

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Фефеловой Елены Викторовны
«Патогенетические эффекты гипергомоцистеинемии в
эксперименте и клинике», представленную на соискание ученой
степени доктора медицинских наук
по специальности 14.03.03. – патологическая физиология

Актуальность работы темы

Сердечно-сосудистые заболевания остаются глобальной медико-социальной проблемой, несмотря на безусловные достижения медицинской науки и практики. В последние годы все большее внимание уделяется поиску факторов, предрасполагающих к раннему формированию и быстрому прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний. Данные о влиянии повышенного уровня гомоцистеина на риск развития атеросклеротических и протромботических изменений остаются противоречивыми. С одной стороны, результаты многочисленных экспериментальных, эпидемиологических и клинических исследований позволяют считать гипергомоцистеинемию фактором риска атеросклероза, гипертонической болезни и тромбоза. С другой стороны, некоторые авторы рассматривают ее лишь как маркер «нездорового образа жизни» – несбалансированного питания, низкого уровня физической активности, или уже существующей сердечно-сосудистой патологии.

Отсутствует четкое представление о механизме влияния избытка гомоцистеина на состояние окислительно-антиокислительной системы и отдельные звенья гемостаза.

Кроме того, ослабленное участие в синтезе белковой компоненты липопротеидов вследствие недостатка метильных групп может быть причиной превалирования в мембранах и межклеточном пространстве липопротеидов низкой плотности и липопротеидов очень низкой плотности, т.е. наиболее атерогенных фракций. В эндотелиальных клетках гипергомоцистеинемия не только стимулирует образование свободных радикалов и повышает концентрацию ЛПНП и ЛПОНП, но также приводит к понижению продукции релаксирующего фактора и сульфатированных глюкозаминогликанов – гепариноидов: гипергомоцистеинемия снижает эластичность внутрисосудистой выстилки. При ней снижается синтез простаглицина, а также усиливается рост гладкомышечных клеток. Так формируется сосудистый компонент атеротромбоза. Коагуляционный (тромботический) компонент атерогенеза во многом связан с нарушением функции эндотелия. Так, повышенные концентрации гомоцистеина приводят к угнетению синтеза тромбомодулина, без которого не происходит дезактивация тромбина антикоагулянтными протеинами С и S. Те, в свою очередь, не оказывают супрессорного воздействия на активность факторов V и VIII.

Активации свертываемости крови способствует также понижение активности антитромбина III и эндогенного гепарина, что приводит к

дополнительному повышению активности тромбина. Возрастает агрегационная способность тромбоцитов.

Спектр патологий, имеющих в своем генезе или течении повышенные уровни содержания гомоцистеина в крови, значительно шире, чем обычно считается. К нему, также относятся эссенциальный тромбоз наружных сонных артерий, периферических артерий и вен, злокачественная анемия (отсутствие фактора Кастла), болезнь Крона (терминальный илеит), пожилой возраст и даже алкоголизм, что требует корректировки патогенетической терапии этих состояний как факторов риска развития атеросклероза и тромботических осложнений.

В связи с вышеизложенным, выбранная диссертантом тема исследования чрезвычайно актуальна и представляет интерес не только для специалистов фундаментальной медицины, но и для клиницистов-практиков.

Степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность

Автором достаточно четко сформулирована цель, которая состояла в исследовании патогенетической роли гипергомоцистеинемии в инициации ответа единой клеточно-гуморальной системы защиты организма в эксперименте и клинике. Сформулировано 10 задач, вытекающих из поставленной цели.

Для достижения цели и решения задач диссертантом обследованы 111 пациентов с диагнозом ишемическая болезнь сердца и 60 с диагнозом гипертоническая болезнь, 23 человека, страдающих хроническим риносинуситом в стадии рецидива и ремиссии, а также здоровые лица (N=91). В эксперимент *in vivo* было включено 80 животных, у 20 из которых был индуцирован иммунодефицит. Изучался ответ клеток периферической крови 15 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин, средний возраст которых составил $35,4 \pm 4,7$ лет и 16 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса) и фибробластов (культура фибробластов человека линии M-22) в экспериментах *in vitro*.

В исследовании были использованы современные наукоемкие методики, включающие гемостазиологические, биохимические, иммунологические, морфологические, гистохимические методы исследований. Автором выбраны адекватные методы статистической обработки материала с использованием непараметрических методов, выполнен метод множественной пошаговой регрессии для построения математической модели расчета толщины интимамедиа.

Научная новизна не вызывает сомнений. Автор впервые показал, что гипергомоцистеинемия может оказывать как прямое повреждение (например, гибели фибробластов при уровне Hcy 50 мкмоль/л в культуральной среде) в первую очередь, путем активации окислительного стресса, так и опосредованное (путем модификации белков организма, образования

окисленных форм ЛПНП, конкурентного взаимодействия за глутаматные рецепторы и т.д.). Диссертант впервые выявил, что повышение концентрации гомоцистеина в кровотоке приводит как к повреждению эндотелия сосудов, вызывая развитие его дисфункции, так и лейкоцитов. Причем, больше выражена реакция со стороны Т-лимфоцитов. У здоровых лиц, и пациентов, имеющих атеросклеротический процесс, ответ клеток периферической крови разный. Так, у доноров высокие цифры аминотиолов вызывают снижение числа и активности Т-хелперов и увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов. У больных ИБС – напротив резко уменьшается количество CD8-Т-лимфоцитов. При этом во всех группах наблюдается увеличение экспрессии молекул адгезии, тканевого фактора, маркеров апоптоза во всех видах лейкоцитов, более выраженное в культурах периферической крови больных ИБС. В то же время, диссертант продемонстрировала, что низкие концентрации гомоцистеина стимулируют рост фибробластов и синтез ими коллагена.

Диссертантом показано, что у животных при введении в организм экзогенного гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона наблюдается резкое повышение титра аутоантител к альбумину модифицированному гомоцистеином.

Автором доказал, что гиперкоагуляция, развивающаяся на фоне гипергомоцистеинемии, обусловлена ростом числа эндотелиоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, фибробластов несущих на своей поверхности тканевой фактор и, как следствие этого формированием тромбинемии.

Диссертант впервые указала, что наиболее высокий уровень окисленных липопротеидов и аутоантител к ним зафиксирован у здоровых людей в возрасте от 18 до 35 лет. Их концентрация зависит от стажа курения (максимален при стаже 10 и более лет), от тяжести ИБС и стадии гипертонической болезни.

Диссертант установила очень важный факт, касающийся активации единой клеточно-гуморальной системы защиты организма. Функционирование данной системы в первую очередь направлено на локализацию повреждения, элиминацию повреждающего фактора и восстановление нарушенной структуры и функции ткани. Однако гиперкоагуляция способствует развитию тромбоэмболических осложнений, активация иммунной системы – образованию аутоантител к собственным структурам организма и запуску аутоиммунных процессов, а также атеросклерозу, стимуляции неспецифической резистентности организма – ускорение процесса перекисного окисления липидов, интенсификация образования лейкоцитарно-тромбоцитарных коагратов, повышенный синтез хемокинов, факторов роста, повышенная выработка IL-1 β , IL-6, TNF- α . Все это усиливает вторичную альтерацию и приводит к развитию воспалительного каскада событий, влияющих на течение фолатного цикла, что приводит к развитию гипергомоцистеинемии, замыкая порочный круг.

Таким образом, нарушение поддержания аминотиолов на постоянном уровне инициирует, ускоряет и поддерживает развитие воспалительного процесса в организме.

В диссертационной работе Е.В. Фефелова демонстрирует хорошее знание состояния вопроса, умело использует современную литературу для обсуждения полученных результатов.

В представленной диссертации результаты исследования полностью соответствуют поставленной цели и задачам, условия постановки экспериментов и выбранные методы исследования в достаточной степени корректны, достоверность полученных данных подтверждена статистически и не вызывает никаких сомнений. Сформулированные автором выводы вытекают из полученного материала и обоснованы.

По материалам диссертации опубликовано 46 печатных работы, в том числе 21 в рецензируемых научных журналах, входящих в список, определенный ВАК Минобрнауки России для публикации результатов работ на соискание ученой степени доктора наук, 7 находятся в международных базах цитирования – 6 – Scopus и 1 – Web of Science.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, написан четко, оформлен согласно требованиям, иллюстрирован 12 рисунками.

Научная и практическая значимость полученных результатов исследования

Научная значимость. Автором представлены новые данные о патогенетической роли гипергомоцистеинемии в патогенезе инициирования и прогрессирования атеросклероза и гипертонической болезни. Диссертантом показано, что высокие концентрации гомоцистеина изменяют фенотип и функциональную активность иммунокомпетентных клеток, причем ответ лейкоцитов у здоровых и пациентов с атеросклеротическим процессом разный. Высокие уровни аминотиолов вызывают гибель лейкоцитов, миокардиоцитов как путем апоптоза, так и некроза. При этом низкие концентрации гомоцистеина усиливают пролиферацию фибробластов.

Автором выявлено, что экзогенная гипергомоцистеинемия приводит к развитию гиперкоагуляции и инициированию аутоиммунного процесса, активации единой клеточно-гуморальной системы защиты организма.

Однако, активация единой клеточно-гуморальной системы защиты организма, вызывая развитие вторичной альтерации, приводит к формированию хронического воспалительного процесса, влияющего на течение фолатного цикла, и как следствие этого – к развитию гипергомоцистеинемии, что приводит к замыканию порочного круга.

Практическая значимость исследования. Работа имеет фундаментальное значение для науки, так как расширяет существующие представления о биологических эффектах гипергомоцистеинемии, являющейся одним из главных звеньев патогенеза таких социально значимых заболеваний, как ишемическая болезнь сердца и гипертоническая болезнь. Теоретическое значение работы состоит в расширении представлений о механизмах действия гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона, приводящих к изменению фенотипа,

экспрессии молекул адгезии и активации клеток периферической крови; к стимулированию программированной гибели клеток, развитию гиперкоагуляции и иницированию аутоиммунного процесса.

Полученные результаты могут быть полезными для понимания механизмов возникновения и развития атеросклероза и гипертонической болезни, а также для выявления возможных механизмов защиты организма от токсического повреждения гипергомоцистеинемией. При соответствующей клинической апробации данные исследования могут явиться основой для внесения дополнений в алгоритм диагностики атеросклеротического процесса, что позволит выявлять заболевание на ранних этапах его развития.

Содержание диссертационной работы и ее завершенность

Представленная диссертационная работа изложена на 272 страницах машинописного текста; состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Собственные исследования» (включает 4 раздела), «Обсуждение полученных данных», «Заключение», «Выводы», «Список литературы»; проиллюстрирована 66 таблицами и 29 рисунками. Список литературы содержит 601 источник (161 – отечественных авторов и 194 – иностранных авторов) и составлен в соответствии с действующим библиографическим стандартом.

Во **Введении** автор раскрывает актуальность темы проведенного исследования, четко формулирует цель работы и решаемые задачи; представляет научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования; кратко характеризует методологию и методы исследования, а также степень достоверности полученных результатов; приводит сведения об апробации работы, внедрении результатов исследования в практику, публикации результатов исследования и степени личного участия автора в получении результатов. Введение содержит всю необходимую информацию о работе.

Раздел **«Обзор литературы»** написан на основе критического анализа большого числа литературных источников отечественных и зарубежных авторов и максимально полно отражает нерешенные на сегодняшний день вопросы касательно роли гипергомоцистеинемия как индуктора различных заболеваний, начиная от атеросклеротического повреждения сосудистой стенки до дефектов нервной трубки плода. Из обзора литературы с очевидностью вытекает актуальность цели и задач проводимого исследования.

Раздел **«Материал и методы исследования»** содержит характеристику групп 111 обследованных пациентов с диагнозом ишемическая болезнь сердца и 60 с диагнозом гипертоническая болезнь. Группу здоровых лиц составили 91 волонтер. В эксперимент *in vivo* включены 80 животных, у 20 из которых был индуцирован иммунодефицит. Изучался ответ клеток периферической крови 15 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин, средний возраст

которых составил $35,4 \pm 4,7$ лет и 16 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2 функционального класса) и фибробластов (культура фибробластов человека линии М-22) в экспериментах *in vitro*.

В работе применялись лабораторные (гемостазиологические, биохимические, иммунологические, морфологические, гистохимические) и статистические методы исследований. Для исследования использовались цельная кровь и ее сыворотка/плазма, культура клеток периферической крови, мононуклеаров и фибробластов, миокард экспериментальных животных. Выбор этих современных высокоинформативных методов определяет достоверность полученных результатов и обоснованность формулированных автором выводов и практических рекомендаций.

Результаты **собственных исследований** приведены в 4-х отдельных разделах, которые составляют основную часть диссертационной работы и структурированы на подразделы в четком соответствии с дизайном исследования. Представленные материалы наглядно иллюстрированы рисунками и таблицами; при этом каждый подраздел заканчивается кратким резюме. Такой подход к изложению полученных результатов несомненно улучшает их восприятие.

Раздел **«Обсуждение полученных данных»** посвящен всестороннему обсуждению результатов проведенных исследований и их сопоставлению с уже имеющимися литературными данными отечественных и зарубежных авторов. Автором предлагаются графические схемы, в которых показана патогенетическая роль патогенного действия гипергомоцистеинемии. Данный раздел содержит основные положения диссертационной работы, на основании которых автор делает выводы, обосновывает практические рекомендации и обозначает перспективы дальнейших исследований.

Принципиальных замечаний по содержанию диссертации нет. Наряду с положительной оценкой диссертации возникли вопросы дискуссионного характера:

1. Чем Вы можете объяснить повышенный уровень гомоцистеина у больных хроническими риносинуситами?
2. Какова роль аутоантител к тромбину в патогенезе утолщения сосудистой стенки на фоне гипергомоцистеинемии?

Заключение

Диссертация Фефеловой Елены Викторовны «Патогенетические эффекты гипергомоцистеинемии в эксперименте и клинике», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук, является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая обеспечивает решение актуальной научной проблемы - раскрытие клеточно-молекулярных эффектов гипергомоцистеинемии, лежащих в основе инициации и развития сердечно-сосудистой патологии. Решение проблемы имеет важное значение как

для специальности 14.03.03 - патологическая физиология, так и медицины в целом.

Диссертационная работа Е.В. Фефеловой соответствуют пунктам специальности паспорта специальности 14.03.03 – патологическая физиология: 2) «изучение общих патогенетических механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенного фактора, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний»; 3) «Анализ механизмов саногенеза, направленных на предотвращение повреждающего действия патогенного агента на организм, его органы и системы, изучение причин и особенностей взаимной трансформации саногенетических и патогенетических механизмов»; 9) «Изучение этиологии, патогенетических и саногенетических механизмов при заболеваниях конкретных органов и систем, а также патогенетических основ их клинической симптоматики».

Резюмируя вышеизложенное, считаю, что диссертационное исследование Е.В. Фефеловой «Патогенетические эффекты гипергомоцистеинемии в эксперименте и клинике», по специальности 14.03.03 – патологическая физиология соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а соискатель достоин присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой общей и клинической
патологической физиологии Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Кубанский
государственный медицинский
университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Каде Азамат Халидович

«28» май 2021 г.

350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4
Тел.: 8 (861) 262-59-76
E-mail: akh_kade@mail.ru

Данные о докторе медицинских наук, профессоре Каде А.Х. заверяю:

Учёный секретарь Ученого совета

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

доктор философских наук, профессор



Ковелина Татьяна Афанасьевна