

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 темы диссертационной работы Паниной С.Б. не вызывает сомнений, поскольку широкая распространенность и приводящий к инвалидизации характер течения артроза заставляют изучать патогенетические особенности развития заболевания с целью своевременной диагностики на ранних стадиях и коррекции терапии. Артроз характеризуется морфологическими, биохимическими, молекулярными изменениями клеток и экстраклеточного матрикса суставных тканей, что приводит к дегенерации хряща и развитию синовиального воспаления. Артроз является мультифакториальным полигенным заболеванием, важным пусковым фактором риска которого является травма сустава; в последнее время в научной литературе появляются результаты исследований, посвященных роли окислительного стресса и дисбаланса функционирования антиоксидантной защиты в суставных тканях при артрозе. Поэтому актуальной проблемой современной биомедицины является изучение молекулярно-биохимических механизмов прогрессирования артроза, а также поиск прогностических и диагностических предикторов развития патологии. Исходя из этого, было изучено состояние антиоксидантной защиты и содержание маркеров воспаления – цитокинов - в крови и синовиальной жидкости пациентов с артрозом коленного сустава, а также исследованы некоторые редокс-показатели клеток крови и уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови. При этом в работе пациенты с гонартрозом были

дифференцированы на две группы исходя из этиологии артроза – первичный и вторичный (посттравматический). Автор показал, что как для первичного, так и для посттравматического гонартроза было характерно нарушение баланса функционирования антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза) в эритроцитах. При этом редокс-статус мононуклеарных клеток крови отличался у пациентов с артрозом первичной и посттравматической этиологии. В группе пациентов с посттравматическим артрозом была предпринята попытка выявить взаимосвязь между активностью антиоксидантных ферментов и содержанием провоспалительных цитокинов с различными генотипами полиморфных локусов соответствующих им генов, а также был проведен поиск полиморфных локусов генов, вносящих вклад в предрасположенность к развитию заболевания. Теоретическая значимость проведенной работы состоит в том, что знание механизмов развития артроза, а именно взаимосвязи между регуляцией процессов свободнорадикального окисления, воспалением и генетическими факторами, позволяет решить ряд фундаментальных и прикладных (травматология, ортопедия, клиническая лабораторная диагностика) биомедицинских проблем.

Практическая значимость заключается в возможности использования результатов исследования в прогностических и диагностических целях в медицинских учреждениях и валеологических, спортивных центрах. Автором был впервые проведен комплексный корреляционный и регрессионный анализ редокс-параметров плазмы, клеток крови и синовиальной жидкости с учетом рентгенологической стадии гонартроза по шкале Kellgren/Lawrence. В результате были найдены показатели, сопряженные с рентгенологической стадией гонартроза. На основании полученных данных разработан способ дифференциальной диагностики стадий гонартроза (патентная заявка №2014153253, получено решение о выдаче патента от 15.03.2016), учитывающий показатели плазмы и мононуклеарной фракции крови. Кроме того, в работе показано, что некоторые полиморфные локусы, а именно, *A-82G*

MMP-12, G-84A nNOS, -1607 1G/2G MMP-1, могут быть использованы в качестве прогностических биомаркеров для оценки степени относительного риска развития посттравматического гонартроза. Данные факты отражены в патентной заявке «Способ прогнозирования предрасположенности к развитию посттравматического остеоартроза коленного сустава», №2014153254. Более того, результаты диссертационной работы являются основой инновационного стартап-проекта «Артротест К – тест-система для оценки состояния коленного сустава и выявления генетической предрасположенности к развитию артроза», который вошел в ТОП-20 биомедицинских проектов федерального стартап-акселератора GenerationS-2015. Результаты исследования могут также быть использованы при проведении практических занятий на факультете биологических наук, выполнении курсовых, дипломных работ, а также при обучении студентов навыкам работы со статистическими процедурами анализа данных и компьютерными программами статистической обработки.

Структура диссертации стандартна для работ подобного типа. Диссертация изложена на 149 страницах текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения (5 глав), заключения, выводов, списка литературы (303 источника). Иллюстративный материал включает 19 таблиц и 20 рисунков.

Диссертационная работа включает в себя достаточно объемный литературный обзор, при составлении которого были использованы преимущественно зарубежные источники, наиболее актуальные по дате публикаций; на основе литературного обзора автором были опубликованы две статьи в журналах перечня ВАК. В литературном обзоре обобщены данные об активированных кислородных метаболитах (АКМ) в норме и при патологии, их классификации, участии в запуске липопероксидации, про- и антиоксидантных ферментах, роли АКМ и синовиального воспаления в развитии гонартроза. Также рассмотрены результаты полногеномных анализов ассоциаций и мета-анализов, касающихся роли полиморфных

локусов генов (SNP-маркеры), в том числе генов матриксных металлопротеиназ, провоспалительных цитокинов, ассоциированных с повышенным риском развития артроза.

Экспериментальная часть работы выполнена на хорошем научно-методическом уровне с использованием биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических методик. Клинические группы для исследования были сформированы с учетом принципов доказательной медицины, описаны критерии включения и исключения. Все методики описаны подробно (2-я глава) и могут быть воспроизведены. С помощью спектрофотометрического подхода определялись: содержание маркера липопероксидации малонового диальдегида, активность антиоксидантных и прооксидантных (ксантиноксидаза) ферментов, другие редокс-показатели (содержание мочевой кислоты, глутатиона) в крови и синовиальной жидкости. С помощью иммуноферментного анализа оценивалось содержание провоспалительных цитокинов; с помощью проточной цитофлуориметрии – уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови. Для генотипирования полиморфных локусов генов использовалась полимеразная цепная реакция с последующей электрофоретической детекцией амплификонов в агарозном геле. Результаты исследования подвергались разностороннему математическому анализу с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни, критерия χ^2 , корреляционного анализа, регрессионного, MDR, GMDR-моделирования.

В главах 3.1-3.4 приведены результаты, касающиеся изменений содержания малонового диальдегида, активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза), ксантиноксидоредуктазы и ее прооксидантной изоформы - ксантиноксидазы - в плазме, клетках крови и синовиальной жидкости; содержания низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион), мочевой кислоты, провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α) в плазме и синовиальной жидкости при первичном и посттравматическом

гонартрозе по сравнению с нормой. Согласно полученным диссертантом результатам, в крови и синовиальной жидкости у больных с гонартрозом наблюдаются выраженные изменения редокс-показателей, что приводит к развитию окислительного стресса и, вероятно, интенсификации процесса апоптоза лимфоцитов крови при гонартрозе, как было описано в главе 3.3. В главах 3.4-3.5 описаны результаты регрессионного моделирования генетико-биохимических исследований связи активности некоторых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион-S-трансфераза), содержанием провоспалительных цитокинов, маркеров нитрозильного стресса – нитритов/нитратов – с полиморфными локусами соответствующих генов при посттравматическом гонартрозе. В главе 3.5 представлены данные о частотах встречаемости полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ, антиоксидантных ферментов, NO-синтаз у пациентов с посттравматическим гонартрозом в изученной популяции. Результаты и их обсуждение с привлечением большого количества актуальных литературных источников достаточно объемны и доказательны.

В заключение диссертант приводит обобщающую гипотетическую схему, отражающую роль антиоксидантных ферментов, прооксидантных ферментов, провоспалительных цитокинов и изученных генетических факторов в молекулярно-клеточных механизмах прогрессирования гонартроза.

Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации.

В тоже время работа не лишена и некоторых недостатков:

1. Имеются опечатки на стр. 41, 126 и 140 диссертации.
2. В тексте диссертации имеет место дублирование термина и аббревиатуры того же термина из списка сокращений.
3. Поскольку, по мнению автора, полиморфные локусы генов SOD1 и

SOD2 не являются значимыми предикторами активности супероксиддисмутазы в плазме, синовиальной жидкости, моноклеарной фракции и эритроцитах, постольку следовало, наверно, определить и константу Михаэлиса-Ментен и скорость реакции с участием этих ферментов для более глубокого понимания вклада в активность фермента его концентрационной составляющей.

Однако, несмотря на замечания, работа представляется новой, проведенной на высоком методическом и аналитическом уровне. Выводы, сделанные автором, подкреплены обширным экспериментальным материалом.

В целом диссертация представляет собой завершённое научное исследование, вносящее вклад в решение проблемы изучения молекулярно-клеточных механизмов развития артроза различной этиологии (первичный, посттравматический гонартроз), диагностики и прогнозирования его течения. Работа полностью отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а диссертант заслуживает присвоения ему степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. – биохимия.

Заведующий кафедрой биохимии
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук (биохимия),
профессор
Адрес: Россия, 410012, Саратов,
ул. Большая Казачья, 112.
Тел. (845-2)-66-98-23.
meduniv@sgmu.ru
borodulinvb@mail.ru

В.Б. Бородулин



17.05.2016