

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Паниной С.Б.

*«РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ  
ЦИТОКИНОВ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ГОНАРТРОЗА»,*

*представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.04 – биохимия*

**Актуальность** диссертационной работы Светланы Борисовны Паниной не вызывает сомнения, поскольку она посвящена изучению важнейших биохимических систем, участвующих в развитии гонартроза, и разработке на этой основе патогенетически обусловленных методов диагностики и прогнозирования течения этого заболевания. Данные медицинской статистики свидетельствуют о том, что в Российской Федерации ежегодно впервые диагностируются до 700 тыс. новых случаев воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов. Наибольшее медико-социальное значение за счет широкой распространенности в популяции получили такие ревматические заболевания как остеоартроз и ревматоидный артрит. Они преимущественно поражают трудоспособное население, влияют на качество жизни пациентов, могут приводить к развитию инвалидности и, в некоторых случаях, определяют неблагоприятный для жизни прогноз. Таким образом, изучение патогенеза и лечение заболеваний костно-суставной системы являются важными не только медицинскими, но и социальными проблемами.

Несмотря на то, что ревматические заболевания включают более 80 болезней и синдромов, медико-социальная и экономическая нагрузка на общество в значительной степени связана с остеоартрозом, являющимся наиболее распространенным заболеванием суставов, симптомы которого наблюдаются более чем у 10–20% населения земного шара. Согласно данным отечественной литературы последних лет в России 40% людей старше 70 лет страдают деформирующим остеоартрозом и 25% из них не могут переносить

ежедневные физические нагрузки. А у лиц трудоспособного возраста с диагнозом остеоартроз коленного сустава примерно в два раза увеличивается вероятность продолжительности временной нетрудоспособности и примерно на 40-50% выше риск стойкой нетрудоспособности по сравнению с населением в целом. В 80% остеоартроз коленного сустава является посттравматическим. Основной контингент пациентов с посттравматическим остеоартрозом - это люди молодого, трудоспособного возраста, ведущие физически активный, спортивный образ жизни. Развитие посттравматической нестабильности, синовита, гонартроза, контрактуры ограничивает функциональные возможности пациентов, порой приводит их к инвалидности. Это определяет высокую социально-экономическую значимость всестороннего исследования суставной патологии посттравматического генеза. А разработку новых методов ранней диагностики и прогноза суставных заболеваний и создание новых лабораторных маркеров, отражающих их тяжесть, можно считать актуальной задачей современной биомедицины и ревматологии. Именно этому и посвящена работа С.Б. Паниной.

Диссертация представляет собой комплексное клинико-экспериментальное исследование, в котором в крови и синовиальной жидкости (СЖ) больных изучены содержание малонового диальдегида как маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность ферментов первой линии антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы и каталазы), функционирование глутатионовой системы, оценена работа одной из основных прооксидантных систем (ксантиндегидрогеназная и ксантиноксидазная активности, уровень мочевой кислоты), уровень апоптоза лимфоцитов крови, концентрация провоспалительных цитокинов, генотип ряда полиморфных локусов генов, кодирующих изученные антиоксидантные ферменты и цитокины, а также NO-синтазы, матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы. Все перечисленные биохимические и иммунологические показатели были проанализированы в сравнительном аспекте в двух

достаточно репрезентативных группах больных: 89 пациентов с первичным гонартрозом и 71 пациент с посттравматическим гонартрозом. В обеих группах больные были разделены на три подгруппы в зависимости от стадии заболевания, что позволило выявить влияние тяжести процесса на выраженность изменений. Генотипирование было проведено у 117 пациентов с посттравматическим гонартрозом.

Автору удалось установить изменения редокс-статуса плазмы и клеток крови, обусловленные нарушением баланса активности сопряженных антиоксидантных ферментов, а также активацией ксантиноксидоредуктазы мононуклеарных клеток, что способствовало повышению интенсивности ПОЛ в крови и ярко выраженным изменениям редокс-показателей синовиальной жидкости больных гонартрозом. Таким образом, подтверждена роль нарушения свободнорадикальных процессов в развитии как первичного, так и посттравматического гонартроза и принадлежность этого заболевания к типичным свободнорадикальным или редокс-патологиям. Проведенный диссертантом корреляционный анализ показал, что активация глутатионпероксидазы в мононуклеарных клетках и сопряженное снижение уровня восстановленного глутатиона в синовиальной жидкости более характерно для посттравматического гонартроза, а повышение активности глутатион-S-трансферазы в клетках крови и СЖ – для первичного гонартроза, особенно, поздних стадий. Впервые доказана интенсификация апоптоза лимфоцитов периферической крови, как при первичном, так и посттравматическом гонартрозе.

Несмотря на большое количество работ по изучению гонартроза, в том числе включающих и анализ биохимических систем, исследованных в данной диссертации, очень многие из установленных диссертантом фактов являются новыми. При этом следует отметить, что основное внимание исследователи, в первую очередь зарубежные, уделяли изучению первичного гонартроза, а по посттравматическому гонартрозу данных на несколько порядков меньше и они также почти исключительно принадлежат

зарубежным авторам. Доступные данные литературы позволяют прийти к заключению, что в диссертации С.Б. Паниной практически впервые проведен комплексный сравнительный анализ патогенетически значимых метаболических нарушений, характерных для первичного и посттравматического гонартрозов. Впервые показано участие ряда полиморфных локусов в предрасположенности к гонартрозу и абсолютно новыми являются данные о роли в нем генов матриксной металлопротеиназы 12 и NO-синтазы 1. В частности автором доказано, что наличие одного аллеля гена матриксной металлопротеиназы-12 увеличивает почти вдвое риск развития посттравматического гонартроза, а другая аллель того же локуса может иметь протективное значение. Примененный автором подход исследования полиморфизма генов каталазы и глутатион-S-трансферазы P1 и их активности позволил найти ответ на вопрос об участии этих ферментов в патогенезе заболевания. Комплексный математический анализ вероятности взаимодействия генов способствует более достоверному прогнозированию развития посттравматического гонартроза.

Таким образом, **новизна** не только данных, полученных в результате проведенных исследований, но и новизна ряда подходов автора не вызывает сомнения.

Многие из установленных в работе закономерностей имеют **практическое значение**. Ряд редокс-показателей плазмы, клеток крови и синовиальной жидкости, сопряженные с клинической и рентгенологической картиной гонартроза, а также результаты исследования генетической предрасположенности к его развитию автор обосновано рекомендует использовать для дифференциальной диагностики стадии заболевания и в качестве прогностических критериев. Это нашло отражение в двух поданных заявках на изобретение, по одной из которых получено решение о выдаче патента. На основе полученных в ходе диссертационного исследования результатов автором создан инновационный стартап-проекта «Артротест К – тест-система для оценки состояния коленного сустава и выявления

генетической предрасположенности к развитию артроза», вошедший в ТОП-20 федеральных биомедицинских проектов 2015 года. Полученные данные и примененные диссертантом способы их статистической обработки и анализа, несомненно, могут быть использованы в учебном и научном процессах, проводимых на биологических факультетах университетов и в медицинских вузах.

Обоснованность и значимость установленных в диссертации фактов и объективность сделанных выводов определяются достаточным количеством больных, включенных в исследование, современными методами их обследования, проведением научных исследований на сертифицированном оборудовании с использованием адекватных и соответствующих поставленным задачам современных биохимических, иммунологических, цитофлуориметрических и молекулярно-биологических методов, и подтверждаются статистической обработкой, корреляционным и регрессионным анализом, выполненными на высокопрофессиональном уровне.

Диссертационная работа написана в традиционном стиле, изложена на 149 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение (6 стр.), обзор литературы (34 стр.), материалы и методы (17 стр.), главу с результатами собственных исследований и их обсуждением (54 стр.), заключение (7 стр.), и 8 выводов. Работа содержит 19 таблиц и иллюстрирована 20 рисунками. Указатель литературы включает 303 источника, из которых 54 отечественных и 249 зарубежных.

Во введении отражены все необходимые позиции. Обзор литературы состоит из трех подразделов. В первом подразделе, названном «Молекулярно-клеточные механизмы окислительного стресса», охарактеризованы основные активные формы кислорода, ферментные системы, участвующие в их генерации, основные этапы ПОЛ и антиоксидантные ферменты. Во втором подразделе автор описывает биологические основы развития артроза, роль провоспалительных факторов,

активных форм кислорода и азота, процессов апоптоза. Третий подраздел посвящен генетическим аспектам предрасположенности к развитию артроза. Обзор написан на основе новейших научных данных, опубликованных преимущественно в зарубежной печати, и свидетельствует о великолепном знании современной литературы по рассматриваемым вопросам. К недоработкам на наш взгляд относятся имеющиеся повторы (например, на стр. 15 и 20, на стр. 25 в соседних абзацах) и отсутствие заключения об актуальности предпринятого диссертантом исследования на основании сведений, представленных в обзоре литературы.

Глава 2, посвященная материалам и методам исследования, содержит четкое описание клинических групп больных, биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических методик. Следует отметить высокий научно-методический уровень работы и использование наряду с классическими биохимическими подходами, адекватными поставленным задачам, высокотехнологичных методов иммуноферментного анализа, проточной цитофлуориметрии, полимеразной цепной реакции с последующей электрофоретической детекцией амплификонов, а также математического арсенала, включавшего корреляционный и регрессионный анализы, современные методы моделирования (MDR- и GMDR-мультилокусные модели).

Глава 3, в которой представлены результаты исследования и их обсуждение, состоит из пяти подразделов. В первом проанализированы результаты исследования активности антиоксидантных ферментов и содержания молекулярного продукта ПОЛ малонового диальдегида в крови и синовиальной жидкости пациентов с первичным и посттравматическим гонартрозом. Второй подраздел посвящен оценке дегидрогеназной и оксидазной активностей ксантиноксидоредуктазы и концентрации мочевой кислоты у больных обеих групп. В третьем подразделе показана значительная, приблизительно равная интенсификация апоптоза в лимфоцитах крови больных с первичным и посттравматическим

гонартрозом. В четвертом – представлены результаты сравнительного изучения содержания двух провоспалительных цитокинов и показано увеличение лишь уровня интерлейкина $1\beta$ , особенно выраженное в плазме крови и синовиальной жидкости больных с первичным гонартрозом; подробно обсуждаются данные литературы об участии интерлейкина $1\beta$  и фактора некроза опухоли в патогенезе артроза. Пятый подраздел посвящен *анализу ассоциации полиморфных локусов генов интерлейкинов, матриксных металлопротеиназ, NO-синтаз и антиоксидантных ферментов с развитием посттравматического гонартроза.*

В результате скрупулёзно проведенного исследования и математического анализа и моделирования автором установлена взаимосвязь между регуляцией процессов свободнорадикального окисления, воспалением и генетическими факторами, что, несомненно, вносит вклад в решение фундаментальных и прикладных проблем травматологии и ортопедии. Особенно важным представляется разработка в данной диссертации на основании изучения биохимических и генетических механизмов развития гонартроза прогностических и предикторных факторов, которые доступны для использования в практической медицине благодаря достигнутому в последние годы в России достаточно высокому научно-техническому оснащению не только крупных медицинских центров, но многих учреждений поликлинического и больничного звена.

К замечаниям по представлению и обсуждению результатов диссертационного исследования можно отнести следующее.

1. Большинство таблиц и рисунков расположены далеко от их описания и находятся среди многочисленных данных литературы. Таблицы необходимо располагать сразу после ссылки на них в тексте (а не через несколько страниц после описания, например табл. 13, стр. 86-88). Что касается рисунков, их, на наш взгляд, можно было бы сделать меньшего размера, тем более что основная информация содержится в таблицах.

2. Не всегда понятно о чьих данных идет речь: собственных или литературных. Данные, полученные диссертантом, представлены не достаточно выигрышно и как-бы тонут в огромном количестве информации из новейшей литературы.

3. В разделе «Заключение» обычно вначале кратко подводится итог проведенных исследований и затем желательно показать их место, научную значимость в сопоставлении с состоянием и разработанностью данной проблемы. *Вместо этого приводятся данные литературы и изредка вскользь упоминаются результаты, полученные в ходе диссертационного исследования.* В этом плане на наш взгляд выигрышной выглядит более лаконичный вариант заключения в автореферате, к которому претензий нет. В то же время следует подчеркнуть, что в заключении и в автореферате приведена разработанная автором диссертации удачная схема, в которой сведены воедино практически все установленные в ходе исследования факты и отражена их роль в патогенезе гонартроза.

Выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным.

По теме диссертации опубликовано большое количество работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. Однако, представленные в автореферате под номерами 1 и 2 статьи в журнале «Биохимия» не относятся к печатным работам, в которых опубликованы материалы диссертации (статья №2 используется лишь в разделе заключения). Результаты работы представлены на многочисленных конференциях регионального и международного масштаба. Опубликованные работы и автореферат отражают основные положения диссертационного исследования.

Принципиальных замечаний по работе нет. При знакомстве с диссертацией возникли вопросы, которые хотелось бы обсудить на защите.

1. С чем можете связать отмеченные вами различия: наличие по данным литературы и отсутствие по вашим данным корреляции между



концентрацией мочевой кислоты и уровнем провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в плазме крови и СЖ, а также отсутствие корреляции содержания этого цитокина у больных с травмой коленного сустава с тяжестью повреждения?

2. Не видите ли противоречия в том, что согласно полученным данным, отраженным в выводах 5 и 6 и в положениях, выносимых на защиту, уровень TNF $\alpha$  в плазме крови и СЖ при посттравматическом гонартрозе не изменяется относительно нормы, но при этом носительство мутантного аллеля-308A приводит к снижению содержания TNF $\alpha$  как у пациентов с посттравматическим гонартрозом, так и здоровых лиц.


Диссертационная работа С.Б. Паниной соответствует 3 пунктам паспорта специальности 03.01.04 – биохимия: п.10 – связь биохимических процессов с причинами болезней и изысканием путей их эффективного лечения, развитие методов генодиагностики и энзимодиагностики; п.12 – клиническая биохимия человека; п.14 – изучение роли активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления и свободнорадикальных продуктов в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Паниной Светланы Борисовны «Роль антиоксидантной системы и провоспалительных цитокинов в механизмах развития гонартроза» является законченным самостоятельно выполненным научно-квалификационным трудом. Результаты исследования можно расценивать как новое решение актуальной задачи – изучение механизмов гонартроза и разработка диагностических и прогностических факторов этого заболевания. Автор данной работы, несомненно, является разносторонне эрудированным, работоспособным и очень перспективным молодым ученым.

По актуальности темы, уровню и объему проведенных исследований, методическому уровню, несомненной новизне, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Паниной С. Б.

полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории  
изучения патогенеза злокачественных опухолей  
ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский  
онкологический институт" Минздрава России  И.А. Горошинская  
Адрес: 344037, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63.  
Тел.: +79185413946  
e-mail: iagor17@mail.ru

5 мая 2016 г.

Подпись профессора И.А. Горошинской заверяю.

Ученый секретарь РНИОИ, к.б.н., доцент  Е.А. Никипелова



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России); 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63; e-mail: rnioi@list.ru; web-сайт: www.rnioi.ru