

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Сердобинцева Михаила Сергеевича на диссертационную работу Натальи Анатольевны Пасатецкой на тему: «Рецептор-опосредованная модуляция сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный Диссертационный Совет Д 002.020.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте Физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Актуальность темы диссертации.

Согласно статистическим данным показатель смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в России составляет около 60%. В Санкт-Петербурге этот показатель, по сравнению с общероссийским, выше на 2-3%. Санкт-Петербург также входит в число городов с одним из самых высоких показателей переломов костей, связанных с остеопорозом. Частота переломов шейки бедренной кости составляет 140 на 100 тыс. населения, а костей предплечья – 450 на 100 тыс. жителей.

Диссертационное исследование Н.А. Пасатецкой является актуальным, поскольку в работе вскрыты фундаментальные механизмы, своевременная модуляция которых может существенно снизить риск прогрессирования таких заболеваний как артериальная гипертензия и остеопороз. При исследовании процессов кардио- и остеоремоделирования в ходе ингибиторного анализа автор использовала зарегистрированные лекарственные препараты. В результате были обнаружены новые свойства атенолола и строфантина Г (оубаин), что исключительно актуально для практического здравоохранения.

Работа, являясь серьезным фундаментальным исследованием, позволила обосновать применение модуляции базовых физиологических механизмов, лежащих в основе процесса тканевого моделирования с клиническим приложением.

Научная новизна исследования. Впервые в прямых экспериментах с использованием метода органотипической культуры ткани получены приоритетные данные о трофотропных эффектах медиаторов симпатической нервной системы и их неоднозначной роли в регуляции процессов кардио- и остеоремоделирования. Для изучения тонких механизмов, лежащих в основе процесса остеогенеза, Н.А. Пасатецкая разработала авторскую методику органного культивирования костной ткани. Использование антител к рецептору витамина Д позволило автору получить неоспоримые доказательства того, что методика является адекватной, поскольку клетки в зоне роста органной культуры костной ткани являются клетками остеогенного ряда.

В модельных условиях Н.А. Пасатецкая впервые доказала наличие β_1 -адренорецепторов в клетках остеогенного ряда зоны роста органной культуры костной ткани.

Сравнительный анализ эффектов селективных и неселективных адrenoблокаторов позволил автору оценить участие разных типов адренорецепторов в регуляции остеогенеза.

В работе Натальи Анатольевны в условиях органотипического культивирования эмбриональной костной ткани впервые обнаружены эффекты низких, сопоставимых с эндогенными, концентраций оуабаина. Оказалось, что оуабаин, концентрация которого, по ряду литературных данных, увеличивается в период беременности и лактации, направленно модулирует процесс остеогенеза. Действие оуабаина было дозозависимым и зависело от типа исследуемой ткани.

Новыми, несомненно, являются оригинальные данные полученные автором при исследовании эффектов гомоцистеин тиолактона. Последние годы считалось, что уровень гомоцистеина и гомоцистеин тиолактона в плазме крови является своего рода маркером развития сердечно-сосудистой и остеогенной патологии. Однако, однозначно ответить на вопрос о базовых

основах токсических эффектов гомоцистеин тиолактона до настоящего исследования было достаточно сложно. В работе продемонстрированы результаты, которые позволяют полагать, что токсические эффекты гомоцистеин тиолактона, наиболее вероятно, связаны с его влиянием на натриевый насос, а не на сигнальную функцию Na^+, K^+ -АТФазы.

Научное и практическое значение работы. Разработанная оригинальная авторская методика органотипического культивирования ткани длинных трубчатых костей может быть использована для исследования влияния биологически активных веществ и лекарственных препаратов на процессы остеосинтеза и резорбции. Очень часто остеопороз развивается на фоне уже имеющихся сердечно-сосудистых заболеваний. Изучение общих патогенетических механизмов необходимо для поиска наиболее эффективных комплексных подходов к лечению и профилактике этих заболеваний.

В современной ортопедической хирургии интенсивно развивается направление научных исследований по поиску и оценке эффективности покрытий различных имплантов и остезамещающих материалов (в том числе антибиотиками и препаратами, способствующими регенерации костной ткани). В связи с этим необходимо отметить несомненную практическую ценность полученных в ходе диссертационного исследования данных о влиянии низких концентраций оуабаина на остеогенез.

Результаты проведенного исследования существенно расширяют сложившиеся представления о механизмах влияния катехоламинов и препаратов группы β -адреноблокаторов на процессы остео- и кардиоремоделирования и могут быть использованы в практическом здравоохранении.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 46 рисунков, иллюстрирующих результаты экспериментальных исследований. Работа Н.А.

Пасатецкой имеет традиционную структуру и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования), выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 194 источника (36 на русском и 158 на иностранных языках).

Достоверность полученных результатов определяется адекватностью использованных методов исследования и статистической обработкой значительного массива данных. Статистическая обработка результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента для двух независимых выборок в программе STATISTICA 10.0.

Результаты исследования изложены в 21 публикациях, шесть из них статьи ВАК, две статьи в иностранных журналах и одиннадцать публикаций представлены в виде устных докладов на отечественных и международных симпозиумах и конгрессах.

Автореферат в сжатой форме полностью отражает текст диссертации.

Во введении обосновывается актуальность проведенного исследования, формулируются цель и задачи, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна полученных результатов, их теоретическая и практическая значимость.

Обзор литературы состоит из 3 разделов общим объемом 25 страниц и содержит анализ современных представлений о роли биологически активных веществ, являющихся факторами риска развития патологии плода, на процессы ремоделирования ткани сердца и кости в эмбриональный период онтогенеза. Подробно изложены сведения о структуре, локализации, насосной и трансдукторной функциях Na^+, K^+ -АТФазы. Особо отмечается важная роль Na^+, K^+ -АТФазы как трансдуктора сигнала на ранних стадиях эмбриогенеза. Автор дает развернутое описание морфологических изменений в скелете и сердечно-сосудистой системе возникающих при развитии гипергомоцистеинемии. Отдельный подраздел посвящен рассмотрению

вклада симпатической нервной системы и ее медиаторов в процессы тканевого моделирования. Анализ известных данных, касающихся возможности модуляции насосной функции Na^+, K^+ -АТФазы через адренергические сигнальные пути позволил определить цели и задачи диссертационного исследования.

В разделе материалы и методы представлена морфологическая характеристика исследуемых тканей на данном этапе онтогенеза. Описан метод органотипического культивирования, состав культуральной среды, методики препаровки ткани сердца и кости, дизайн исследования. Для всестороннего анализа полученных данных был применен авторский подход, сочетающий метод органотипической культуры ткани с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа и расчетом толщины зоны роста. Использование антител позволило доказать, что клетки в зоне роста эксплантатов ткани кости являются клетками остеогенного ряда, и зарегистрировать наличие α_1 - и α_3 -изоформ Na^+, K^+ -АТФазы и β_1 -адренорецепторов. Оценка введенного автором параметра – толщина зоны роста прямо доказывает наличие многослойной структуры в зоне роста, как эксплантатов ткани сердца, так и эксплантатов ткани кости в условиях органотипического культивирования.

Все используемые методы и подходы являются высокотехнологичными и адекватными для работ такого рода.

В третьей главе описаны результаты собственных исследований, нацеленных на выявление возможности рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы гомоцистеин тиолактоном и катехоламинами. Для достижения данной цели использован ингибиторный анализ.

Необходимо отметить оригинальный авторский подход к изложению результатов. С помощью антител автор доказывает наличие в клетках исследуемых тканей β -адренорецепторов и α_1 - и α_3 -изоформ альфа

субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы. Предварительная проверка влияния каждого действующего вещества (включая блокаторы рецепторов) на рост эксплантатов ткани сердца и кости и построение кривых дозозависимости позволили доказать наличие тканеспецифичности оубаина, дигоксина, атенолола, адреналина и норадреналина. Анализ кривых дозозависимости позволил установить максимально эффективные в рамках поставленных задач дозы исследуемых агентов. Несомненным успехом автора является получение результата о трофотропной концентрации оубаина, которая оказалась равной 10^{-10} М в обеих исследуемых тканях. Однако трофотропный эффект оубаина в отношении регуляции остеогенеза был выше.

В последние годы в научной литературе появились данные о том, что уровень гомоцистеина и гомоцистеин тиолактона можно считать маркером развития сердечно-сосудистой патологии. В настоящей работе автор проверяла рабочую гипотезу о связи обнаруженных токсических эффектов гомоцистеин тиолактона с ингибированием Na^+, K^+ -АТФазы. Проведенные исследования позволили обнаружить кардио- и остеотоксические эффекты гомоцистеин тиолактона. Действие вещества оказалось дозозависимым и не тканеспецифичным в диапазоне концентраций от 7×10^{-9} до 10^{-3} М. Этот эффект сохранялся на фоне оубаина.

Интересными являются данные о регуляторных эффектах катехоламинов. Если в случае модуляции роста эксплантатов ткани сердца максимально эффективная доза для катехоламинов совпала (10^{-12} М у адреналина и норадреналина). Изучение остеогенеза доказало отсутствие трофотропного эффекта адреналина в исследованных концентрациях (10^{-14} - 10^{-4} М). Обнаружен его остеотоксический эффект в дозе 10^{-4} М. Норадреналин проявил трофотропный эффект в достаточно высокой концентрации – 10^{-6} М.

Ингибиторный анализ с помощью атенолола и пропранолола позволил установить участие разных типов адренорецепторов в реализации трофотропных и токсических эффектов катехоламинов. Фармакологический

анализ доказал участие разных типов адренорецепторов в модуляции сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы клеток исследуемых тканей.

Раздел «Обсуждение» свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния изучаемой научной проблемы. В этой главе автор анализирует результаты собственных исследований, сопоставляя их с данными литературы.

Выводы диссертации основаны на анализе полученных данных и соответствуют поставленным цели, задачам и положениям, выносимым на защиту.

Принципиальных замечаний по тексту и спектру обсуждаемых в работе проблем у меня не возникло.

В плане дискуссии хотелось бы услышать мнение автора по следующим вопросам.

1. Чем Вы объясните более сильный трофотропный эффект оубаина в отношении регуляции остеогенеза по отношению к процессам ремоделирования тканей сердца?
2. Какие Вы видите перспективы дальнейших научных исследований по решаемым в диссертации проблемам?

Заключение. Диссертационная работа Н.А. Пасатецкой «Рецептор-опосредованная модуляция сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы» по форме и содержанию, актуальности, новизне, полноте поставленных и решенных задач, их практической значимости, совокупности новых полученных в ходе исследования данных является завершённой научной квалификационной работой, в которой на основании результатов комплексных исследований решены наиболее важные вопросы о вовлеченности адренорецепторов в механизм модуляции сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы в ходе кардио- и остеоремоделирования, что является решением научных и практических задач в области физиологии, имеющих важное медико-социальное значение.

Диссертационная работа Н.А. Пасатецкой полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, автор Наталья Анатольевна Пасатецкая заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Ведущий научный сотрудник, руководитель направления
«Костно-суставная хирургия и ортопедия»
федерального государственного бюджетного учреждения
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор


М.С. Сердобинцев

Подпись д.м.н., проф. М.С. Сердобинцева заверяю,
Ученый секретарь Ученого совета
федерального государственного бюджетного учреждения
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
кандидат медицинских наук


А.Н. Муравьев

И.о. директора федерального государственного
бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации


Н.В. Кечаева

191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д.2-4
Тел.: 8(812) 775-75-55
e-mail: spbniif_all@mail.ru

“ 23 ” сентября 2019 г.