

ОТЗЫВ

официального оппонента о научно-практической значимости диссертационной работы ШӘЙБЕК Алтынай Жұпарқызы на тему «Предотвращение восстановленным глутатионом деструкции панкреатических β -клеток, вызываемой диабетогенными цинксвязывающими веществами и исследование механизмов его предупреждающего действия» на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060700 - Биология

(научные консультанты: д.м.н., профессор Корчин В.И.; д.м.н., профессор Конерт К.-Д.; д.м.н, проф. Мейрамов Г.Г.)

1. АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЕЕ СВЯЗЬ С ОБЩЕНАУЧНЫМИ И ОБЩЕГОСУДАРСТВЕННЫМИ ПРОГРАММАМИ

Сахарный диабет представляет собой всё более актуальную задачу, решение которой становится делом чести ученых всего мира. По образному выражению экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), инициировавших Консенсус по сахарному диабету в Сент-Винсенте в 1989 году, диабет становится неинфекционной пандемией. Со времени принятия декларации в Сент-Винсенте прошло чуть более тридцати лет, и этот период ознаменовался большим числом исследований. Однако проблема не утратила своей остроты. Об этом свидетельствует то, что чуть ли не ежегодно собираются авторитетные форумы ученых для обсуждения новых вызовов, связанных с диабетом. Так, в июне 2018 года на очередной сессии Американской диабетической ассоциации был представлен новый консенсус, предложенный совместно американской и европейской ассоциациями по лечению сахарного диабета второго типа.

Имеет место опережающий рост заболеваемости диабетом. По прогнозам Всемирной Организации Здравоохранения, мир должен был к 2015 году подойти к черте в 300 миллионов болеющих диабетом второго типа. Однако доклад ВОЗ показывает, что в 2014 году диабетом страдали 422 миллиона взрослых во всем мире. Таким образом, оправдываются пессимистические сценарии прогрессирования заболеваемости.

В Казахстане число заболевших к концу 2018 г. составило более 420 тысяч человек и, согласно Национальному регистру, по социально-медицинским показателям, сахарный диабет вышел на третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний (<http://www.medinfo.kz>).

В своём первом «Глобальном докладе по диабету» (2016) ВОЗ отметила «огромные масштабы проблемы диабета и наличие потенциала для изменения нынешней ситуации». В докладе ВОЗ подчеркнуто, что сформирована политическая основа для принятия согласованных действий по борьбе с этим заболеванием, и она обозначена в целях в области устойчивого развития.

По мнению авторов доклада, необходимо создание национальных механизмов для обеспечения комплексных мер по диабету.

Уже на нынешнем этапе развития всего комплекса мер, включая научные исследования, затрачиваются существенные средства. Например, в мире в 2019 году было потрачено 760 миллиардов долларов (<https://www.statista.com/statistics/241820/estimated-global-healthcare-expenditures-to-treat-diabetes>).

В Республике Казахстан в 2016 году было выделено 4, 945 миллиардов тенге на закупку противодиабетических препаратов из государственного бюджета (ФерхоС.И.. <http://www.parlam.kz/ru/blogs/ferho/Details/4/20136>).

Действительно, сахарный диабет представляет в настоящее время понятную, но далеко не полностью изученную научную и социальную проблему. Это справедливо как в отношении диабета первого типа (инсулинзависимого), так и диабета второго типа (инсулиннезависимого).

Например, что касается первого, утверждение о главном звене его патогенеза – разрушении бета-клеток островкового аппарата поджелудочной железы (Д. Скайлер, 1999), то и здесь много вопросов, которые требуют своего решения. Поиски этих решений на протяжении последних пятидесяти лет успешно ведутся школами патофизиологов, в том числе, карагандинской, тесно связанной с тенденциями мировой диабетологии. Об этом говорят регулярные выступления её представителей на всемирных и европейских конгрессах диабетологов с 1988 по 2018 годы.

В этой связи представляется весьма актуальным обращение диссертанта к значительным проблемам экспериментальных исследований в этой области, так как исследование путей предотвращения деструкции β -клеток и даже репарации островкового аппарата на субклеточном, молекулярном уровне имеет значение как для науки, так и для практической области медицины. Предпринятое исследование согласуется с основными направлениями научных поисков, имеющих фундаментальное теоретическое и практическое значение.

2. НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ В РАМКАХ ТРЕБОВАНИЙ К ДИССЕРТАЦИЯМ.

Диссертационная работа Шэйбек А.Ж. выполнена в соответствии с традиционными правилами, представлена в виде письменного научного труда. Объем диссертации - 128 страниц компьютерного набора. Она состоит из литературного обзора, глав с изложением материала и методов исследования а также результатов собственных наблюдений; введения, заключения. Список использованных литературных источников представлен 197 названиями. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 11 рисунками.

В литературном обзоре диссертант подробно останавливается на физиологических аспектах инсулиногенеза и установленных в настоящее время механизмах патогенеза сахарного диабета, что, на мой взгляд, очень важно для осмысления места данного исследования в общей структуре

научных поисков в этом важнейшем направлении современной теоретической и экспериментальной эндокринологии.

При этом важно отметить, что диссертант не просто излагает основные положения учений о сахарном диабете и результаты наиболее известных работ, но даёт критическую их оценку, прослеживая эволюцию взглядов на проблему экспериментального диабета, закономерностей его развития и полученных сведений с позиций современных представлений. Считаю ценным то, что автор подробно останавливается на обзоре роли диабетогенных производных 8-оксихинолина (страницы 16-22), задавая таким образом практикоориентированный уровень интереса к веществам, потенциально опасным для человека.

Весь обзор построен так, что представляет дополнительный повод для оценки данного научного труда, показывая, как вырастает основная идея исследования из круга фундаментальных работ предшественников. Например, обсуждая механизмы диабетогенных эффектов производных ксантуреновой кислоты и особенности развития ксантуренового диабета (страницы 25-30), А. Шэйбек анализирует данные исследований Kotake, Kato, Weitzel, Ueda, отдавая почтительное должное этим работам, но в то же время замечая, что ряд феноменов метаболизма триптофана, ксантуреновой кислоты и её комплексобразующих свойств, в частности, некоторых продуктов, не были изучены. Литературный обзор в данной диссертации носит характер не формального фрагмента, а серьезной аналитической предпосылки фундаментального исследования, что придает данной главе значение научного исследования.

Раздел диссертации, отражающий методические подходы и методологию научного поиска, содержит представление дизайна диссертационного исследования. Дизайн описан весьма подробно, так что не остаётся вопросов к принципиальным его составным частям. Работа экспериментальная, построенная по канонам экспериментальной биологии. Здесь особо следует подчеркнуть, что соблюдены все этические нормы обращения с лабораторными животными, проведена этическая экспертиза независимой локальной этической комиссией медицинского университета Караганды.

В эксперименты были включены беспородные кролики, крысы и мыши. Воспроизводились модели дитизонового диабета, а также алиментарная модель, основанная на специфической диете. То есть, воссоздавались лабораторные нозологии диабета первого и второго типов, что методологически вполне оправданно и создает основу для достоверности опыта. Использовались биохимические, гистологические, иммуно-гистохимические методы исследования. Исследователь работала с объектами *in vivo* и *in vitro*, на культуре выделенных панкреатических клеток. Используемые методы всецело гармонируют с дизайном и методологически являются валидными.

В третьем разделе диссертации представлены результаты собственных наблюдений. Согласно поставленным задачам, исследователь проводил

изучение воздействия дитизона и производных оксихинолина на ткань поджелудочной железы в её островковой части (с. 46-51). Убедительно показано, что дифенилтиокарбазон (дитизон) оказывает повреждающее действие на бета-клетки и образует стойкие комплексы с ионами цинка, формируя абсолютную инсулиновую недостаточность, то же доказано и в отношении 8-толуолсульфонил-аминохинолина. Считаю, что это существенный результат, полученный в ходе эксперимента с кроликами. Он подтверждает характер процесса развития сахарного диабета первого типа, кроме того, даёт основание для размышления о токсическом действии производных 8-оксихинолина. Наряду с непосредственным токсическим и блокирующим действиями изученных веществ в отношении клеток и функции естественного захвата цинком инсулина и создания депонированного комплекса автор отмечает особенность токсического эффекта дитизона и производных 8-оксихинолина в бета-клетках. Данная деталь также становится в ряд заметных результатов собственного исследования диссертанта.

Сильной стороной работы явилось исследование одного из известных антиоксидантов и значимых участников процессов защиты от свободнорадикального окисления – глутатиона, в его окисленной и восстановленной формах. Параграф 3.2 (с. 52-62) третьего раздела диссертации описывает, как изучались в данном исследовании превентивные возможности глутатиона в части развития сахарного диабета в эксперименте. Автор убедительно показал, что предварительное введение восстановленного глутатиона позволяет предотвратить повреждающее действие диабетогенных агентов, таких как дитизон и 8-ТСХ. Однако не только превенция восстановленного глутатиона выявлена в эксперименте. В дальнейшем автор показывает, что существенным результатом является также и то, что восстановленный глутатион (GRF) оказался способен к вытеснению повреждающих веществ из их комплексов с Zn^{2+} . Это свойство отсутствует у окисленного глутатиона (GOF). Данный результат доказан с помощью апробированных и получивших признание методов детекции инсулина и его соединений с Zn^{2+} . В диссертации приведены статистические данные в виде таблиц, фотографии морфологических субстратов и хемилюминесцентных феноменов, демонстрирующих верность наблюдений исследователя.

Проведенный на следующем этапе научный поиск, объектом которого явились бета-клетки поджелудочной железы новорождённых крысят, привел к установлению факта прямого протективного эффекта введения восстановленного глутатиона (с. 63-68) в отношении инсулинпродуцирующих клеток. Окисленный глутатион, введенный с той же целью, показал отсутствие такого рода компетенций. Таким образом, получен важный научный результат при изучении проблем патогенеза экспериментального диабета с помощью иммуногистохимического и морфологического методов *in vitro*.

Развивая исследовательский план, в котором стержневую роль играла идея оценки протективных качеств тиол-содержащего антиоксиданта глутатиона, автор углубила исследование, включив изучение защитных свойств тиол-содержащей аминокислоты цистеина в сравнении с другой аминокислотой, серином. Оправданность такого подхода поддержал полученный результат исследования (с.68-76), который позволяет причислить цистеин к пулу протекторов инсулиногенных клеток поджелудочной железы. Серин не продемонстрировал таких свойств, что подтверждает репутацию сульфгидрильных групп, присутствующих в ряде соединений, как основных акторов антиоксидантного действия за счет афинности к ионам металлов. Соответственно их отсутствие не наделяет подобными свойствами другие соединения.

Дополнительной задачей, которую решало данное исследование, стало выяснение деструктивного влияния диabetогенных веществ на эндотелий капилляров, интимно связанных с полюсами групп бета-клеток. Этому было посвящено изучение токсичности цинк-дитизиновых комплексов в отношении микрососудистого русла, контактирующего с мембранами β -клеток (с. 76-81). Найденные сосудистые повреждения отнесены автором к феномену острого токсического поражения данным комплексом. Очевидно, данный феномен требует дальнейшего изучения и рассмотрения в патогенетических моделях сахарного диабета на разных этапах его развития.

В отдельном эксперименте прослежено влияние пиридоксина как агента, подавляющего повреждающие эффекты эндогенных метаболитов ксатуреновой кислоты. Данный результат представляется довольно важным с точки зрения последующих исследований в данном плане (с.81-89). Полагаю, что он демонстрирует широту взгляда экспериментатора и ученого, стремящегося охватить все стороны механизмов патогенеза диабета и поэтому выходит за рамки задач данной работы. Однако достоин уважения и признания как компонент всестороннего научного поиска.

Глава 5 (с.89-103) диссертации целиком посвящена оценке роли восстановленного глутатиона в превенции сахарного диабета у экспериментальных животных. Рассмотрена его роль в восстановлении нарушенного дитизином баланса антиоксидантной защиты и стабилизации процессов свободнорадикального окисления. Исследованы его эффекты в зависимости от соотношения сроков введения GRF животным до дитизиновой атаки. Полученный результат обосновывает различные аспекты потенциала глутатиона восстановленного как перспективного соединения в его защитной компетенции применительно к развитию экспериментального сахарного диабета.

3. СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ КАЖДОГО РЕЗУЛЬТАТА (НАУЧНОГО ПОЛОЖЕНИЯ), ВЫВОДОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЯ СОИСКАТЕЛЯ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ.

Проведенное диссертантом научное исследование выполнено в соответствии с целью и задачами, поставленными в работе, отвечает

дизайну, разработанному автором. С точки зрения научной методологии заслуживает одобрения приверженность исследователя принципам валидации методик, строгому следованию правилам доказательности и точности проводимых наблюдений. Диссертант тщательно сформировал группы животных. Предварительно отработана и реализована этапность проведения экспериментов, соблюдены этические нормы проведения опытов. Используются научные методы детекции наблюдаемых феноменов, современные способы и технологии исследования.

Результат, соответствующий выводу 1, о том, что восстановленный глутатион способен предотвращать у опытных животных развитие экспериментального диабета, вызываемого диабетогенными цинксвязывающими соединениями основан на собственных наблюдениях в эксперименте и получен в ходе оценки уровней гипергликемии, основном патогномичном признаке наличия диабета, или отсутствия таковой - в нескольких сериях и на группах животных. Результат, отраженный в выводе 2, относительно механизма действия глутатиона как способности связывать цинк в β -клетках, обоснован и достоверен, так как построен на подтвержденных фактах детекции хемилюминисцентным способом и цитоморфологическим методом комплексов глутатион-цинк, предотвращающих соединением посленего с дитизоном. Вывод 3 о непосредственном воздействии восстановленного глутатиона на панкреатический инсулиногенный аппарат, также достоверен, поскольку получен исследованием глутатиона в самой культуре панкреатических β -клеток. Вывод 4 о индуцированном пиридоксином подавляющем влиянии на синтез ксантуреновой кислоты основан на изучении диабетических эффектов стимулированной специфической диетой эндогенной продукции данной кислоты в присутствии витамина B6 или без него. Вывод 5 об антиоксидантной активности восстановленного глутатиона является обоснованным и достоверным в силу того, что в опытах доказан рост в его присутствии активности всех исследованных компонентов антиоксидантной защиты.

4. СТЕПЕНЬ НОВИЗНЫ КАЖДОГО РЕЗУЛЬТАТА (ПОЛОЖЕНИЯ), ВЫВОДА И ЗАКЛЮЧЕНИЯ СОИСКАТЕЛЯ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

Результат и вывод 1 о способности глутатиона предотвращать у опытных животных развитие экспериментального диабета, вызываемого диабетогенными цинксвязывающими соединениями, следует признать новым, так как указывает на новый механизм вмешательства тиолсодержащего соединения в патогенез экспериментального диабета.

Результат, полученный в ходе исследования в сериях экспериментов, и вывод 2, устанавливающий способность восстановленного глутатиона связывать цинк в β -клетках, является новым, поскольку аффинность глутатиона к внутриостровковым ионам Zn, впервые показана в эксперименте и доказана достоверными методами

Научные результаты, отраженные в выводе 3, сам третий вывод следует признать новым, так как впервые показана активность глутатиона в его восстановленной и окисленной формах в отношении инсулинкомпетентных клеток поджелудочной железы у экспериментальных животных.

Результат, отраженный в четвертом выводе, также необходимо оценить как новый, поскольку он основан на впервые проведенном изучении эффектов специфической диабетогенной диеты в целях создания модели диабета второго типа у лабораторных животных, в присутствии пиридоксина.

Результаты научного эксперимента с участием лабораторных животных и вывод 5 об антиоксидантной активности восстановленного глутатиона является частично новым, так как антиоксидантные свойства восстановленного глутатиона известны по ряду предыдущих исследований, в том числе экспериментальных. Однако данные свойства изучались автором в рамках оригинальных задач исследования в особых условиях экспериментального диабета и действия диабетогенных агентов.

5. ПРАКТИЧЕСКАЯ И ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Диссертационный труд А.Ж. Шэйбек направлен на решение научных задач фундаментального значения – выявления молекулярно-клеточных триггеров патогенеза сахарного диабета. Решение этой задачи позволяет найти новые подходы к изучению глобальной проблемы сахарного диабета и получить новые представления о повреждающих факторах экзогенного и эндогенного происхождения, а также путях их проникновения к инсулинкомпетентным внутриклеточным структурам. Доказательства острого повреждения бета-клеток производным 8-оксихинолина имеют большое практическое значение в части показаний и противопоказаний применения лекарственных средств противомикробного спектра, в составе которых имеются производные 8-оксихинолина.

6. ЗАМЕЧАНИЯ, ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИИ.

Работа заслуживает весьма положительной оценки. Имеются отдельные недостатки в изложении. В частности, ряд стилистических погрешностей. Опечаток, которые необходимо отредактировать. Кроме того, необходимо проверить нумерацию страниц в указанных литературных источниках, таблиц в тексте диссертации. Представляется излишним включение в главу о результатах собственных наблюдений и их обсуждении повторов относительно методов проводимых исследований или полного и подробного описания методики проведения исследования. Всё это можно было сосредоточить в соответствующей главе диссертации. Хотя это отражает скрупулезность и высокую ответственность диссертанта.

Полагаю, что исследование эффектов аминокислот в отношении превенции сахарного диабета – очень интересная и реализованная с блеском идея, но она выпадает из контекста исследования и представляется избыточной для данного труда.

Указанные недостатки не умаляют значения работы и могут быть обсуждены в ходе научной дискуссии.

7. СООТВЕТСТВИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ В РАМКАХ ТРЕБОВАНИЙ ПРАВИЛ ПРИСУЖДЕНИЯ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ.

Диссертационная работа Шэйбек А.Ж. «Предотвращение восстановленным глутатионом деструкции панкреатических β -клеток, вызываемой диабетогенными цинксвязывающими веществами и исследование механизмов его предупреждающего действия» является законченным научным исследованием и отвечает всем предъявленным требованиям «Правил присуждения ученых степеней» к докторским диссертациям по стандарту Комитета по обеспечению качества в сфере образования и науки МОН РК, а её автор Шэйбек Алтынай Жұпарқызы, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени доктора философии (PhD), по специальности 6D060700 - «Биология».

Профессор кафедры
внутренних болезней
НАО «Медицинский
Университет Караганды
доктор медицинских наук, профессор

