

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, доцента Котовой Юлии Александровны 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

Нитрозативный стресс является составляющим компонентом в патогенезе различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистой системы. Токсичные продукты, образующиеся в результате взаимодействия избыточных количеств оксида азота (II), влияют на структуру белков, взаимодействуя с функциональными группами последних, и нарушают функционирование ферментов и белков. В результате образуются продукты нитрозативного стресса, которые могут являться маркерами тяжести патологии.

Селектины, в свою очередь, являются белками, посредством которых осуществляется роллинг, остановка и дальнейшая миграция лейкоцитов в ткани. Для осуществления своих функций им необходим контакт со специфическими лигандами, среди которых PSGL-1 является общим для всех трех селектинов. Важно, что именно эти взаимодействия могут быть мишенью для терапевтических вмешательств, улучшая течение сердечно-сосудистых заболеваний, например, тромбоза, и снижая степень ишемии.

Селектины в своей структуре содержат остатки цистеина, чувствительные к окислению. Таким образом, количественное изучение селектинов P, E, L в условиях нитрозативного стресса у пациентов с

патологией сосудов нижних конечностей является актуальным, что и явилось предметом данной работы.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы подтверждается тем, что впервые проанализирована связь растворимой формы молекул клеточной адгезии селектинов 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, с циклом оксида азота (II) в зависимости от выраженности нитрозилирующего стресса. Было показано, что при изучаемой патологии отмечается снижение концентрации sP, sE, sL, и повышение уровня универсального гликопротеинового лиганда PSGL-1, а также повышением в разной степени концентрации показателей окислительного/нитрозилирующего стресса: стойких метаболитов оксида азота (II), нитротирозина, пероксинитрита и окислительно модифицированных белков по сравнению со здоровыми донорами.

В эксперименте по совместной инкубации первичной клеточной линии HUVEC с растворами токсичного агента пероксинитрита и донатора NO – 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 синтазы в лизатах клеток в зависимости от концентрации тестируемых веществ и длительности инкубации, а также изменения концентрации растворимых форм селектинов в кондиционной среде. 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*.

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

Диссертационная работа Коротковой Н.В. представляет собой законченное исследование.

Представленные в диссертационной работе Коротковой Н.В. научные положения, выводы, рекомендации являются обоснованными, соответствуют целям и задачам исследования.

Глубокий анализ отечественной и зарубежной литературы по изучению проблемы позволил автору получить объективную информацию по поставленной проблеме, определить цель и сформулировать задачи исследования.

Обоснованность научных положений подтверждается корректным дизайном исследования, применением широкого спектра культуральных и биохимических методов исследования: выделение первичной клеточной линии HUVEC, изопикническое центрифугирование, иммуоцитохимический метод, МТТ-тест, вестерн-блот, иммуноферментный, спектрофотометрический, флюориметрический, фотоколориметрический анализ. Исследование выполнено на достаточном объёме клинического и экспериментального материала.

Грамотный статистический анализ подтверждает обоснованность и достоверность научных положений, результатов, выводов и практических рекомендаций, и позволяет корректно интерпретировать полученные результаты.

Стоит подчеркнуть и значительный уровень апробации результатов исследования, которые были представлены в докладах на конференциях, в том числе, международных и зарубежных.

Практическая и научная значимость полученных результатов

Исследование носит преимущественно фундаментальный характер. Оно позволило расширить представления о роли селектинов в адгезивной функции эндотелия при патологии сосудов нижних конечностей; установлена разница в адгезивной функции эндотелия у пациентов с артериальной и венозной патологией сосудов.

Полученные *in vitro* результаты исследования позволяют сделать вывод о влиянии пероксинитрита и S – нитрозоглутатиона на относительное содержание молекул клеточной адгезии селектинов Р и Е, индуцибельной и эндотелиальной NO синтазы в лизатах первичной клеточной линии HUVEC, растворимых форм изучаемых селектинов в кондиционной среде, а также на абсолютное количество селектина L и PSGL-1 в гомогенатах фракционированных лейкоцитов при совместной инкубации клеток с указанными веществами в разных концентрациях и длительности экспозиции. Полученные данные дополняют современные представления о влиянии нитрозирующего стресса на адгезивную функцию эндотелия, выражающуюся в изменении относительного количества белков клеточной адгезии селектинов.

Результаты исследования, изложенные в диссертации, внедрены в учебный процесс и используются при обучении студентов на кафедре биологической химии, кафедре сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, 4 рационализаторских предложения внедрены в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Содержание диссертационной работы, ее завершенность и оформление

Диссертация Коротковой Н.В. имеет традиционную структуру, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Главы с результатами клинического материала, Главы с результатами экспериментального исследования, Выводов, Практических рекомендаций,

Списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста, иллюстрирована 93 рисунками и дополнена 33 таблицами. Список литературы включает 350 источников, среди которых 268 иностранных и 82 отечественных.

Обзор литературы демонстрирует глубокий анализ современных научных данных о роли эндотелия, его дисфункции и молекулярных механизмах, лежащих в основе адгезии клеток крови к эндотелию. Автор последовательно раскрывает ключевые аспекты темы, начиная с фундаментальных характеристик эндотелия и заканчивая детальным рассмотрением селектинов P, E и L, и лиганда PSGL-1, их структуры и функций.

Глава «Материалы и методы исследования» представляет собой фундаментально проработанный раздел диссертационной работы, демонстрирующий высокий уровень научного исследования, обусловленный комплексным подходом к организации исследования, включающий клинический блок по работе с биологическим материалом пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей: атеросклерозом, артериальным тромбозом, варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом, и экспериментальный – работу на клеточной линии HUVEC, выделенной из пуповин здоровых рожениц. Описаны и применяемые методики, спектр которых широк.

Глава 3 представляет собой изложение результатов исследования клинического материала, посвященного изучению взаимосвязей между белками адгезии и нитрозативного стресса у пациентов с сосудистой патологией нижних конечностей.

Исследование охватывает широкий спектр маркеров: селектины (sP, sE, sL), PSGL-1, NO-синтазы (iNOS, eNOS), метаболиты оксида азота, нитротирозин, битирозин, пероксинитрит, окислительную модификацию белков (ОМБ).

Глава 4 представляет собой экспериментальное исследование *in vitro*, посвященное изучению влияния пероксинитрита, цитотоксичного продукта окислительного стресса, и S-нитрозоглутатиона, эндогенного донора NO, на HUVEC и лейкоциты. Основное внимание уделено изменениям в экспрессии селектинов (P, E, L), PSGL-1, NO-синтаз (iNOS, eNOS), а также маркерам нитрозативного стресса.

Экспериментальное исследование характеризуется комплексным дизайном, включающим применение разных концентраций и временных интервалов для изучаемых агентов, что позволяет оценить дозозависимые и временные эффекты.

Заключение описывает подведение итогов исследования, обобщая полученные в ходе клинического и экспериментального исследования ключевые закономерности влияния нитрозативного/оксидативного стресса на селектины (P, E, L), PSGL-1 и NO-синтазы у пациентов с сосудистой патологией нижних конечностей и в условиях *in vitro*.

Выводы логично вытекают из результатов, грамотно сформулированы и соответствуют задачам исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и отражает её основные положения, результаты и выводы, даёт полное представление о работе. Оформление автореферата соответствует современным требованиям.

Публикации результатов исследования в научных изданиях

Результаты диссертационного исследования доложены автором на российских и международных конференциях. По результатам опубликовано 30 печатных работ, полностью отражающих содержание диссертации, в том числе 12 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России (из них 8

статей в журналах категории K1-K2), 1 – входящая в цитатно-аналитическую базу Scopus, внедрено 4 рационализаторских предложения.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

Принципиальные замечания по оформлению и содержанию диссертационной работы Коротковой Н.В. отсутствуют.

В плане научной дискуссии к автору возникли следующие вопросы:

1. Коррелируют ли показатели sP и PSGL-1 с тяжестью эндотелиальной дисфункции?
2. Почему высокие концентрации нитрозоглутатиона снижают уровень эндотелиальной синтазы оксида азота в эксперименте?
3. С чем связаны эффекты при длительной инкубации с исследуемыми веществами, и почему наблюдаются разнонаправленные эффекты?

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, на основании которой сформулированы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Выявленные в процессе выполнения работы новые сведения о взаимосвязи белков межклеточной адгезии, селективов, с показателями нитрозативного 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 системы оксида азота на адгезивную функцию эндотелия.

По актуальности решённой проблемы, объёму исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация соответствует 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:

заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный медицинский
университет им. Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
доцент

Котова Юлия Александровна

25.11.2015

Подпись д.м.н., доцента Котовой Ю.А. заверяю
Учёный секретарь Учёного совета
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный медицинский
университет им. Н.Н. Бурденко»,
доктор медицинских наук, доцент



Титова Л.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Адрес: 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10
Телефон: +7 (473)259-89-90
e-mail: mail@vrngmu.ru