

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук, профессора Шолохова Леонида Федоровича на диссертацию Паршиной Анастасии Анатольевны на тему: «Патогенетическая роль нетоза в коагуляции плазмы и фибринолизе при раке толстого кишечника (экспериментально-клиническое исследование)», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.03.03 – Патологическая физиология.

1. Актуальность диссертационного исследования.

Избыточное тромбообразование при наличии злокачественных опухолей, несомненно, вносит значимый вклад в развитие тромботических и тромбоэмболических осложнений и, как следствие, смертность пациентов онкологического профиля, независимо от успешности терапии основного заболевания. Изучение путей и механизмов возникновения протромботического статуса при онкопатологии имеет достаточно долгую историю, однако, даже с учетом наличия широкого выбора современных препаратов для антикоагулянтной/антиагрегантной терапии не теряет своей актуальности и на данном этапе развития медицинской науки. В связи с чем поиск новых потенциальных терапевтических мишеней является важной задачей патологической физиологии как фундаментальной науки и как связующего звена между теорией и реальной клинической практикой. Таким образом, представленная диссертационная работа вызывает несомненный интерес и затрагивает особую социально-значимую область медицины. Наряду с важностью изучения нарушений процессов коагуляции как таковых, представленное исследование включает также и установление роли иммунных механизмов в вышеупомянутых процессах. В качестве одного из них предлагается нетоз – защитный механизм, реализуемый нейтрофильными гранулоцитами, представителями врожденного иммунитета и наиболее многочисленными лейкоцитами крови. Нетоз, как защитная программа и как способ гибели нейтрофилов имеет сравнительно короткую

историю изучения (Brinkmann et al., 2004). Однако, его патогенетический вклад в инициацию и поддержание хронического воспаления сложно переоценить. Учитывая, что нейтрофилы, как и прочие компоненты врожденного иммунитета, принимают участие в защите организма от совершенно разнородных факторов биологической и небиологической природы, в том числе и в гемостатических процессах. Соответственно, нетоз представляется связующим звеном между воспалением и избыточным тромбообразованием – двумя наиболее актуальными медицинскими проблемами, в особенности в контексте онкопатологии. В этой связи с диссертационная работа Паршиной А.А., целью которой явилось установление патогенетической роли литического нетоза в процессах свертывания плазмы крови и фибринолиза в норме и при состоянии хронической гиперкоагуляции у лиц с раком толстого кишечника представляет несомненный интерес, а ее актуальность не вызывает сомнений. Задачи логично вытекают из поставленной цели, конкретны, последовательны.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна исследования не вызывает сомнений и заключается в том, автором получены новые сведения, что индукция нетоза с помощью форбол-12-миристан-13-ацетата слабее у лиц, имеющих злокачественные новообразования толстого кишечника, в сравнении со здоровыми донорами.

Впервые показано, что формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек в аутоплазме сопровождается задержкой начального этапа коагуляции.

Заслуживают внимание новые данные, что формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек в плазме крови сопровождается интенсификацией фибринолиза.

Приоритетными являются данные что формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек у здоровых доноров ассоциировано с увеличением

концентрации плазминогена/плазмина, ИЛ-8, PSGL-1 и уменьшением уровня PAI-1.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Полученные результаты позволяют дополнить существующие представления о роли нетогенеза в реализации механизмов свертывания крови и фибринолиза в норме и при патологических состояниях (на примере злокачественных новообразований толстого кишечника). Автором обоснован ряд важнейших функциональных и количественных показателей, характеризующих процессы фибринообразования и фибринолиза, что позволяет выявить те их компоненты и/или этапы, которые наиболее чувствительны к влиянию нетоза. Высокая значимость полученных результатов определяется тем, что они позволяют прогнозировать характер и динамику расстройств гемостаза при развитии патологического процесса.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Результаты, представленные в работе, базируются на достаточном объеме исследований, научном анализе и применении широкого спектра современных и адекватных поставленным задачам методов исследования, выполненных с утвержденными методическими указаниями, рекомендациями. Статистическая обработка полученных результатов проведена в соответствии с международными правилами и стандартами. Положения, выносимые на защиту, обоснованы и сформулированы на основе системного подхода к решению поставленных задач. Выводы сформулированы на основе анализа фактического материала и логично вытекают из содержания работы.

Полнота изложения основных результатов работы в научной печати. По материалам диссертации опубликовано 7 работ: 3 статьи в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации

результатов исследований, 4 тезиса – в сборниках материалов конференций. Опубликованные работы достаточно полно отражают все аспекты выполненного исследования. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации.

Структура диссертации, ее содержание и завершенность в целом.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011, изложена традиционно, является целостным завершенным трудом и представляет собой рукопись, изложенную на 113 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка использованной литературы (178 источников, из них 27 отечественных и 151 зарубежный). Работа иллюстрирована 18 таблицами и 9 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены современные данные о структурах и функциях нейтрофилов, нейтрофильных внеклеточных ловушек. Особое внимание уделено внутриклеточным механизмам формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек, их стимуляторам и ингибиторам. Показана роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний. Логичным является заключение данного раздела, где убедительно показано, что феномен НВЛ можно рассматривать в качестве полноправного участника многообразных физиологических процессов, объединяющего в одно целое пути реализации врожденного и адаптивного иммунитета и гемостаза. На этом основании сделан вывод, что дисрегуляция нетоза ведёт к превращению его из адаптивного механизма в дизадаптивный, что и наблюдается при многочисленных и разнородных заболеваниях.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» содержит описание дизайна, методологии и материалов исследования. Важно отметить, что в представленной работе использован биологический материал

(периферическая венозная кровь) пациентов с раком толстого кишечника и лиц без злокачественного процесса, который далее был использован для моделирования изучаемого явления «in vitro». Это позволило выявить исходное состояние плазменных систем (свертывающей, антикоагулянтной, фибринолитической) обследованных лиц, а также выявить их качественные и количественные изменения под влиянием нетоза и сформированных нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Следует отметить, что предлагаемая автором экспериментальная модель литического нетоза в аутоплазме принципиально проста, при этом является гибкой и масштабируемой и может быть дополнена компонентами, значение которых для изучаемого процесса необходимо установить.

Статистическая обработка проведена с использованием пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Перед анализом результатов все полученные вариационные ряды тестировались на нормальность распределения с использованием теста Шапиро-Уилка. Применены адекватные методы оценки полученных данных.

Глава 3. Результаты собственных исследований включают 2 этапа исследований (предварительный и основной).

На предварительном этапе было проведено исследование тромбодинамики, количества тканевого фактора и нейтрофильной эластазы, фибринолитической активности в группе контроля и пациентов.

На основном этапе оценивали уровень внеклеточной ДНК, визуализацию нейтрофильных внеклеточных ловушек, фибринообразование и фибринолиз. Для выявления связей между показателями функционального теста тромбодинамики с полученным уровнем компонентов гемостаза был проведен корреляционный анализ в обеих группах.

Глава 4. Обсуждение полученных результатов вызывает особый интерес, поскольку в данной главе показаны не только количественные изменения изучаемых параметров в исследуемых группах в сравнительных

аспектах, но и проводится их анализ с привлечением литературных данных. Объясняются различные стороны процесса нетоза как процесса формирования НВЛ, т.е. одного из возможных вариантов активности клетки, но и собственно НВЛ – как конкретную многокомпонентную структуру. Для этой цели были проведены различные по дизайну экспериментальные работы, что при сопоставлении их результатов между собой, позволило воссоздать подробную модель изучаемого процесса.

Была представлена принципиальная схема экспериментальной модели, которая включала в себя 2 компонента: бедную тромбоцитами плазму и нейтрофильные гранулоциты. При этом плазма одинакова в каждом образце, в то время как клетки представляли два варианта – интактные и активированные. В результате было получено 3 варианта работы системы коагуляции и фибринолиза: 1-й вариант – плазма без клеток, отражающий исходное функционирование системы гемостаза, 2-й вариант – плазма, содержащая интактные клетки, показывающий влияние на неё жизнедеятельности НГ в состоянии покоя и 3-й вариант – плазма с активированными клетками, воссоздающий процесс нетоза и демонстрирующий возможное его влияние на свертывание крови и последующий фибринолиз.

Установлено, что по истечении времени инкубации интактные клетки находились в виде суспензии, в то время как активированные клетки представляли собой единый конгломерат фрагментов оставшихся после разрушения клеток, что служило одним из показателей успешности индукции нетоза и гарантировало контакт внутриклеточных компонентов с плазмой.

На предварительном этапе исследования в тесте тромбодинамики было показано и на основном этапе подтверждено, что влияние нетоза на процесс коагуляции плазмы возможно и при удалении из образца значительной части

сформированных ДНК-сетей.

В основной части исследования показано замедление роста сгустка в начальной фазе и сделано предположение, что это связано не с содержанием ТФ и его ингибитора, а с замедлением образования тромбина и/или с этапом превращения фибриногена в фибрин.

Интересен факт о том, что после контакта плазмы с активатором и появления первых порций фибрина, рост сгустка замедляется и стабилизируется на относительно постоянном уровне. В контроле было выявлено ускорение скорости распространения роста, что вероятнее всего связано с увеличением вкДНК в плазме относительно исходного образца и в сравнении с аналогичными образцами у пациентов.

Установлено, что размер фибринового сгустка прямо зависит от скорости его роста – чем больше скорость, тем больше конечный размер. В контроле он уменьшился незначимо. Однако в группе больных, уменьшение конечного размера фибринового сгустка более существенное. Сделано предположение, что это объясняется не столько задержкой и замедлением роста на начальном этапе, но более активным и ранним, чем в контроле фибринолизом.

Таким образом, представленный вариант оценки влияния нетоза выявил значительное изменение фибринолитического потенциала исследованных образцов плазмы в зависимости от интенсивности продукции НВЛ. Интенсификация фибринолиза отмечена ещё на предварительной стадии в пробах с ФП. Простой тест позволил продемонстрировать наличие этого эффекта и максимальную его выраженность именно в образцах с нетозом.

В дальнейшем расширенный тест тромбодинамики позволил оценить процесс фибринолиза по трем параметрам: времени начала лизиса, динамике лизиса и времени необходимому для полного лизиса сгустка. Ожидаемо был

получен результат о более отсроченном фибринолизе в группе контроля и раннее начало лизиса у пациентов.

Показано, что наличие двух возможных путей нетоза (литического («смертельного») и «прижизненного») может быть объяснением избыточного тромбообразования при хронических заболеваниях, в том числе и при онкологических процессах. «Прижизненный» нетоз предполагает неполное разрушение НГ. Литический нетоз, напротив, способствует массивному выходу протеаз в плазму крови и наряду с активным тромбообразованием наблюдается и быстрый лизис сгустков.

Таким образом, при хронических воспалительных заболеваниях поддерживается длительная подпороговая стимуляция НГ, происходит их избыточная, но постепенная гибель путем «прижизненного» нетоза, что и является одним из факторов, способствующих гиперкоагуляции. При острых инфекционных заболеваниях или обострении хронических воспалительных процессов надпороговая стимуляция запускает гибель НГ путем «литического» нетоза с увеличением риска развития местной или генерализованной коагулопатии.

Заключение диссертационной работы содержит лаконичное обобщение результатов исследований, а именно, установлении роли нетоза в поддержании гомеостаза организма в условиях воздействия неблагоприятных факторов как окружающей, так и внутренней среды. Это обусловлено тем, что нетоз выступает в роли связующего звена, объединяя врожденный иммунитет и активность системы гемостаза в единый комплекс защитных реакций. Широкая распространенность расстройств коагуляции, в особенности гиперкоагуляция, является отражением неблагоприятного состояния внутренней среды. Делается вывод, что НВЛ осуществляют вспомогательную функцию на этапе коагуляции, а также иммунное подкрепление тромбообразования. В дальнейшая их роль в гемостатических реакциях заключается в элиминации тромбов, потенциально заключающихся в

себе патоген. Литический и «прижизненный» механизмы нетоза определяют, соответственно, большую или меньшую протеазную активность НВЛ. Это является компонентом патогенеза расстройств гемостаза при наличии острых и хронических воспалительных процессов, что необходимо учитывать при патогенетическом обосновании методов лечения и профилактики различных патологических состояний, включая онкологические заболевания.

На основании выполненных исследований и данных литературы А.А. Паршиной предложена и научно обоснована концептуальная схема патогенеза нарушений фибринообразования и фибринолиза при «прижизненном» и «смертельном нетозе».

Общие замечания к диссертационной работе. Принципиальных замечаний по работе нет. Наряду с положительной оценкой хотелось бы задать вопросы дискуссионного характера:

1. Возможно ли получение иных результатов при использовании другого активатора?
2. Насколько значимо влияние индуктора на исследуемые свойства плазмы?
3. Можно ли экстраполировать выводы на злокачественные новообразования других локализаций?

Заключение. Диссертационная работа Паршиной Анастасии Анатольевны «Патогенетическая роль нетоза в коагуляции плазмы и фибринолизе при раке толстого кишечника (экспериментально-клиническое исследование)», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.03.03 – Патологическая физиология, (научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор Цыбиков Н.Н.), является завершенной научно-квалификационной работой, решающей актуальную научную задачу патологической физиологии: установление патогенетической роли нетоза в развитии состояния гиперкоагуляции при

неоплазиях толстого кишечника. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов, представленная диссертационная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016г. №335, с изменениями Постановления Правительства РФ от 01.10.2018г. №1168), предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация соответствует пунктам 2, 5 и 8 паспорта специальности: 14.03.03 - Патологическая физиология, а сам соискатель достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук.

Официальный оппонент:

д.м.н., профессор, заведующий лабораторией физиологии и патологии эндокринной системы ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

(Адрес: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16;

телефон: 8 (3952) 20-73-67; e-mail: lfshol@mail.ru)

«22» апреля 2021 г.

Шолохов Леонид Федорович

Подпись и данные о д.м.н., профессоре Шолохове Л.Ф. заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»,

к.б.н.

Рашидова Мария Александровна

Подпись Шолохова Л.Ф.
удостоверяю
Начальник отдела
кадров

