

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой биохимии имени Р.И. Лифшица, ведущего научного сотрудника центральной научно-исследовательской лаборатории федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, доцента, **Синицкого Антона Ивановича**, 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

В настоящее время активно изучаются молекулы клеточной адгезии как в условиях нормы, так и при патологических состояниях. Таким классом молекул являются селектины – класс сложных трансмембранных белков, принадлежащий к кальций-зависимым лектинам С-типа, включающий в себя три белка Р-, Е- и L-селектины. К функциям селектинов относится прежде всего обеспечение первичных взаимодействий лейкоцитов и тромбоцитов с эндотелием при физиологических: гемостаз и регенерация, а также при патологических процессах: тромбозы и метастазирование. Взаимодействия между селектинами и их лигандами являются точкой приложения для различных терапевтических вмешательств при патологии. В этой связи селектины представляются перспективным объектом изучения. Изменение функционирования селектинов может приводить к нарушению функции эндотелия, которая, как правило, сопровождает сосудистую патологию.

Важным патогенетическим фактором, способствующим развитию сердечно-сосудистых заболеваний, является и нитрозативный стресс, связанный с избыточной генерацией активных форм азота. Известно, что структура и функции селектинов, как и адгезивная функция эндотелия при нитрозативном стрессе могут претерпевать значительные изменения. Избыток активных форм азота может оказать как прямое воздействие на структуру адгезивных молекул, так и опосредовать нарушения их экспрессии. Между тем, механизмы влияния

нитрозативного стресса на систему селектинов при заболеваниях сосудов остаются практически неизученными. Целью представленного диссертационного исследования является количественная оценка селектинов, их гликопротеинового лиганда PSGL-1 в зависимости от выраженности нитрозативного стресса при заболеваниях сосудов нижних конечностей и в эксперименте *in vitro*, поэтому его актуальность не вызывает сомнений.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Научная новизна исследования не вызывает сомнений, поскольку впервые была проанализирована связь растворимой формы селектинов sP, sE, sL и их гликопротеинового лиганда в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей – атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом, с системой оксида азота (II) в зависимости от выраженности нитрозирующего стресса.

Подтверждена зависимость изменений абсолютного количества растворимых форм селектинов и их лиганда от показателей нитрозативного стресса, выявленными множественными статистически значимыми корреляционными связями между изучаемыми показателями. В многофакторном регрессионном анализе выявлено, что нитротирозин, iNOS, eNOS и метаболиты NO являются ведущими факторами, влияющими на селектины и PSGL-1 у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей.

В экспериментальном исследовании на первичной клеточной линии HUVEC было продемонстрировано влияние NO и интермедиатов системы NO на показатели относительного количества селектинов P и E в лизатах клеток, изменение растворимых форм селектинов в культуральной среде, а также изменение относительного количества индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз в лизатах клеток при инкубации клеток с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона.

Культивирование фракционированных лейкоцитов *in vitro* с растворами пероксинитрита и нитрозоглутатиона продемонстрировало изменение

абсолютного количества PSGL-1 и селектина sL в гомогенатах фракционированных полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов.

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

Подробный анализ литературы позволил автору получить объективную информацию по изучаемой проблеме, определить цель и сформулировать задачи исследования. Для решения поставленных задач и достижения цели исследования использован широкий спектр биохимических методов: вестерн-блот, иммуноферментный, спектрофотометрический, флюориметрический, фотоколориметрический анализ, изопикническое центрифугирование; а также культуральных методов: выделение первичной клеточной линии, иммуноцитохимический метод, МТТ-тест.

Исследование выполнено на достаточном количестве пациентов и объёме экспериментального материала. В работе использованы современное программное обеспечение и методы статистического анализа. По результатам исследования сформулированы выводы, которые соответствуют поставленным задачам и цели исследования.

Стоит подчеркнуть и значительный уровень апробации результатов исследования, которые были представлены в форме научных докладов на конференциях, в том числе, зарубежных.

Практическая и научная значимость полученных результатов

Представленные в диссертационном исследовании результаты позволяют расширить современные представления о влиянии нитрозативного стресса на адгезивную функцию эндотелия, выражающуюся в изменении относительного количества селектинов.

В работе продемонстрированы различия в концентрации растворимых форм sP, sE и sL-селектинов, их универсального лиганда PSGL-1 и показателей нитрозативного стресса в сыворотке крови пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей. Установлены особенности адгезивной функции эндотелия в зависимости от выраженности нитрозативного стресса у пациентов с

атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом. Исследование позволило расширить представления о роли нарушения функций селектинов в патологии сосудов нижних конечностей.

Результаты экспериментального раздела работы демонстрируют влияние интермедиатов системы оксида азота на относительное содержание селектинов Р и Е, а также индуцибельной и эндотелиальной NO синтаз в лизатах первичной клеточной линии HUVEC и растворимых форм указанных селектинов в кондиционной среде; на абсолютное количество молекулы клеточной адгезии селектина sL и общего лиганда селектинов PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов: полиморфноядерной и моноядерной фракциях.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр биологической химии, сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики. Разработанные рационализаторские предложения внедрены в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Общая характеристика диссертационной работы, её завершенность

Диссертационная работа построена в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, двух глав с результатами собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, а также списка литературы, включающего 350 источников. Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 таблицами и 93 рисунками.

Во введении автор последовательно и подробно раскрывает актуальность темы исследования, формулирует его цель и задачи, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методы исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту и сведения об апробации полученных результатов. В этом разделе также представлена информация о личном вкладе автора, его публикациях по теме исследования.

В первой главе автор подробно описывает семейство селектинов, их вклад в адгезивную функцию эндотелия, общий для всех селектинов лиганд PSGL-1 а

также значение оксида азота в физиологических функциях и его роль при патологии, и в частности, сердечно-сосудистой системы.

В главе «Материалы и методы исследований» детально описан дизайн исследования клинического и экспериментального разделов работы, методы исследования и анализа данных.

В третьей главе приведены результаты клинического раздела работы и их обсуждение. Автор демонстрирует, что у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей в сыворотке крови на фоне повышения показателей нитрозативного стресса снижена концентрация растворимых форм селектинов – sP, sE, sL, а также повышена концентрация PSGL-1 у пациентов с патологией артерий и присутствует тенденция к его повышению у пациентов с патологией вен, в сравнении со здоровыми лицами. Показано, что тяжесть нитрозативного стресса и нарушения адгезивной функции более выражены у пациентов с артериальной патологией. При проведении многофакторного регрессионного анализа получены результаты, которые позволяют автору рассматривать нитротирозин, синтазы и метаболиты NO, как важные факторы изменения концентрации селектинов при патологии сосудов нижних конечностей.

В четвертой главе представлены и проанализированы данные экспериментального исследования. Показано влияние пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона на относительное количество селектина P и селектина E в лизатах эндотелиоцитов при инкубации последних с указанными агентами, а также на абсолютное количество sL - селектина и PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов.

Содержание разделов соответствует их названию, материал хорошо структурирован. В главах с результатами параллельно приводится их обсуждение. Также материал сопровождается графиками и табличным материалом, что является наглядным дополнением к восприятию материала.

В Заключение автор дает общую оценку полученных результатов. На основании полученных результатов сформулированы 9 выводов, которые в полной мере соответствуют задачам исследования и логически вытекают из

представленных результатов.

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

Результаты диссертационного исследования доложены автором на российских и международных конференциях. По результатам опубликовано 30 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 Scopus, внедрено 4 рационализаторских предложения.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

При ознакомлении с текстом диссертации возникли следующие вопросы и замечания:

1. Каков предполагаемый молекулярный механизм снижения уровней sP-, sE- и sL-селектинов в сыворотке пациентов с патологией сосудов?

2. Учтен ли фактор возраста, потенциально влияющий на уровень селектинов в клиническом разделе исследования? Средний возраст доноров - 52,3 года, в то время как, например, в группе пациентов с атеросклерозом 67,6 лет.

3. Была ли в рамках клинического раздела работы проведена оценка связи между уровнями изучаемых биохимических маркеров и клиническими показателями (например, данными ультразвукового исследования, выраженностью ишемии)?

4. Как Вы оцениваете потенциальные возможности терапевтического применения доноров NO (в частности, S-нитрозоглутатиона) по результатам Ваших исследований?

5. Чем обоснован выбор концентраций пероксинитрита (10-500 мкМ) и S-нитрозоглутатиона (10-500 мкМ), использованных в экспериментах?

6. Использовались ли при моделировании нитрозативного стресса с помощью пероксинитрита контроли, позволяющие исключить влияние неспецифических эффектов или продуктов распада?

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 решена научная проблема: комплексная количественная оценка селективов P, E, L и их универсального лиганда PSGL-1 в условиях нитрозативного стресса, имеющая важное значение для медицины и биохимии. Диссертация соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждения учёных степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Короткова Наталья Васильевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой биохимии имени Р.И. Лифшица
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук (03.01.04 Биохимия),
доцент

Антон Иванович Сеницкий

21.11.2025

Подпись д.м.н. А.И. Сеницкого заверяю:
начальник управления кадров
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России

Д.С. Долгих

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 454141, Российская Федерация, Уральский Федеральный округ, Челябинская область, г. Челябинск, ул. Воровского д.64

Телефон: +7 (351)232-74-76

E-mail: kanc@chelma.ru, sinitskiyai@yandex.ru