

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Рязанский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, доктор медицинских наук,
профессор _____ Калинин Р. Е.
«*Р.Е.*» _____ 2017 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Влияние окислительного стресса на длину теломеров в лейкоцитах крови при различном риске развития заболеваний сердечно-сосудистой системы и экстремальных состояниях» выполнена на кафедре биологической химии с курсом КЛД ФДПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на базе Института Клинической Кардиологии имени А.Л. Мясникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель Дорошук Наталья Александровна была прикреплена к кафедре биологической химии с курсом КЛД ФДПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации для выполнения диссертации на соискание ученой степени кандидата наук без освоения программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре.

В 2000 году окончила Российский государственный медицинский университет по специальности «Медицинская биохимия».

С 2014 года по настоящее время работает врачом генетиком в кабинете медицинской генетики Института Клинической Кардиологии имени А.Л. Мясникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Справка об обучении выдана в 2017 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: Тихазе Алла Карловна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник отдела биохимии свободнорадикальных процессов.

Научный консультант: Постнов Антон Ювенальевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт Клинической Кардиологии имени А.Л. Мясникова, руководитель отдела сердечно-сосудистой патологии.

По итогам обсуждения диссертации Дорошук Натальи Александровны «Влияние окислительного стресса на длину теломеров в лейкоцитах крови при различном риске развития заболеваний сердечно-сосудистой системы и экстремальных состояниях» принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

В нашей стране сердечно-сосудистые заболевания стоят на первом месте по смертности и инвалидизации трудоспособного населения. В связи с этим, важно иметь критерии для предсказания сердечно-сосудистых осложнений с целью их возможного предотвращения. Окислительный стресс вносит важный вклад в патогенез заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как атеросклероз, ИБС, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность и артериальная гипертензия. Развитие окислительного стресса сопровождается интенсификацией свободнорадикальных процессов которая вызывает повреждения биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), сопровождающиеся нарушением их функциональной активности. В частности, активация свободнорадикальных процессов может приводить к окислительной деструкции молекул ДНК, что в итоге вызывает укорочение теломерных повторов в хромосомах клеток. В зоне атеросклеротического поражения стенки сосуда происходит хроническое воспаление, при котором увеличиваются количество активных форм кислорода, что приводит к развитию окислительного стресса и может провоцировать уменьшение длины теломерных повторов в хромосомах эндотелиоцитов. Тем не менее, в доступной литературе не имеется достаточно убедительных данных, подтверждающих взаимосвязь между развитием окислительного стресса и уменьшением длины теломерных повторов хромосом при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Исходя из вышесказанного тема настоящей диссертации, посвященной изучению влияния окислительного стресса на окислительный катаболизм теломерной ДНК, представляется весьма актуальной.

Активные формы кислорода (АФК) и реакционноспособные карбонильные соединения - reactive carbonyl species (RCS) дикарбонилы способны модифицировать аминокислотные остатки белков, приводя к изменению их структурно-функциональных свойств. Свободнорадикальное окисление липидов приводит к накоплению липогидропероксидов и вторичных продуктов - дикарбониллов, таких как малоновый диальдегид (МДА). Дикарбонил глиоксаль образуется при автоокислении шестиатомных сахаров и при их соокислении с ненасыщенными липидами, а метилглиоксаль - при окислительном метаболизме триозофосфатов. Интенсификация свободнорадикального окисления липидов и увеличение генерирования АФК (окислительный стресс) с последующим накоплением дикарбониллов отмечены при развитии атеросклероза.

Первичные продукты свободнорадикального окисления, такие как гидропикосиды, и вторичные продукты, дикарбонилы, весьма агрессивны и могут реагировать с аминоклуппами биополимеров белков и нуклеиновых кислот, приводя к окислению этих молекул, а в ряде случаев и к их деструкции. В частности, показано, что при окислительном стрессе интегральным продуктом, характеризующим выраженность окислительного стресса, является 8-гидроксигуанин - продукт окислительной деструкции нуклеиновых кислот. В связи с этим, важным является исследование роли окислительного стресса в изменении длины теломеров при патологических состояниях и экстремальных состояниях организма.

Теломеры - это участки на линейных концах хромосом, содержащие многократно повторяющуюся шестинуклеотидную последовательность ДНК (TTAGGG) в комплексе с белками. Теломеры обеспечивают стабильную репликацию клеток и предохраняют хромосомы от слияния. В результате концевой недорепликации отстающей 3'-цепи ДНК при каждом митотическом делении клетки, длина теломерных повторов с возрастом сокращается. Многими исследователями показано, что развитие возрастных патологий связано с укорочением теломеров. Хроническое воспаление и окислительный стресс являются дополнительным фактором укорочения теломерных повторов хромосом. Сокращение длины теломерных повторов до критических значений вызывает старение клетки и последующий ее апоптоз. Чем короче теломеры, тем быстрее происходит старение организма. Проведенный сравнительный анализ продемонстрировал, что люди с сильно укороченными теломерами находятся в группе риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Пожилой возраст является фактором риска развития целого ряда хронических заболеваний, в том числе и сердечно-сосудистых. Ускоренное «биологическое старение» взаимосвязано с риском развития ряда возрастных болезней, в том числе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), рассеянного склероза, сахарного диабета 2-го типа (СД 2) и разных типов рака. Хорошо известно, что сердечно-сосудистая патология является причиной более чем половины смертей в мировой популяции. Поэтому очень важно проводить наиболее раннюю диагностику развития ССЗ. Одним из методов раннего выявления развития ССЗ может служить метод определения длины

теломерных повторов хромосом. Данная методика адаптирована для отечественных амплификаторов, что позволяет недорого и в короткие сроки определить относительную длину теломерных повторов, а также позволяет следить за динамикой изменения длины теломерных повторов. Таким образом, длина теломерной ДНК может служить показателем биологического возраста, а также может служить в качестве прогностического маркера риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Все экспериментальные исследования, измерения генетических и биохимических параметров, а также статистическая обработка результатов, создание рисунков, таблиц и графиков выполнены автором самостоятельно.

Автором были исследованы биохимические (уровень окОЛН, длина теломеров, МДА) параметры 635 человек. Были разработаны нормальные значения длины теломеров в различных возрастных группах, показана зависимость между укорочением теломеров и уровнем окЛНП в плазме крови у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Выявлено снижение длины теломерных повторов при увеличении риска сердечно-сосудистых заболеваний или при наличии ИБС. Уставлены критические значения длины теломеров, при котором риск развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний достоверно возрастает. Обнаружена уменьшение длины теломеров и увеличение уровня МДА у здоровых добровольцев при моделировании волн летней жары.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне с использованием статистических методов: параметрического t-критерия Стьюдента, критерия χ^2 и точного критерия Фишера, корреляционного анализа по Пирсену, U-критерия Манна-Уитни, критерия Вилкоксона для зависимых выборок. В работе использованы современные иммунохимическое определение уровня окисленных ЛНП в плазме крови, определение вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов МДА оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, выделение геномной ДНК из ядерных клеток крови при помощи наборов для выделения ДНК, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени методики, адекватные цели и задачам исследования.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований со статистической обработкой результатов с помощью программ SPSS 21.0 и EXCEL 2013.

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой и не вызывает сомнений. Научные положения, полученные выводы и практические рекомендации достаточно обоснованы и логически вытекают из результатов исследования. В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и иностранных

авторов.

Новизна результатов проведенных исследований

Измерена относительная длина теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови жителей московского региона в различных возрастных группах с использованием модифицированного метода количественной полимеразной цепной реакции. Впервые установлена связь между выраженностью окислительного стресса (увеличение уровня окЛНП в плазме крови) и проявлениями окислительной деструкции ДНК (уменьшение длины теломерных повторов в лейкоцитах крови) у пациентов с высоким риском ССС (по шкале скор) и больных ИБС. Впервые выявлены критические значения теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови при которых у пациентов с ИБС и с различным риском развития этого заболевания достоверно возрастает опасность развития сердечно-сосудистых событий (нестабильная стенокардия, реваскуляризация миокарда, ИМ, ОНМК, сердечно-сосудистая смерть) в течение последующих пяти лет. Установлено снижение длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у добровольцев при моделировании действия неблагоприятных климатических факторов (гипертермия), способных индуцировать развитие окислительного стресса.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Полученные результаты обосновывают возможность использования новых прогностических маркеров риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, основанных на изучении таких показателей как относительная длина теломеров в лейкоцитах крови и уровень окЛНП в плазме крови. Разработан оригинальный метод расчета длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови адаптированный для лабораторного оборудования и реактивов российского производства. Установлены значения длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови для практически здоровых жителей московского региона. Рассчитано критическое значение длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови при котором риск развития сердечно-сосудистой осложнений увеличивается в 5 раз, что может служить прогностическим критерием и указывать на необходимость проведения регулярных обследований, а также необходимость разработки индивидуальной медикаментозной коррекции у такого рода больных.

Ценность научных работ соискателя

Результаты работы создают основу для понимания одного из молекулярных механизмов окислительного катаболизма молекул ДНК при патологических и экстремальных состояниях организма, сопровождающихся развитием окислительного стресса. Кроме того, результаты работы позволяют выявить критерии для оценки риска заболеваний сердечно-сосудистой системы по изменению длины теломерных повторов в лейкоцитах крови.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена изучению влияния окислительного стресса на длину теломеров в лейкоцитах крови у пациентов с различным риском

развития сердечно-сосудистых заболеваний и у больных ИБС, а также у здоровых добровольцев, находившихся в искусственно созданных экстремальных климатических условиях (волны летней жары).

Она соответствует паспорту специальности 03.01.04-Биохимия (медицинские науки). Работа выполнена на кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах,
опубликованных соискателем**

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 5 статей в журналах перечня ВАК Минобрнауки России.

1. Дорошук, Н.А. Изменение длины теломер хромосом при воздействии климатических условий, имитирующих жару в Москве летом 2010 год / Н.А. Дорошук, А.Д. Дорошук, О.В.Родненков, М.К. Осяева, З.Б.Хасанова, Ю.Д. Хесуани, А.Ю. Постнов, И.Е.Чазова //Кардиологический Вестник. – 2013. – Т. VIII (XX), №2. – С. 32-35.

2. Ланкин, В.З. Окислительный стресс как фактор риска осложнения сердечно-сосудистых заболеваний и преждевременного старения при действии неблагоприятных климатических условий / В.З Ланкин, А.Ю. Постнов, О.В. Родненков, Г.Г. Коновалова, Н.А. Дорошук, А.К. Тихазе, М.К. Осяева, А.Д. Дорошук, Ю.Д. Хесуани, И.Е. Чазова // Кардиологический вестник. – 2013. – Т. VIII (XX), № 1. – С. 22-25.

3. Дорошук, Н.А. Прямое повреждающее воздействие на днк человека неблагоприятных экологических и климатических факторов / Н.А. Дорошук, А.Ю. Постнов, А.Д. Дорошук, З.Б. Хасанова, Н.В. Коновалова, Ю.Д. Хесуани, М.К. Осяева, О.В. Родненков, И.Е. Чазова // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86, № 12. – С. 72-77.

4. Дорошук, Н.А. Окислительный стресс и укорочение теломеров в лейкоцитах крови больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа / Н.А. Дорошук, В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, О.А. Одиноква, Г.Г. Коновалова, А.Ю. Постнов // Кардиологический вестник. – 2016. – Т. XI, №2. – С. 62-67.

5. Дорошук, Н.А. Влияние окислительного стресса на длину теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови лиц с различным риском сердечно-сосудистой смерти и больных ИБС / Н.А. Дорошук, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин, Т.К. Медникова, А.Ю. Постнов, В.В. Кухарчук // Кардиологический вестник. – 2017. – Т. XII, №1. – С. 32-36.

Диссертация «Влияние окислительного стресса на длину теломеров в лейкоцитах крови при различном риске развития заболеваний сердечно-сосудистой системы и экстремальных состояниях» Дорошук Наталья Александровны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 - Биохимия (медицинские науки).

Заключение принято на заседании кафедр биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, нормальной физиологии с курсом психофизиологии, фармакологии с курсом фармации ФДПО, факультетской терапии с курсами эндокринологии, клинической фармакологии, профессиональных болезней, госпитальной терапии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании 9 человек профессорско-преподавательского состава. Результаты голосования: «за» - 9 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет (протокол № 1 от 27 июня 2017 г.).



Сучков Игорь Александрович,
д.м.н., доцент, проректор
по научной работе и
инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ
Минздрава России