

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава
России, д.фарм.н., доцент

Д.А.Бабков

« 06 » *Июль* 2025 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
о научно-практической значимости диссертации
Коротковой Натальи Васильевны «Селектины в функциональном ответе эндотелия на нитрозативное повреждение», представленной к защите на соискание учёной степени доктора медицинских наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность работы

Исследование механизмов изменения функционального статуса эндотелиоцитов и их взаимодействия с другими клетками крови чрезвычайно актуально для современной медицины. Процессы адгезии клеток между собой и к компонентам внеклеточного матрикса являются важными для понимания функционирования эндотелиоцитов и такого универсального патогенетического феномена, как эндотелиальная дисфункция. По современным представлениям именно эндотелиальная дисфункция является важнейшим патогенетическим звеном атеросклероза и всех сопутствующих ему сердечно-сосудистых заболеваний, являющихся по сути основной причиной смертности и ранней инвалидизации населения.

Среди молекул межклеточной адгезии особое место занимают селектины, поскольку именно они обеспечивают начальные этапы клеточной адгезии (роллинг лейкоцитов), и опосредуют взаимодействия между лейкоцитами и эндотелиоцитами, впоследствии приводящие к трансэндотелиальной экстравазации в окружающие ткани.

В последние 2 декады были предприняты многочисленные попытки разработки на основе определения растворимых форм селектинов биомаркеров эндотелиальной дисфункции, хронического воспаления и активации тромбоцитов. Другим важным и специфичным для эндотелия маркером эндотелиальной дисфункции является оксид азота (II). Будучи чрезвычайно реакционноспособной молекулой, он активно участвует в процессах внутриклеточного метаболизма и, одновременно, является паракринным фактором.

Детализация изменений уровня растворимых форм селектинов и масс индуцибельной и эндотелиальной синтаз оксида азота в сыворотке крови, с одной стороны раскрывает новые звенья патогенеза тромбозов и тромбоэмболий и открывает новые мишени их профилактики, с другой может явиться обоснованием для разработки новых маркеров сосудистой патологии нижних конечностей.

Кроме того, в исследовании значительное место было отведено экспериментальному изучению количественного изменения изучаемых белков на первичной культуре эндотелиоцитов, полученных от здоровых рожениц, и на фракционированных лейкоцитах периферической крови под действием эндогенных веществ, связанных с системой оксида азота: пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона. Трансляция экспериментальных данных в клинику несомненно повышает ценность работы.

Все это и обусловило актуальность диссертационного исследования Коротковой Н.В. по изучению количественного содержания селектинов P, E, L и их универсального лиганда PSGL-1 у пациентов с патологией сосудов нижних конечностей во взаимосвязи с показателями нитрозирующего стресса.

Участвуя в фундаментальных аспектах клеточной биологии, в рецептор-опосредованных межклеточных взаимодействиях, селектины обеспечивают реализацию физиологических процессов: васкулогенеза, эмбриогенеза, морфогенеза органов, регенерации сосудистой системы, заживления ран, иммунного надзора, гемостаза, а нарушение их структуры и функционирования ассоциированы с развитием воспаления и метастазирования.

В патологических условиях нарушение каскада адгезии лейкоцитов может приводить к развитию патологии.

Научная новизна исследований и полученных результатов

В исследовании представлены результаты, обладающие научной новизной, а именно результаты, полученные в ходе определения растворимых форм селектинов, лиганда PSGL-1, маркеров нитрозативного стресса и последующего сопоставительного анализа, характеризующего взаимосвязи и закономерности между ними, у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, как артериальных, так и венозных. Научную новизну усиливает экспериментальный блок исследований, в котором автор изучает количественные изменения указанных белков и их лиганда *in vitro*, на первичной клеточной линии эндотелиоцитов, а также на фракционированных лейкоцитах периферической крови, согласно паттернам экспрессии изучаемых белков, и демонстрирует их количественные изменения под влиянием пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона, способных образовываться в организме эндогенно.

Полученные автором в модельных экспериментах, новые сведения о влиянии оксида азота на молекулы клеточной адгезии селектины, и

сформулированные на этом основании выводы, могут транслироваться в клинические ситуации и подтверждают научную новизну работы.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты диссертационной работы Коротковой Н.В. вносят новые сведения в представления об адгезивной функции эндотелия, осуществляемой с помощью интегральных гликопротеинов: селектинов Р, Е, L и их универсального лиганда PSGL-1.

В работе было показано влияние компонентов системы оксида азота на количественные характеристики относительного и абсолютного количества изучаемых белков. Так, при исследовании сыворотки крови от пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей была продемонстрирована разница в концентрации растворимых форм sP, sE и sL-селектинов, их универсального лиганда PSGL-1 и показателей нитрозативного стресса по сравнению со здоровыми лицами. 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.

В эксперименте на первичной культуре эндотелиальных клеток были получены сведения о влиянии компонентов системы оксида азота, синтезирующихся в организме: пероксинитрита и S – нитрозоглутатиона на относительное содержание селектинов Р и Е, а также индуцибельной и эндотелиальной NO синтазы и растворимых форм указанных селектинов в клеточном супернатанте, а также о влиянии компонентов системы оксида азота на абсолютное количество селектина sL и универсального лиганда селектинов PSGL-1 в гомогенатах полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов периферической крови, полученной от здоровых лиц.

Все это даёт основания полагать, что терапевтическое влияние на выраженность нитрозативного стресса у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, может улучшить адгезивную функцию эндотелия.

Можно заключить, что диссертационное исследование Н.В.Коротковой имеет несомненную научно-практическую значимость.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В представленной диссертационной работе проведён подробный анализ современной научной литературы по представленной проблеме, проанализировано значительное количество достаточно свежих источников, что позволяет сделать заключение о том, что автор хорошо ориентирован в изучаемой проблеме. План исследования хорошо продуман, структурирован и соответствует поставленным задачам и целям. Он включает в себя четкое

определение шагов, ресурсов и сроков, а также использование подходящих методов для сбора и анализа данных. Лабораторные технологии как в клиническом, так и в экспериментальном блоке достаточно современны, они включают ИФА с использованием стандартизированных наборов реагентов в клинической части работы и методы, не стандартизированные требующие хороших навыков лабораторной работы. Статистическая обработка данных, выполнена с применением современного программного обеспечения и критериев, позволяющих делать выводы о достоверности полученных результатов. Положения, выносимые на защиту, выводы, практические рекомендации основаны на достаточном количестве данных, полученных как в клиническом, так и в экспериментальном блоке. Выводы аргументированы и логично вытекают из полученных результатов.

Характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Коротковой Н.В. имеет традиционную структуру, отвечающую требованиям действующих нормативных документов. Состоит из Введения, Обзора литературы, главы Материалы и методы, 2 глав с Результатами и их обсуждениями, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 350 источников (в том числе, 82 отечественных и 268 зарубежных). Общий объем рукописи составил 266 страниц.

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, отражена цель и сформулированные в соответствии с ней задачи, описана степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава включает подробный анализ литературных источников по теме диссертационного исследования, что свидетельствует о достаточной информированности автора о текущем состоянии вопроса. Изложены имеющиеся в литературе современные представления о структуре селектинов Р, Е, L и их лиганда PSGL-1, их участии в физиологических процессах, и в патогенезе различных нозологий. Также описывается роль оксида азота и ферментов его синтеза – индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз в патогенезе сосудистой патологии.

В главе «Материалы и методы» исследования описаны биохимические методики и культуральные методы, применяемые в исследовании. Материалом для 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.

В качестве группы контроля выступили здоровые доноры, сдавшие кровь на исследование в отделении переливания крови Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница». Письменные информированные согласия на проведение исследований были получены от всех пациентов и доноров. По работе имеется положительное заключение регионального этического комитета.

Первый этап исследования включал определение: уровня растворимых форм селектинов sP, sE, sL, лиганда PSGL-1, эндотелиальной и индуцибельной синтаз оксида азота (II), метаболитов оксида азота (II), нитротирозина, битирозина, окислительно модифицированных белков в сыворотке крови пациентов.

Вторым этапом явилось экспериментальное моделирование *in vitro* измененного уровня NO и развития нитрозативного стресса на клеточной линии HUVEC и фракционированных лейкоцитах крови путем внесения растворов пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона, и количественное определение селектинов, их лиганда, синтаз оксида азота, а также показателей нитрозативного стресса.

В ходе выполнения работы были использованы такие методы исследования, как флуориметрия, спектрофотометрия, иммуноцитохимия, вестерн-блот, иммуноферментный анализ. Используемые методы информативны, современны, позволяют решить все сформулированные автором задачи. Применяемые методы статистической обработки адекватны.

В третьей главе описываются результаты клинической части исследования. Было показано, что заболевания сосудов нижних конечностей сопровождаются количественным снижением растворимых форм белков клеточной адгезии селектинов, повышением уровня гликопротеинового лиганда, изменением уровня синтаз оксида азота, а также показателей нитрозативного стресса по сравнению со здоровыми донорами. Было отмечено, что заболевания артерий протекают на фоне более выраженного снижения селектина sP, повышения уровня эндотелиальной NO-синтазы, гликопротеинового лиганда PSGL-1 и нитротирозина, нежели заболевания вен. Нитротирозин, по результатам многофакторного регрессионного анализа, был определён, как один из основных ведущих факторов, влияющих на изучаемые белки.

В четвертой главе описан и проанализирован экспериментальный этап исследования, в ходе которого моделировались условия повышения уровня оксида азота путем культивирования клеток с S-нитрозоглутатионом, и условия нитрозилирующего стресса путем экспозиции клеток с пероксинитритом. Было продемонстрировано снижение метаболической активности клеток, нарастание продуктов нитрозативного стресса в лизатах клеток: стойких метаболитов оксида азота, битирозина, пероксинитрита, а также изменение 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. Культивирование

фракционированных лейкоцитов *in vitro* с растворами пероксинитрита и S-нитрозоглутатиона привело к изменению количества PSGL-1 и селектина L в лизатах фракционированных полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов.

Сформулированные выводы вытекают из результатов исследования и соответствуют задачам исследования.

Заключение содержит изложение основных итогов проведённого исследования и завершается практическими рекомендациями. В целом представленная работа является завершённым научно-квалификационным исследованием, заслуживающим положительной оценки.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационного исследования и оформлен согласно принятым 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 основные материалы диссертации, в том числе 12 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, 3 – входящих в цитатно-аналитическую базу Web of Science и Scopus, внедрено 4 рационализаторских предложения.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

При ознакомлении с текстом работы возникли следующие вопросы и замечания:

1. В разделе материалы и методы не указаны каталожные номера реагентов, что особенно важно для антител, потому, что происхождение антител и их эпитопы сильно влияют на результаты измерений. Недостаточно полно описаны процедуры исследований, выполненных без применения стандартных наборов, а именно определение битирозинов в белках, нитротирозина. Отсутствует также описание процедуры оценки качества измерений, что обычно приводится в клинических исследованиях.

2. В разделе «2.9.8. Оценка концентрации пероксинитрита в сыворотке крови пациентов и в клеточных лизатах» указывается, что измерение выполнялось при длине волны 302 нм. При такой длине существенную абсорбцию имеют многие вещества из матрицы образца, то есть очень вероятна интерференция. В первоисточнике I.I.Lobysheva, V.A.Serezhnikov, A.F.Vanin (1998) указана возможность определять таким способом пероксинитрил только в модельной системе, а не в биологическом объекте. Пожалуйста обоснуйте такую трансляцию технологий, разработанных для

относительно простой химической системы, на изучение биологических объектов.

3. В диссертацию включены данные 149 условно здоровых и больных людей, у которых определялся целый ряд лабораторных показателей, подробно описаны коморбидные статусы пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей. Обычно такое исследование преследует 4 практические цели. Это - скрининг, диагностика, мониторинг, прогноз. Однако в выводах и рекомендациях Вы почему-то не говорите достигнуты ли эти цели. То есть, могут ли результаты Ваших исследований улучшить, например, диагностику нарушений кровообращения нижних конечностей или оценить текущее состояние пациента?

4. eNOS и iNOS не являются секреторными ферментами, они локализованы в цитозоле и по сути должны являться индикаторами повреждения эндотелиоцитов. При этом известно, что eNOS заякорена в плазматической мембране, тогда как iNOS не имеет такого домена. Следует ожидать, что iNOS, благодаря своей цитозольной локализации, будет более чувствительным индикатором повреждения. Как Вы объясняете выраженное изолированное повышение массы eNOS при артериальной тромбоэмболии.

5. Вопрос о валидации клеточной модели. Хотелось бы также узнать комментарии автора по поводу отсутствия дозозависимости во многих клеточных экспериментах. В опытах с пероксинитритом фактически дозозависимость отмечена в основном при инкубации 30 минут. Возможно ли предположить, что при более длительных экспозициях большая часть клеток гибнет и остаются только некоторые высокоустойчивые клетки с «извращенным» метаболизмом, на которых невозможно получить воспроизводимые результаты? Нитрозоглутатион, напротив, выраженное действие оказывает только при длительной экспозиции, а инкубация клеток с ним менее 24 часов мало информативна?

6. В биологическом эксперименте всегда чрезвычайно сложно выявить причинно-следственные связи и доказать иерархическую последовательность событий, учитывая механизмы обратной связи и сложные взаимоотношения между механизмами повреждения, компенсации и адаптации. Тем не менее странным кажется выбор автором как ведущего фактора патологических процессов, нитротирозина (стр.208), концентрация которого достоверно не меняется. Возможно несколько гипотез для объяснения причин этого выбора, но хотелось бы получить от автора ответ на вопрос: «Почему именно нитротирозин, концентрация которого достоверно не изменялась, так важен для инициации всех остальных явлений, наблюдаемых автором?

Следует подчеркнуть, что вопросы и замечания имеют уточняющий характер и не влияют на положительную оценку работы Н.В. Коротковой.

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 на основании выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, касающееся выявления новых сведений о связи оксида азота (II) и таких белков межклеточной адгезии, как селектины, у пациентов с заболеваниями сосудов нижних конечностей, и при моделировании условий нитрозативного стресса на клетках HUVEC и лейкоцитах. Диссертация соответствует всем требованиям пунктов 9-14 «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.

Отзыв обсуждён и одобрен на заседании проблемной комиссии «Фармация. Физико-химические науки» ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, протокол № 9 от 10 октября 2025 г.

Заведующий кафедрой
Фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор



Олег Владимирович Островский

Подпись профессора О.В. Островского
заверяю.

Ученый секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО ВолгГМУ
Минздрава России, к.м.н., доцент



О.С. Емельянова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Адрес: 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, зд. 1.

Телефон: 8 (8442) 38-50-05.

Эл. почта: post@volgmed.ru

Сайт: <http://www.volgmed.ru>