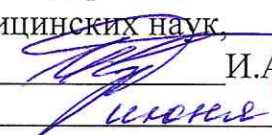
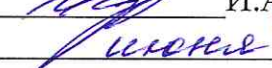


УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
и инновационному развитию
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Рязанский государственный
медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
профессор  И.А. Сучков
« 30 »  2025 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Селектины в функциональном ответе эндотелия на нитрозативное повреждение» выполнена на кафедре биологической химии и в центральной научно-исследовательской лаборатории.

В период подготовки диссертации соискатель Короткова Наталья Васильевна работала в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре биологической химии в должности доцента.

В 1995 году окончила Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова по специальности «медико-профилактическое дело».

В 2015 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Активность катепсинов L и H при заболеваниях вен нижних конечностей» по специальности «Биохимия».

Работает на кафедре биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский

государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в должности доцента.

Научный консультант – Калинин Роман Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ректор, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Адгезия молекул, как между клетками, так и между клетками и компонентом внеклеточного матрикса, является важнейшим этапом физиологических и биохимических процессов. Молекулы межклеточной адгезии эндотелия сосудистой стенки, тромбоцитов и лейкоцитов являются важными участниками процессов васкулогенеза, развития и регенерации сосудистой системы с одной стороны, и участниками наиболее ранних этапов нарушения функции эндотелия с последующим развитием патологии – с другой.

На сегодняшний день известны пять классов молекул межклеточной адгезии: интегрины, кадгерины, иммуноглобулины (в том числе нектины), селектины и адрессины. Селектины являются трансмембранными гликопротеинами, высоко асимметричными сложными белками мозаичного строения. Семейство селектинов включает в себя трех представителей: Р-селектин (CD62P), Е-селектин (CD62E) и L-селектин (CD62L), несколько отличающихся по структуре и паттернам экспрессии. Одна из наиболее значимых функций селектинов связана с начальной стадией каскада адгезии лейкоцитов, в результате которой происходит их связывание с эндотелием, роллинг и дальнейшая экстравазация в ткани.

Селектины способны связываться с лигандами, представленными олигосахаридами, с участием ионов кальция. Так, для осуществления сложного взаимодействия селектины связываются со своим высокоаффинным лигандом, в

структуру которого входит вышеуказанный эпитоп для распознавания, - PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, CD 162). PSGL-1 экспрессируется всеми нейтрофилами крови, моноцитами и лимфоцитами.

По мнению ряда современных исследователей, сердечно-сосудистые заболевания протекают на фоне эндотелиальной дисфункции, которая, как правило, сопровождается нитрозативным стрессом. От заболеваний периферических артерий нижних конечностей (ЗПА) страдают более 230 миллионов человек в мире, они осложняются повышенным риском неблагоприятных клинических исходов: ишемической болезни сердца и инсультов, потери конечности. Хронические заболевания вен являются стойкими, прогрессирующими заболеваниями, широко распространенными в общей популяции, патофизиология которых приводит к повышению венозного давления и нарушению возврата крови.

Нитрозативный стресс характеризуется дисбалансом метаболизма NO и активных форм кислорода (АФК) с образованием токсичного продукта пероксинитрита. Появление пероксинитрита приводит к повышению образования АФК; и то, и другое может сопровождаться повреждением структуры селектинов, так как последние насчитывают в своей структуре до 65 остатков цистеина, чувствительных к окислению. В свою очередь, повреждение структуры селектинов может приводить к нарушению роллинга и трансмиграции лейкоцитов в ткани, и являться триггером в развитии сосудистых заболеваний.

Таким образом, изучение роли семейства селектинов в процессе связывания лейкоцитов с клетками эндотелия в условиях нитрозативного стресса представляется на сегодняшний день актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором самостоятельно выполнен обзор литературы по изучаемой проблеме, составлен дизайн исследования, проведены эксперименты на культуре клеток HUVEC и фракционированных лейкоцитах периферической крови, биохимические

исследования сыворотки крови пациентов, проведена обработка и интерпретация данных, публикация научных статей по теме диссертационной работы.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью MS Office Excel (Microsoft, США). Для проведения статистического анализа использовалась программа IBM SPSS 26 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, United States).

Качественные показатели представлялись абсолютными числами (n) и процентами (%), для их анализа применялись критерий Хи-квадрат Пирсона и точный критерий Фишера. Распределение количественных показателей оценивалось с применением критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении средние значения представлялись средней арифметической со средним квадратическим отклонением ($M \pm \sigma$), для сравнения несвязанных совокупностей применялся t-критерий Стьюдента с оценкой равенства дисперсий по критерию Ливиня, связанных – t-критерий Стьюдента. При распределении, отличном от нормального, средние значения представлялись медианой и межквартильным интервалом (Me, Q1-Q3), для сравнения несвязанных совокупностей применялся критерий Манна-Уитни, связанных – Уилкоксона. При множественном сравнении использовался дисперсионный анализ, в том числе критерии Краскелла-Уоллеса и Фридмана с дальнейшими апостериорными попарными сравнениями.

Критический уровень значимости – $p < 0,05$ (двусторонняя p).

При оценке данных, полученных в эксперименте, использовали программу Graph Pad Prism 9. Для анализа взаимосвязи признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона (r).

Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом

(ANOVA), множественные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$

В работе использованы современные, адекватные цели и задачам исследования, методики: иммуноцитохимические, флюориметрические, спектрофотометрические, фотоколориметрические, вестерн-блот, метод иммуноферментного анализа.

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой и не вызывает сомнений. Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований и достаточном количестве пациентов, и логически вытекают из результатов исследования.

В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и иностранных авторов.

Новизна результатов проведенных исследований

Впервые в работе была проанализирована связь растворимой формы молекул клеточной адгезии селектинов sP, sE, sL и их гликопротеинового лиганда PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей – атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом с циклом оксида азота (II) в зависимости от выраженности нитрозирующего стресса. Было отмечено, что изучаемая патология сосудов нижних конечностей сопровождается снижением концентрации молекул межклеточной адгезии селектинов sP, sL, тенденцией к снижению sE, и повышением уровня универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1, а также повышением в разной степени концентрации показателей окислительного/нитрозирующего стресса: стойких метаболитов оксида азота (II), нитротирозина, битирозина, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков в сыворотке крови. В работе впервые отмечено, что степень выраженности нитрозирующего стресса выше у пациентов с артериальной патологией, нежели с венозной. Отмечена разница в уровнях селектина sP, эндотелиальной NO-синтазы, гликопротеинового лиганда PSGL-1 и нитротирозина, которые в сыворотке крови

пациентов с артериальной патологией оказались выше.

Также впервые дана оценка связям между уровнем растворимого фрагмента белков клеточной адгезии sP, sE, sL, универсального для всех селектинов лиганда PSGL-1 в сыворотке крови и показателями нитрозилирующего стресса: метаболитами оксида азота (II), нитротирозином, битирозином, пероксинитритом. Проанализирована выраженность нитрозилирующего стресса в зависимости от клинических проявлений по принятым международным классификациям.

Впервые установлены корреляционные связи: средней силы между уровнями eNOS и метаболитами NO у пациентов с артериальным тромбозом, слабой силы между iNOS и селектином L, iNOS и PSGL-1 у пациентов с атеросклерозом, слабой силы между уровнями eNOS и селектином E у пациентов с венозной патологией: варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом.

В эксперименте по совместной инкубации первичной клеточной линии HUVEC с растворами пероксинитрита в различных концентрациях было продемонстрировано развитие нитрозилирующего стресса, что подтверждалось снижением активности митохондриальных дегидрогеназ, нарастанием продуктов нитрозилирующего стресса в лизатах клеток. Впервые были установлены изменения относительного количества селектинов P и E, индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы в лизатах клеток в зависимости от концентрации пероксинитрита и длительности инкубации, изменения концентрации растворимых форм селектинов в кондиционной среде.

Также в эксперименте по совместной инкубации первичной клеточной линии HUVEC с растворами S-нитрозоглутатиона в различных концентрациях было продемонстрировано развитие нитрозилирующего стресса, что подтверждалось снижением активности митохондриальных дегидрогеназ, нарастанием продуктов нитрозилирующего стресса в лизатах клеток. Впервые были установлены изменения относительного количества селектинов P и E, индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз в лизатах клеток в зависимости от концентрации S-нитрозоглутатиона и длительности инкубации, а также изменения абсолютного количества растворимых

форм селектинов в кондиционной среде. Выявлены концентрации пероксинитрита и GSNO, одновременно статистически значимо меняющие относительное количество селектинов в лизатах клеток и абсолютное количество их растворимых форм в кондиционной среде.

Впервые было показано изменение абсолютного количества селектина L и общего для селектинов лиганда PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов: моноядерных и полиморфноядерных, после их совместного культивирования с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Исследование носит преимущественно фундаментальный характер. Представленные в работе данные продемонстрировали разницу в концентрации растворимых форм sP, sE и sL-селектинов, универсального лиганда трех селектинов и показателей нитрозилирующего стресса в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей по сравнению со здоровыми лицами, также была установлена разница в адгезивной функции эндотелия в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса у пациентов с атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом. Исследование позволило расширить представления о роли селектинов в патологии сосудов нижних конечностей.

Данные, полученные в экспериментальных условиях *in vitro* позволили оценить влияние токсичного продукта оксида азота (II) пероксинитрита, а также влияние эндогенного донатора оксида азота (II) – S-нитрозоглутатиона на относительное содержание молекул клеточной адгезии селектинов P и E, а также индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз в лизатах первичной клеточной линии HUVEC и растворимых форм указанных селектинов в кондиционной среде при их совместной инкубации клеток с указанными веществами в разных концентрациях и длительности экспозиции. Кроме того, полученные *in vitro* результаты исследования позволяют сделать вывод о влиянии пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона на абсолютное количество молекулы клеточной адгезии селектина L и общего лиганда

селективных PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов: полиморфноядерной и моноядерной фракциях.

Полученные данные дополняют современные представления о влиянии нитрозирующего стресса на адгезивную функцию эндотелия, выражающуюся в изменении относительного количества белков клеточной адгезии селективных.

Ценность научных работ соискателя

Проведенные исследования позволили углубить представления о селектинах и их универсальном лиганде в условиях нитрозирующего стресса и их уровне у пациентов с сосудистой патологией нижних конечностей, что стало основой для дальнейших исследований их диагностического и прогностического применения, а также перспективного изучения с точки зрения терапевтических приложений.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена изучению белков клеточной адгезии селективных в функционировании эндотелия у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей и в экспериментальных условиях воздействия пероксинитритом и S-нитрозоглутатионом. Она соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 12 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 10 – в изданиях, относящихся к категориям K1 и K2.

1. Изучение молекулярных механизмов эндотелиальной дисфункции *in vitro* / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.В. Короткова, Н.Д. Мжаванадзе // Гены и клетки. – 2019. – Т. XIV, № 1. – С. 22-32. DOI: 10.23868/201903003.

2. Изучение содержания Р-, Е-селективных и гликопротеинового лиганда PSGL-1 у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Молекулярная медицина. – 2022. – Т. 20, № 2. – С.

39-45. DOI: 10.29296/24999490-2022-02-06.

3. Оценка уровня селектинов и их лиганда PSGL-1 у пациентов с острым венозным тромбозом / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25, № 5. – С. 3-9. DOI: 10.29296/25877313-2022-05-00.

4. Оценка уровня селектинов и гликопротеинового лиганда PSGL-1 у пациентов с артериальным тромбозом / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Технологии живых систем. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 72-79. DOI: 10.18127/j20700997-202304-07.

5. Взаимосвязь уровня NO-синтаз и P-, E-селектинов у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2023. – Т.75, № 9. – С. 40-47. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-75-9-40.

6. Различные концентрации пероксинитрита вызывают уникальный клеточный ответ эндотелиоцитов *in vitro* / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Молекулярная медицина. – 2024. – Т. 22, № 4. – С. 51-57. DOI: 10.29296/24999490-2024-04-08

7. Оценка связи между концентрацией PSGL-1, NO-синтаз и метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациентов с острым артериальным тромбозом / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2024. – Т. 27, №7. – С. 42-48. DOI: 10.29296/25877313-2024-07-00.

8. Идентификаторы нитрозативного стресса у пациентов с периферическим атеросклерозом / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2024. – Т.7, № 2. – С. 56-63.

9. Экспрессия селектинов и выраженность нитрозилирующего стресса у пациентов с острым тромбозом вен нижних конечностей / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 3. – С. 29-37. DOI: 10.29296/25877313-2025-03-04.

10. Артериовенозный фенотип эндотелиоцитов влияет на экспрессию эндотелий специфичных белков / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2025. – Т. 28, №1. – С. 83-89. DOI: 10.18499/2070-9277-2025-28-1-83-89.

11. Количественная оценка селектина Е при экспериментальном влиянии нитрозоглутатиона / Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2025. – Т. 82, №4. – С. 88-95. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/25-82-4-88.

12. Влияние донатора оксида азота S-нитрозоглутатиона на относительное количество Р-селектина *in vitro* / Н. В. Короткова, Р. Е. Калинин, И. А. Сучков [и др.] // Молекулярная медицина. – 2025. – Т. 23, № 3. – С. 101-107. – DOI 10.29296/24999490-2025-03-13.

Диссертация «Селектины в функциональном ответе эндотелия на нитрозативное повреждение» Коротковой Натальи Васильевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: биологической химии; фармакологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; математики, физики и медицинской информатики; центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава 15 человек. Результаты голосования: «за» – 15 человек; «против» – нет; «воздержались» – нет (протокол № 1 от 25 июня 2025 года).

Председатель межкафедрального совещания,
заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

Якушева Елена Николаевна

Подпись профессора Якушевой Е.Н. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

Сучков Игорь Александрович

