

## «УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора  
по научной работе Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения «Национальный  
медицинский исследовательский центр  
имени В. А. Алмазова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
доктор медицинских наук, профессор  
член-корреспондент РАН



\_\_\_\_\_ А.О. Конради

« \_\_\_\_\_ » 2020 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертации Шишковой Дарьи Кирилловны на тему: «Механизм патогенного действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий (экспериментальное исследование)», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 14.03.03 –патологическая физиология.

### Актуальность темы рецензируемой работы

Актуальность темы определяется прогрессирующим ростом заболеваний, связанных с атеросклеротическим поражением сосудов, что приводит к повышенной смертности и инвалидизации населения. В связи с этим поиск факторов, препятствующих возникновению атеросклероза, а также механизмов запуска атерогенных процессов в сосудах имеет первостепенное значение.

Рецензируемое диссертационное исследование Дарьи Кирилловны Шишковой посвящено вопросу участия кальций-фосфатных бионов в запуске атерогенных процессов в тканях сосудов. Поскольку повреждение эндотелия является общепризнанным инициирующим фактором развития атеросклероза, изучение влияния кальций-фосфатных бионов на эндотелиальные клетки представляется актуальным. В то же время,

поскольку кальций-фосфатные бионы представляют собой один из механизмов поддержания минерального гомеостаза, препятствуя кальцификации артерий при гиперкальциемии и гиперфосфатемии, эти соединения представляются перспективной мишенью для антикальцифицирующей терапии с целью первичной и вторичной профилактики атеросклероза. Тем не менее, механизмы действия кальций-фосфатных бионов, в особенности, в отношении эндотелия, остаются неясными. Всё это делает рецензируемое исследование актуальным, обуславливает его научную новизну и практическую значимость.

#### **Значимость полученных автором результатов для науки и практики**

Теоретическая значимость работы состоит в определении механизма патогенного действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий и обосновании возможной роли КФБ как одного из пусковых факторов развития атеросклероза. Новые знания могут быть использованы при разработке препаратов с хелатирующим действием, напрямую дезинтегрирующих кальций-фосфатные бионы и нейтрализующих ионы кальция.

#### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

В диссертации Д.К. Шишковой проведено комплексное исследование механизмов действия кальций-фосфатных бионов на эндотелиальные клетки с использованием нескольких экспериментальных систем. В качестве контрольного воздействия для сравнения с действием кальций-фосфатных бионов были использованы магний-фосфатные бионы с предварительным доказательством интерпретируемости и корректности проведения такого сравнения.

В работе показано, что повреждающее действие на эндотелий специфично для кальций-фосфатных бионов и не характерно для магний-фосфатных бионов.



Продемонстрировано, что кальций-фосфатные бионы, в отличие от магний-фосфатных бионов, индуцируют гибель как первичных культур эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека, так и иммортализованных культур венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926.

Установлено, что механизмом патогенного действия кальций-фосфатных бионов после их интернализации эндотелиальными клетками является первичное повреждение лизосом, из которых при растворении кальций-фосфатных бионов происходит выделение ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) в цитозоль, что опосредованно вызывает многократное повышение уровня активной (расщепленной) каспазы-3 и ее субстрата поли (АДФ-рибоза) полимеразы (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cPARP-1).

Доказано, что экспозиция кальций-фосфатных бионов индуцирует повышение концентрации выделяемого интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) в сравнении с контрольными клетками, в то время как экспозиция магний-фосфатных бионов не вызывает изменения уровня секретируемых эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов. Это свидетельствует о возможном паракринном влиянии подвергшихся воздействию кальций-фосфатных бионов эндотелиальных клеток на микроокружение.

Выявлено в экспериментах *in vivo*, что в отличие от магний-фосфатных бионов, кальций-фосфатные бионы вызывают гипертрофию интимы и воспаление адвентиции брюшной аорты крыс. Формирование неоинтимы в аорте связано с сочетанием механического повреждения эндотелия баллоном и патогенного действия КФБ, что запускает сдвиг фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактильного (для гладкомышечных клеток) и неактивного (для фибробластов) на синтетический, способствуя формированию ими экстрацеллюлярного матрикса.

## **Анализ материала и методов исследования**

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, доказана достаточным количеством экспериментальных данных, применением современных методов исследования.

Работа была выполнена в несколько этапов. На первом этапе было проведено исследование физико-химических характеристик кальций-фосфатных бионов и магний-фосфатных бионов.

На втором этапе была проведена оценка патогенного действия кальций-фосфатных и магний-фосфатных бионов на эндотелиальные клетки. Использовались различные эндотелиальные клетки и культивирование в различных условиях, затем проводилась оценка состояния клеток и оценка цитотоксичности бионов методами колориметрического тестирования, фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

На следующем этапе был проведен анализ интернализации бионов также с использованием нескольких типов эндотелиальных клеток и применением подходов электронной и конфокальной микроскопии.

На последующих этапах исследования действия бионов *in vitro* были проведены анализ проницаемости лизосом, анализ белкового ответа, оценка выделения провоспалительных цитокинов и измерение их генной экспрессии.

На заключительном этапе была проведена оценка действия бионов *in vivo* с использованием баллонной ангиопластики брюшной аорты крыс и применением классического гистологического исследования (парафиновые срезы) и проведена оценка гипертрофии интимы и воспаления адвентиции. Также было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов на маркеры эндотелия и прогениторных клеток.

О достоверности результатов диссертационного исследования свидетельствуют массивный объем экспериментального материала, широкий спектр выполненных исследований, неоднократно повторенные



эксперименты *in vitro* и *in vivo*, использование современных методов исследования и статистической обработки полученных результатов.

Выводы целиком и полностью основаны на результатах собственных исследований и логично вытекают из материалов диссертации. Это позволяет признать полученные результаты значимыми, а выводы и положения, сформулированные в диссертации, достоверными.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 136 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов. Список литературы содержит 184 источника, из них 2 отечественных и 184 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 60 рисунками.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов, полученных в диссертации**

Данные, представленные в диссертации, могут быть внедрены в учебный процесс высших образовательных учреждений по биологическому и медицинскому профилю в курсах по клеточной биологии и патогенеза атеросклероза, а также при дальнейшем изучении кальций-фосфатных бионов в патогенезе атеросклероза.

### **Апробация работы**

Результаты настоящего исследования были доложены и обсуждены на IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», (20 февраля 2017 года, г. Москва); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы дислипидемий и атеросклероза» (6-8 декабря 2017 года, г. Кемерово); VII Российско-Казахстанском Симпозиуме «Углекислотная и экология Кузбасса» (7-10 октября 2018 года, г. Кемерово); Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины», (24-25 мая 2018 года, г. Томск); Восьмой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные

аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (16-18 октября 2018 года, г. Новосибирск); XIX Ежегодном научно-практическом семинаре молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической кардиологии» (5 июня 2019 года, г. Томск).

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 7 работ в журналах, рекомендованных ВАК для публикаций основных результатов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата наук по специальности «патологическая физиология (биологические науки)», и 2 – в зарубежных рецензируемых изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus.

Принципиальных замечаний по выполненному диссертационному исследованию Д. К. Шишковой нет.

### **Заключение**

Диссертационная работа Д. К. Шишковой является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне под руководством доктора биологических наук, Ю. А. Кудрявцевой. Диссертационное исследование посвящено изучению актуальной задачи – механизмов патогенного действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий для определения их роли в развитии атеросклероза. Выводы, сформулированные автором, обоснованы и подтверждены достоверным материалом, логически вытекают из содержания работы. По своей актуальности, глубине и объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов, научных положений, выводов и рекомендаций диссертационная работа Д. К. Шишковой «Механизм патогенного действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий (экспериментальное исследование)» полностью соответствует п.9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» в редакции, утвержденной



постановлением Правительства Российской Федерации № 355 от 21.04.2016 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология.

Диссертация и отзыв обсуждены на совместном семинаре Научно-исследовательского отдела микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины и Научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии и генетики Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России (протокол № 12 от 23 «декабря» 2019 года).

Директор Института экспериментальной медицины  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России  
доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН



Галагудза М.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 197341, г. Санкт - 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2.  
тел. 8 (812) 702-37-30  
E-mail: [fmrc@almazovcentre.ru](mailto:fmrc@almazovcentre.ru)

Подпись доктора медицинских наук, чл.-корр. РАН Галагудзы Михаила Михайловича заверяю

Ученый секретарь  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
доктор медицинских наук, профессор



А.О. Недошивин