, соответствующих типам распределения и характеру полученных в исследовании переменных. Таким образом, использованные методы соответствуют решению поставленных задач, а их применение характеризует диссертанта как хорошо подготовленного специалиста в области морфологии и патофизиологии.

В основной части работы Ю.Г. Мотин подробно приводит результаты собственных исследований. В результате проведенного морфологического и ультраструктурного исследований, автор приходит к выводу, что развитие процессов литогенеза связано с отложением нерастворимых соединений

кальция в эпителиальных клетках элементов петли нефронов и собирательных трубок, с тенденцией к распространению депозитов кальция через базальную мембрану в почечный интерстиций. Автор оценивает распределение кальциевых депозитов на 21 и 42 сутки эксперимента, что позволяет изучить структурно-функциональные изменения почки в динамике развития патологического процесса. Убедительно показана гистотопографическая связь отложения нерастворимых соединений кальция в тканевых структурах и активации экспрессии ключевого транскрипционного фактора воспалительного ответа – ядерного фактора-кВ (NF-кВ). Обоснована патогенетическая роль оксидативного стресса на ранних этапах формирования кальциевых депозитов в тканях почки.

Иммуногистохимическими методами выявлено увеличение экспрессии протеина Тамма-Хорсфалла, уменьшение экспрессии бикунина и снижение экспрессии остеопонтина в тканях почки.

Данные электронно-микроскопического исследования показали изменения клеточных органелл, мембран и ядер эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок. Автором установлено, что процессы кристаллизации соединений кальция и миграции депозитов ассоциированы с фиксацией соединений кальция в цитоплазме и на мембранных структурах клеток, расширением цистерн гранулярной эндоплазматической сети, отеком митохондрий с просветлением матрикса и деструкцией крист, формированием гигантских митохондрий с характерными ампулярно расширенными кристами, аутофагосом. Автор связывает указанные ультраструктурные изменения клеток с мисфолдингом клеточных протеинов и подтверждает эту теорию иммуногистохимическими методами. Приоритетную новизну имеет доказанное в работе развитие стресса эндоплазматического ретикулума с усилением экспрессии протеина GADD153 в тканях и снижением активности белков-шаперонов (GRP-78) эндоплазматического ретикулума на начальных этапах формирования почечных камней.

В главе «Заключение» автор проводит полный анализ собственного материала и сопоставляет его с данными современной литературы по изучаемой проблеме. Данный раздел диссертационной работы свидетельствует о способности автора анализировать и интерпретировать полученные результаты.

Выводы диссертационной работы логично и последовательно отражают результаты собственных исследований автора.

Теоретическая и практическая значимость результатов. Научные положения диссертации Ю.Г. Мотина дополняют представления о патогенезе мочекаменной болезни и раскрывают структурно-функциональные нарушения почки на ранних этапах развития процессов камнеобразования. Результаты и выводы диссертационной работы могут быть рекомендованы для внедрения в научно-педагогическую деятельность кафедр соответствующего профиля медицинских вузов.

Публикации. По материалам исследования опубликовано 35 научных работ, из них 19 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Автореферат соответствует основным положениям диссертации и полностью отражает данные, полученные автором; оформлен в соответствии с п.25 Положения о присуждении ученых степеней.

Замечания и вопросы. Замечаний принципиального характера к диссертационной работе Мотина Ю.Г. у меня нет.

В качестве дискуссионных вопросов хотелось бы услышать мнение автора по следующим вопросам:

1. Каковы возможные причины изменения ультраструктуры цистерн гранулярной эндоплазматической сети эпителиоцитов канальцев нефронов и собирательных трубок при инициации литогенных процессов?
2. Наблюдались ли явления нефрокальциноза в канальцах коркового вещества почки на соответствующих сроках моделирования оксалатного нефролитиаза?

Заключение.

Учитывая актуальность темы, оригинальность проведенных диссертантом исследований, теоретическую и практическую новизну полученных данных, можно заключить, что диссертационная работа Мотина Ю.Г. «Исследование факторов детерминации нарушений структурно-функционального гомеостаза почки при развитии оксалатного нефролитиаза», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология и 14.03.03 – патологическая физиология, является

законченной научно-квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения молекулярно-клеточных проявлений нарушений гомеостаза, детерминирующих развитие оксалатного нефролитиаза, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии; патологической физиологии. Анализируемая работа в полной мере соответствует требованиям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.13 г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология и 14.03.03 – патологическая физиология.

11 сентября 2017г.

в.н.с. лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии Центра новых технологий ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, доктор медицинских наук,

Волков А.М.

Волков Александр Михайлович, доктор медицинских наук, в.н.с. лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии Центра новых технологий ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. Почтовый адрес: 630055, Российская Федерация, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15. Телефон: 8-913-914-09-98

Email: a_volkov@meshalkin.ru

Подпись д.м.н. Волкова А.М.

заверяю:

Заместитель директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава, член-корр. РАН, проф., д.м.н.



Ломиворотов В.В.