

ОТЗЫВ

официального оппонента, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», доктора биологических наук **Шумаева Константина Борисовича** на диссертационную работу Коротковой Натальи Васильевны «Селектины в функциональном ответе эндотелия на нитрозативное повреждение», представленную на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность работы

Диссертационная работа Коротковой Натальи посвящена изучению семейства адгезионных молекул, селектинов Р, Е и L и их растворимых форм у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей: атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом, в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса. К настоящему времени в научной литературе накоплен огромный объём экспериментальных и клинических данных по оксиду азота (II) или NO, по метаболизму этого соединения, в том числе изоферментам, участвующим в его биосинтезе – NO-синтазам (NOS), физиологическим эффектам, а также патогенетическим аспектам заболеваний, связанных с нарушением синтеза NO.

На сегодняшний день известны несколько изоформ NOS, в том числе, нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS). Индуцибельная (iNOS) может экспрессироваться под действием эндотоксина, провоспалительных цитокинов и ряда других факторов. Реализация биохимических эффектов NO может осуществляться по цГМФ-зависимому механизму, что характерно для конститутивных форм, и цГМФ-независимому, присущему iNOS: воздействие осуществляется посредством образования ряда промежуточных соединений и продуктов их взаимодействия с белками. Так, при взаимодействии оксида азота (II) с молекулой кислорода образуются другие окислы азота, а при его взаимодействии с супероксид-анион радикалом (O_2^-) NO превращается в

пероксинитрит ($ONOO^-$), который является мощным окислителем способным нитрозировать и нитровать белки, вызывая развитие нитрозативного стресса. Селектины имеют в активных сайтах достаточное количество серосодержащих аминокислот, вследствие чего может осуществляться их окисление и нарушение функционирования, приводящее к нарушению адгезивной функции эндотелия.

Помимо самого NO, его конечные стабильные метаболиты ($NO_2^- + NO_3^- = NO_x$) также рассматриваются в качестве сигнальных молекул и маркеров различной патологии, в том числе, и как новый фактор риска сердечно-сосудистых событий; NO_x в высоких концентрациях могут восстанавливать уровень NO при заболеваниях, связанных с его недостаточной генерацией или нарушенной биодоступностью. Вместе с тем, регуляторное действие NO во многом обусловлено S-нитрозоглутатионом и другими S-нитрозотиолами, являющимися физиологическими депо и донорами оксида азота (II).

Все вышеперечисленное и определило актуальность представленного исследования.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Впервые была установлена разница между уровнем растворимой формы молекул клеточной адгезии селективных sP, sE, sL, их универсального лиганда PSGL-1 в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей – атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом, по сравнению со здоровыми людьми. Отмечено, что при изучаемой патологии уровень sP, sE, sL ниже, а уровень PSGL-1 выше, чем у здоровых доноров. Определено, что повышен уровень показателей окислительного/нитрозирующего стресса: NO_x , нитротирозина, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов, по сравнению со здоровыми донорами, тогда как битирозин меняется разнонаправленно. Нитротирозин является одним из ведущих факторов, влияющих на селектины по данным многофакторного регрессионного анализа.

В экспериментальных условиях продемонстрировано развитие

нитрозилирующего стресса под действием *ONOO*– и S-нитрозоглутатиона и их влияние на количественные характеристики селектинов, что свидетельствует о влиянии оксида азота (II) на адгезивную функцию эндотелия. Кроме того, впервые было показано изменение абсолютного количества селектина L и PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов: моноядерных и полиморфноядерных, после их совместного культивирования с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона *in vitro*, что также может служить подтверждением влияния NO на селектин L и общий для селектинов лиганд PSGL-1.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций сформулированных в диссертации

Представленный подробный анализ литературных данных демонстрирует глубокий анализ современных научных исследований, посвященных роли эндотелия, его дисфункции и молекулярным механизмам, лежащим в основе взаимодействия эндотелиальных и гемопоэтических клеток. Все это позволило диссертанту сформулировать цель и определить задачи исследования.

Для достижения поставленной цели и решения сформулированных задач автором был применен широкий спектр различных биохимических методов, а также методик культивирования клеток: флюориметрия, спектрофотометрия, фотоколориметрия, иммуноцитохимия, вестерн-блот, иммуноферментный анализ, выделение первичной клеточной линии и её культивирование.

Исследование выполнено на достаточном количестве пациентов и достаточном количестве экспериментального материала. Экспериментальные серии адекватны поставленным задачам исследования.

В работе применены корректные методы статистического анализа. Выводы соответствуют задачам. Практические рекомендации обоснованы.

Результаты диссертационного исследования доложены автором на российских и международных конференциях. По результатам опубликовано 29

печатных работ, полностью отражающих основные материалы диссертации, в том числе 12 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из них 8, входящих в категорию K1-K2, 1 – входящих в цитатно-аналитическую базу Scopus, внедрено 4 рационализаторских предложения.

Практическая и научная значимость полученных результатов

Научная и практическая значимость диссертационного исследования Коротковой Н.В. не вызывает сомнений, поскольку результаты исследования расширяют фундаментальные представления о влиянии оксида азота (II) на адгезивную функцию эндотелия, выражающуюся в изменении относительного количества селектинов Р и Е в клетках первичной линии эндотелиоцитов HUVEC, а также селектина L и общего для селектинов лиганда PSGL-1 во фракционированных лейкоцитах периферической крови в экспериментальных условиях при культивировании клеток совместно с такими важными метаболитами NO как пероксинитрит и S-нитрозоглутатион.

Работа также имеет и практическую направленность, поскольку автор активно связывает молекулярные механизмы с практической медициной, демонстрируя возможность селектинов и их лиганда являться предикторами заболеваний сосудов нижних конечностей и служить диагностическими маркерами патологии. В диссертационном исследовании показано, что растворимые формы селектинов снижаются в сыворотке крови пациентов с патологией сосудов нижних конечностей, тогда как уровень гликопротеинового лиганда селектинов PSGL-1 повышается по сравнению с контролем.

Научная и практическая значимость работы подтверждается внедрением результатов исследования в процесс обучения студентов на кафедре биологической химии, на кафедре сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, и внедрением 4-х рационализаторских предложений в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Содержание диссертационной работы, её завершённость и оформление

Диссертация построена по классическому стилю и состоит из введения, 4-х глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, она хорошо иллюстрирована 33 таблицами и 93 рисунками.

Во введении дано обоснование актуальности темы, отражены цель и задачи, степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен подробный анализ литературных источников по теме диссертационного исследования. Изложены имеющиеся в литературе современные данные об участии селектинов и их гликопротеинового лиганда в физиологических процессах и различных патологиях. Также описывается роль оксида азота и синтаз оксида азота в патогенезе сосудистой патологии.

В второй главе описаны материалы и методы, применяемые в исследовании. Материалом для на первом этапе исследования явилась сыворотка крови от пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей: атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом, которые проходили стационарное лечение в клиниках г. Рязани: Государственном бюджетном учреждении Рязанской области «Больница скорой медицинской помощи» и в Государственном бюджетном учреждении Рязанской области «Областная клиническая больница» в 2020 – 2023 гг.

Материалом для второго этапа исследования явились лизаты эндотелиоцитов, полученных от здоровых рожениц, и гомогенаты фракционированных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров. Вторым этапом явилось моделирование экспериментальных условий повышенного уровня NO и развития нитрозативного стресса на клеточной линии HUVEC и фракционированных лейкоцитах крови путем инкубации клеток с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона, а также количественное определение селектинов, их лиганда, синтаз оксида азота, и различных показателей нитрозативного стресса.

Для проведения диссертационного исследования было использовано большое количество биохимических методов, таких как спектрофотометрия, фотоколориметрия, флуориметрия, иммуноферментный анализ, вестерн-блот, иммуноцитохимия. Использованные методические подходы современны и высокотехнологичны, что позволяет решить все поставленные автором задачи. Применяемые методы статистической обработки адекватны.

В третьей и четвертой главах описаны результаты собственных исследований соискателя, по клиническому блоку и экспериментальному соответственно. Данные главы занимают существенную часть от всего объема диссертации, материал хорошо структурирован. Последовательность изложения результатов соответствует порядку сформулированных задач.

Необходимо отметить, что в этих главах проведен глубокий анализ полученных клинических и экспериментальных данных, результаты сопровождаются наглядными графическими изображениями и табличным материалом, который улучшает восприятие большого объема данных.

Базы данных по исследуемым пациентам были сформированы в таблицах 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). Также, для оценки экспериментальных данных применяли программу Graph Pad Prism 9. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA).

Выводы диссертации грамотно сформулированы, аргументированы, на основе глубоко анализа полученных результатов диссертантом были предложены убедительные объяснения полученных фактов.

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

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и

отражает её основные положения, результаты и выводы, даёт полное представление о работе.

Публикации результатов исследования в научных изданиях

По результатам диссертационного исследования опубликовано 29 печатных работ, полностью отражающих основные материалы диссертации, в том числе 12 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, 1 – входящая в цитатно-аналитическую базу Web of Science и Scopus, внедрено 4 рационализаторских предложения. Результаты доложены автором на конференциях российского и международного уровня.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

В целом работа заслуживает положительной оценки. Принципиальных замечаний к диссертационной работе Коротковой Н.В. не имею. В тексте работы встречаются отдельные орфографические ошибки, например на стр. 180 диссертации написано S-глутатиона вместо S-нитрозоглутатиона. В некоторых таблицах (например в таблице 1 в автореферате) имеется опечатка в единицах измерения пероксинитрита, т.е. mM на литр вместо мкМ на литр.

Тем не менее, на мой взгляд, в диссертационной работе недостаточно обсуждены возможные молекулярные механизмы пролонгированного действия пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона.

Кроме того, хотелось бы узнать мнение диссертанта о роли в исследованных процессах таких важных метаболитов NO как динитрозильные комплексы железа.

Заключение

Диссертация Коротковой Натальи Васильевны «Селектины в функциональном ответе эндотелия на нитрозативное повреждение», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Полученные в процессе выполнения работы результаты,

демонстрирующие наличие взаимосвязей белков межклеточной адгезии, селектинов, с показателями нитрозилирующего стресса у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, а также полученные в эксперименте при моделировании условий нитрозативного стресса и повышенного уровня оксида азота данные, позволяют сделать вывод о влиянии оксида азота на селектины и их универсальный лиганд. По актуальности решённой проблемы, объёму исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а ее автор, Короткова Наталья Васильевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», доктор биологических наук (03.01.04 Биохимия)

«28» ноября 2025 г.  Шумаев Константин Борисович

Подпись д.б.н. Шумаева К.Б. заверяю

Учёный секретарь

Федерального государственного учреждения

«Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук»

кандидат биологических наук



Орловский А.Ф.

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2

Телефон: +7(916)642-14-19

E-mail: tomorov@mail.ru