

На правах рукописи

КОРОТКОВА НАТАЛЬЯ ВАСИЛЬЕВНА

АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОВ L И H ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ВЕН НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент Фомина Мария Алексеевна

Официальные оппоненты:

Маянская Наиля Назибовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Камилов Феликс Хусаинович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, заслуженный деятель науки Российской Федерации, член-корреспондент АН Республики Башкортостан

Ведущая организация:

НИИ клинической кардиологии имени А.Л. Мясникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» 2015 г. в 14.00 ч на заседании Диссертационного совета Д 001.002.01 ФГБНУ «НИИ питания» по адресу: 109240, Москва, Устьинский проезд, д. 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИ питания» и на сайте www.ion.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.
Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Шилина Н.М.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы исследования

В настоящее время исследование роли катепсинов и их эндогенных ингибиторов является приоритетным направлением клеточной и молекулярной биологии и медицины в целом, поскольку доказано их участие во множестве физиологических и патологических процессов (Turk V., 2001).

Лизосомальные цистеиновые протеиназы (ЛЦП) относятся к семейству папаиноподобных протеолитических ферментов (Kamphuis I.G., 1984). Первоначально они были идентифицированы, как ферменты, действующие в основном в лизосомах клетки, однако, исследования последних лет открыли новые для катепсинов функции, которые осуществляются ими в цитозоле (Sever S., 2007; Faul C., 2008), в секреторных пузырьках (Puri, N., 2008; Wartmann T., 2010) и в ядре клетки (Alcalay N.I., 2008).

Показано, что ЛЦП способны выделяться из лизосом и действовать в цитозоле клетки, а также способны выходить во внеклеточное пространство и подвергать частичному протеолизу компоненты внеклеточного матрикса (Turk V., 2000; Lutgens S., 2007) и стимулировать неоангиогенез (Premzl A., 2006; Zhou G.-H., 2013). Именно способность ферментов данной группы секретироваться во внеклеточную среду, в частности, при сердечно - сосудистых заболеваниях (Cheng X.W., 2004) привлекает внимание современных исследователей.

Одной из важных сосудистых патологий является острый венозный тромбоз нижних конечностей. Проблема венозных тромбозов в современной флебологической практике занимает лидирующее положение, так как частота его в общей популяции составляет ежегодно приблизительно 160 на 100 тысяч населения (White R.H., 2003). Ещё одной флебологической патологией является варикозная болезнь вен нижних конечностей (ВБНК), которая в течение долгого времени остаётся общей клинической проблемой, проявляющейся от чисто косметических дефектов до связанных с венозной недостаточностью трофических нарушений – трофических язв (Горелик С.Г., 2012) и хронической венозной недостаточности (ХВН) (Ройтман Е.В., 2008). А тенденция к росту тяжёлых осложнений, нередко приводящих к инвалидизации, значительно снижающих качество жизни пациентов и являющихся причиной летального исхода, побуждает к поиску новых, молекулярно обоснованных механизмов развития данной патологии.

Несмотря на существенный прогресс в изучении патогенеза заболеваний вен нижних конечностей не достигнуто однозначное понимание роли лейкоцитов и лизосомальных ферментов, содержащихся в них, в данной патологии. Немаловажная роль отводится, так называемым «активированным» лейкоцитам и макрофагам, которые могут являться основным фактором повреждения венозной стенки и клапанов, а также паравазальных тканей при первичных формах хронических заболеваний вен нижних конечностей (Kibbe M.R., 2010; McDaniel J.C., 2013).

Роль клеточного субстрата воспаления – лейкоцитов в повреждении венозной стенки при первичных формах хронических заболеваний вен и, прежде всего, при варикозном расширении вен, по-прежнему вызывает научные споры (Швальб, П.Г., 2002; Богачёв В.Ю., 2011). Тем не менее, появляется всё больше исследований, подтверждающих наличие повышенной адгезии лейкоцитов к стенке поражённого сосуда (Liu J., 2006).

К настоящему времени доказано, что ЛЦП чувствительны к мультифакторной регуляции. К возможным факторам воздействия относятся изменения синтеза и секреции ферментов, аутокаталитический процессинг (Васильева О.С., 2002; Pungercar J.R., 2009), изменение рН среды, концентрации специфического ингибитора ЛЦП цистатина С (Morgan A., 2008). Кроме того, одной из возможных причин изменения активности таких ферментов может оказаться способность их активного центра быть подверженным окислительной модификации. На основании вышеизложенного является актуальным изучение изменения активности ЛЦП и факторов её регуляции в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, сопоставив данные с тяжестью оксидативного стресса и выраженностью воспалительной реакции.

1.2 Цель и основные задачи исследования

Цель работы: исследование изменения активности лизосомальных цистеиновых катепсинов L и H и факторов её регуляции в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей в зависимости от выраженности оксидативного стресса и тяжести воспалительной реакции.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Изучить активность катепсинов L и H в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей с оценкой вклада влияния ингибитора цистатина С и аутопроцессинга.
2. Оценить выраженность окислительного карбонилирования белков при изучаемых патологиях.
3. Проанализировать зависимость изменения активности катепсинов L и H и факторов её регуляции от особенностей заболеваний вен нижних конечностей.
4. Проанализировать зависимость изменения активности ЛЦП и её регуляции от тяжести воспалительной реакции при заболеваниях вен нижних конечностей.
5. Оценить показатели лизосомального цистеинового протеолиза и факторы его регуляции в плазме, фракционированных лейкоцитах и в сосудистой стенке животных в условиях экспериментально моделированного венозного тромбоза.

1.3 Научная новизна

Впервые выявлено, что заболевания вен нижних конечностей - варикозное расширение вен и острый венозный тромбоз сопровождаются изменением активности лизосомальных цистеиновых протеиназ-катепсинов L и H: повышением их активности в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови (ПМЯЛ), снижением их активности в моноядерных (МЯЛ) лейкоцитах крови. Степень изменения активности изучаемых катепсинов при варикозном расширении вен выше, чем при остром венозном тромбозе.

Впервые показано, что острый венозный тромбоз сопровождается повышенным карбонилированием, а варикозное расширение вен – снижением карбонилирования белков. Обе патологии протекают с преобладанием маркёров первичного повреждения белков, что может свидетельствовать о раннем развитии ОС, характеризующегося возможной обратимостью.

Обнаружена полная активация катепсинов L и H в различных фракциях лейкоцитов крови и нарушение протеолитического баланса в ПМЯЛ, связанного с разнонаправленным характером изменений активности катепсинов и концентрации цистатина C у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей. Однонаправленное изменение активности катепсинов и концентрации их эндогенного ингибитора цистатина C у пациентов с острым венозным тромбозом свидетельствует о нормальном протеолитическом балансе при данной патологии.

Установлено, что увеличение уровня лейкоцитоза при остром венозном тромбозе сопровождается повышением активности катепсинов L и H в ПМЯЛ и МЯЛ крови и её снижением в плазме крови. Обнаружена положительная корреляционная связь высокой степени между активностью катепсина H в МЯЛ и концентрацией C – реактивного белка, активностью катепсина H в МЯЛ и ЛИИм, и положительная корреляционная связь средней степени между активностью катепсина L в ПМЯЛ и концентрацией сиаловых кислот в сыворотке крови у пациентов с острым венозным тромбозом.

Впервые установлено, что изменение активности катепсинов L и H при варикозном расширении вен увеличивается параллельно с повышением ЛИИм. Обнаружена положительная корреляция высокой степени между активностью катепсина H в МЯЛ и международной классификацией степени тяжести течения заболевания СЕАР, а также корреляция средней степени между активностью катепсина L в плазме крови и ЛИИм.

Впервые изучены процессы лизосомального цистеинового протеолиза в сосудистой стенке в условиях моделирования острого венозного тромбоза и установлено, что данная патология сопровождается повышением активности катепсинов L и H на фоне динамических изменений степени окислительной модификации белков сосудистой стенки.

1.4 Теоретическая и практическая значимость работы

Работа носит преимущественно фундаментальный характер. Результаты, полученные при исследовании катепсинов L и H и различных факторов, участвующих в её регуляции, при заболеваниях вен нижних конечностей вносят вклад в современные представления об участии лизосомальных цистеиновых протеиназ в патогенез указанных заболеваний. Полученные данные отражают изменения активности цистеиновых протеаз и концентрации их ингибитора цистатина C в плазме и лейкоцитах крови больных, их корреляцию с основными биохимическими маркерами воспаления при остром венозном тромбозе и зависимость от особенностей течения варикозного расширения вен нижних конечностей.

Обнаруженные изменения при экспериментально моделированном венозном тромбозе дополняют представления о патогенезе заболевания в части вклада лизосомального протеолиза и процессов окислительной модификации белков (ОМБ) сосудистой стенки.

Обнаруженные корреляции между активностью катепсина H в плазме, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови и особенностями течения заболевания у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, возможно, позволит в будущем его использование в качестве предположительного маркера степени тяжести заболевания.

1.5 Положения, выносимые на защиту

1. Заболевания вен нижних конечностей, в частности, варикозное расширение вен и острый венозный тромбоз, сопровождаются изменением активности лизосомальных цистеиновых протеиназ-катепсинов L и H: повышением их активности в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови, снижением их активности в моноядерных лейкоцитах крови. Степень изменения активности изучаемых катепсинов при варикозном расширении вен выше, чем при остром венозном тромбозе.

2. Варикозное расширение вен нижних конечностей сопровождается полной активацией катепсинов L и H в различных фракциях лейкоцитов крови. Разнонаправленный характер изменения активности катепсинов и концентрации цистатина C в плазме и ПМЯЛ может свидетельствовать о нарушении протеолитического баланса. Острый венозный тромбоз сопровождается присутствием неактивных форм катепсинов. Однонаправленное изменение активности катепсинов и концентрации цистатина C может свидетельствовать о нормальном протеолитическом балансе при данной патологии.

3. Острый венозный тромбоз характеризуется наличием следующих корреляционных связей высокой степени – между активностью катепсина H в МЯЛ и концентрацией C – реактивного белка, активностью катепсина H в МЯЛ и ЛИИм, средней степени – между активностью катепсина L в ПМЯЛ и концентрацией сиаловых кислот в плазме крови. Варикозное расширение вен характеризуется корреляцией высокой степени между активностью катепсина

Н в МЯЛ и классификацией СЕАР; корреляцией средней степени – между активностью катепсина L в плазме крови и ЛИИМ.

4. Процессы протеолиза и окислительной модификации белков сосудистой стенки вносят весомый вклад в патогенез острого венозного тромбоза.

1.6 Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций базируются на достаточном числе наблюдений, использовании современных методов, аппаратуры и наборов реагентов, применении современных методов статистической обработки материалов исследования.

Основные положения диссертационной работы доложены на:

8-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2011);

Всероссийской научно-практической конференции «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2012);

XIX Международной научно-практической конференции «Ветеринарные, сельскохозяйственные, биологические, химические науки: состояние и перспективы развития в 21 веке» (Одесса-Лондон, 2012);

XII региональной научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении (Дни лабораторной диагностики южного федерального округа)» (Ростов-на-Дону, 2013);

Международной научно-практической конференции «Тенденции формирования науки нового времени» (Уфа, 2013);

Межрегиональной научной конференции с международным участием Рязанского государственного медицинского Университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2014);

Десятой юбилейной международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Пицунда (Абхазия), 2014).

1.7 Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 7 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 патент.

1.8 Личный вклад соискателя

Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач и интерпретация результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Моделирование венозного тромбоза в эксперименте проводилось ординаторами отделения сосудистой хирургии РОККД А.А. Герасимовым и А.Н. Новиковым при личном участии автора.

1.9 Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения и выводов. Список литературы содержит 299 источников, из них 102 российских и 197 зарубежных. Объем работы составляет 150 страниц машинописного текста, содержит 18 таблиц и 16 рисунков.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с поставленными целями и задачами был разработан дизайн исследования, включающий в себя исследования клинического материала и экспериментальные исследования. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России 06.10.2011 года.

Клиническим материалом для исследования явились плазма и фракционированные лейкоциты (полиморфноядерные – ПМЯЛ и моноядерные – МЯЛ) периферической крови, полученные от 65 пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, в том числе 40 пациентов с диагнозом «острый венозный тромбоз» и 25 пациентов с диагнозом «варикозное расширение вен нижних конечностей», находившихся на стационарном лечении в отделении сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер» г. Рязани в 2011 – 2013 гг. В качестве контрольного материала использовались плазма и фракционированные лейкоциты периферической крови, полученные от 25 клинически здоровых доноров отделения переливания крови ГУЗ «Рязанская областная клиническая больница».

В экспериментальном блоке с целью подтверждения данных, полученных на этапе клинического исследования, и выявления возможных причин обнаруженных изменений, проводилось моделирование острого венозного тромбоза. Объектом исследования являлись конвенциональные половозрелые крысы линии Wistar. В качестве материала для исследования использовались плазма, гомогенаты тканей сосудов, фракционированные лейкоциты периферической крови. Воспроизведение тромбоза у экспериментальных животных осуществляли путём лигирования общей подвздошной вены (Reyers I., 1989; Zhou J., 2009) одной конечности.

Немедленно после выведения животного из эксперимента, извлекали сосуды: участок вены ниже места лигирования (тромбированная вена) и симметричный участок вены другой конечности (интактная вена). В качестве контроля использовались участки общей подвздошной вены интактных животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями.

Активность катепсинов L и H изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke (Barrett A.J., 1981) с измерением

флюоресцирующего продукта реакции – 7-амидо-4-метилкумарина, образующегося при расщеплении специфических флюорогенных субстратов.

Определение содержания цистатина С проводили с использованием наборов иммуноферментного анализа (ИФА) для определения цистатина С (ЦС) Bio Vendor (Чехия), содержащих специфичные антитела для цистатина С человека.

Для оценки степени прекаталитической активации в реакционную смесь, содержащую 8 мМ ДТТ, 2мМ ЭДТА и 0,1 мл исследуемого материала, содержащего фермент, преинкубировали в течение 15 минут при 37⁰С, после чего к ней добавляли 20 мкМ соответствующего субстрата и инкубировали 60 минут при 37⁰С (Борискина, М.А., 1996).

Оценка интенсивности окислительной модификации белков в тканях проводилась по методу R.L. Levine (Levine R.L., 1990) в модификации Е.Е. Дубининой (Дубинина Е.Е., 1995).

Для определения концентрации стабильных метаболитов NO (нитритов и нитратов) был использован метод в модификации В.А. Метельской (Метельская В.А., 2005).

Концентрация С-реактивного белка определялась иммунотурбидиметрическим методом с использованием коммерческих наборов производства «DiaSyS» (Германия).

Концентрация сиаловых кислот определялась фотоколориметрическим методом с использованием коммерческих наборов «Сиалотест-80» производства ООО НПП «Реахим».

Определение концентрации белка в гомогенатах тканей проводили по методу Лоури с использованием стандартизированных коммерческих наборов производства «DiaSyS» (Германия).

Статистическая обработка полученных данных проводилась методами непараметрической статистики с использованием пакетов прикладных программ Statistica 6.0. Для определения статистической значимости различий непрерывных величин, в зависимости от параметров распределения, использовался U-критерий Манна-Уитни. Непрерывные переменные представлены в виде $M \pm s$ (среднее \pm стандартное отклонение). Для исследования зависимостей между переменными использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех проведенных исследований различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Лизосомальный цистеиновый протеолиз у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей: общие тенденции

При изучении активности катепсинов L и H в плазме и лейкоцитах крови у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей были выявлены следующие тенденции (таблица 1): изменение активности катепсинов L и H у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей и острым

венозным тромбозом имеет однонаправленную тенденцию: активность изучаемых катепсинов в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови повышается, в моноядерных лейкоцитах крови снижается.

Степень изменения активности изучаемых ферментов у пациентов с варикозным расширением вен оказалась выше, статистически значимыми оказались межгрупповые отличия активности катепсина Н в ПМЯЛ и катепсина L в МЯЛ.

При изучении содержания цистатина С в плазме и лейкоцитах крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей мы обнаружили следующее (таблица 1).

Таблица 1

Показатели активности катепсинов L и Н в плазме (нмоль/чхл) и лейкоцитах крови (нмоль/чх 10^6 клеток) и концентрация цистатина С в плазме (нг/мл) и лейкоцитах крови (нг/ 10^6 клеток) пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, (M \pm s)

		Контрольная группа	Группа 1 (пациенты с варикозным расширением вен)	Группа 2 (пациентов с острым венозным тромбозом)
		n=25	n=25	n=40
ПЛАЗМА	Активность катепсина L	4,19 \pm 2,33	9,18 \pm 5,9*	5,79 \pm 2,35*
	Активность катепсина Н	3,87 \pm 3,17	9,44 \pm 8,76*	4,44 \pm 2,56*
	Цистатин С	1017,8 \pm 114,30	636,31 \pm 406,08	3600,38 \pm 763,83***
ПМЯЛ	Активность катепсина L	13,07 \pm 5,29	20,28 \pm 10,17*	13,74 \pm 9,96
	Активность катепсина Н	3,65 \pm 1,64	9,12 \pm 5,27*	4,96 \pm 3,90**
	Цистатин С	147,12 \pm 91,99	139,38 \pm 97,58	184,4 \pm 109,62**
МЯЛ	Активность катепсина L	34,42 \pm 14,70	16,42 \pm 9,26*	32,46 \pm 25,67**
	Активность катепсина Н	25,09 \pm 14,44	9,09 \pm 8,89*	13,92 \pm 12,60*
	Цистатин С	822,78 \pm 213,56	305,44 \pm 111,97*	492,67 \pm 256,08***

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05);

** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05)

Согласно данным литературы, в сыворотке крови здоровых лиц концентрация цистатина С составляет от 570 до 1790 нг/мл. Мы отметили, что при менее значительном повышении активности катепсинов (как это отмечалось у пациентов с тромбозом), концентрация их эндогенного ингибитора цистатина С повышается, что может свидетельствовать о нормальном протеолитическом балансе. При более высоком повышении активности катепсинов (как это отмечалось в плазме и ПМЯЛ пациентов с варикозным расширением вен), концентрации цистатина С снижается, что, возможно, свидетельствует о нарушении протеолитического баланса.

В МЯЛ крови отмечалась однонаправленная тенденция: снижение активности катепсинов и концентрации цистатина С.

При подсчёте коэффициента аутокаталитического действия мы получили следующие данные (таблица 2).

Таблица 2

Сравнительный анализ изменения коэффициента аутокаталитического действия в плазме и лейкоцитах крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, ($M \pm s$)

	Контрольная группа		Группа 1 (пациенты с варикозным расширением вен)		Группа 2 (пациенты с острым венозным тромбозом)	
	Катепсин L	Катепсин H	Катепсин L	Катепсин H	Катепсин L	Катепсин H
Плазма	1,18 ± 0,55	0,9 ± 0,40	0,78±0,34*	0,69 ± 0,25*	1,03 ± 0,32	1,17±0,54***
ПМЯЛ	1,01 ± 0,15	0,99 ± 0,08	0,96 ± 0,14	0,79± 0,19*	1,12 ± 0,18	1,01 ± 0,17**
МЯЛ	1,04 ± 0,12	0,78 ± 0,13	0,93±0,10*	0,67 ± 0,22	1,18±0,47**	1,04±0,13*,**
Примечание: * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$); ** – статистически значимые отличия от группы 1 ($p < 0,05$)						

Острый венозный тромбоз сопровождается активацией незрелых форм катепсинов L и H после проведённой прекалитической инкубации. При варикозном расширении вен нижних конечностей отмечается полная активация ферментов и после прекалитической преинкубации активность ферментов в плазме, ПМЯЛ и МЯЛ снижается.

3.2. Изучение влияния процессов оксидативного стресса на показатели протеолиза у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей

При оценке степени окислительной модификации белков в плазме крови у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей было обнаружено следующее (таблица 3). Полученные нами данные свидетельствуют о различных тенденциях изменения карбонилированных производных белков в плазме крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей.

Можно предположить, что одной из основных мишеней является белок фибриноген, окисленная форма которого приобретает аномальную способность индуцировать апоптоз эндотелиальных клеток посредством активации и адгезии тромбоцитов и лейкоцитов. Следовательно, накопление карбонилированных аддуктов белков в плазме крови пациентов с острым венозным тромбозом может явиться одним из звеньев развития и прогрессирования данной патологии.

Снижение карбонилированных аддуктов в плазме крови пациентов с варикозным расширением вен может быть связано с повышением протеолиза.

Таблица 3

Сравнительная характеристика уровня ОМБ в плазме крови здоровых доноров и пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, ед.опт.плотн./мл (M±s)

Длина волны, группы	λ 356	λ 370	λ 430	λ 530
Контрольная группа, n=25	79,22 ± 72,95	79,06 ± 75,53	44,12 ± 43,83	22,06 ± 21,55
Группа 1 (пациенты с варикозным расширением вен нижних конечностей, n=25)	58,58 ± 30,18	49,89 ± 24,18	39,46 ± 25,30	37,12 ± 20,8*
Группа 2 (пациенты с острым венозным тромбозом, n=40)	91,35±81,40***	71,6 ± 48,0	76,10 ± 61,4**	49,4 ± 20,8*
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05)				

Активность изучаемых катепсинов была гораздо выше, чем у пациентов с тромбозом. Повышение активности пептидаз, в свою очередь, может быть связано с массивным вовлечением лейкоцитов в патологический процесс. Кроме того, мы отметили, что как при остром венозном тромбозе, так и при варикозном расширении вен нижних конечностей преобладали альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) – маркёры первичного повреждения белков, что свидетельствует о начальных проявлениях оксидативного стресса (ОС) и об обратимости процесса. Но доля вторичных маркёров повреждения – кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) при варикозном расширении вен была выше, чем при остром венозном тромбозе, что, возможно, объясняется более длительным течением варикозного расширения вен.

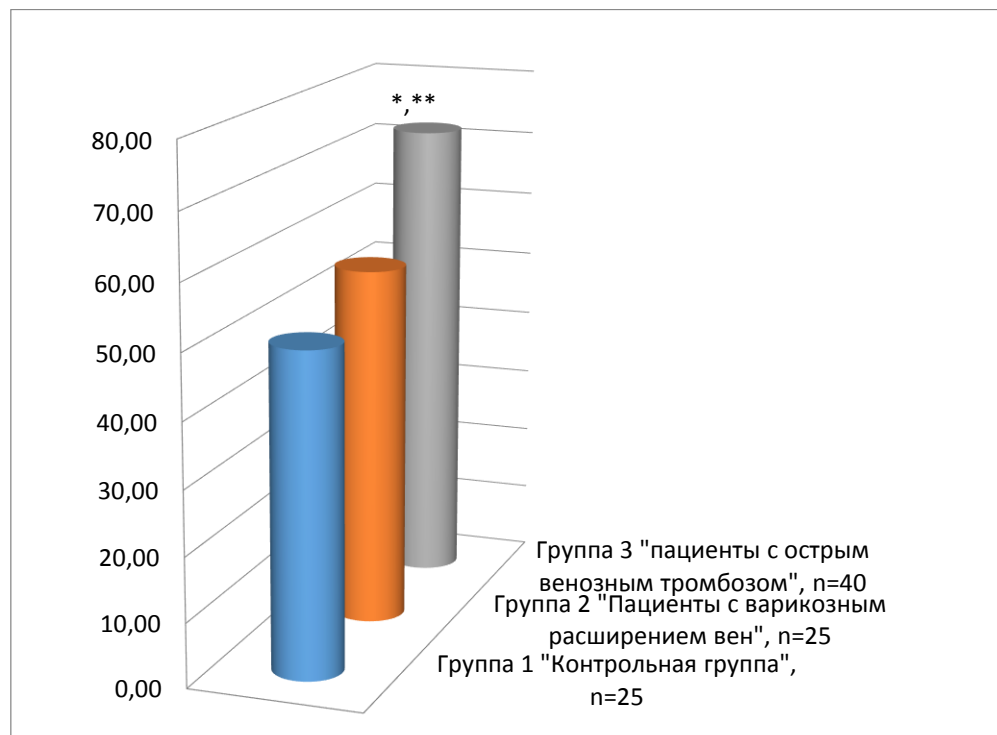
Одним из главнейших радикалов, участвующих в развитии ОС в настоящее время признан оксид азота, который обладает как проапоптотическим, так и антиапоптотическим действием. В связи с этим дальнейшее наше исследование коснулось конечных метаболитов оксида азота.

Учитывая то, что обе изучаемые нами патологии протекают на фоне ОС, было решено провести исследование зависимости между активностью катепсинов и концентрацией конечных метаболитов оксида азота.

Таким образом, при изучаемых нами венозных патологиях наблюдается увеличение синтеза продуктов деградации монооксида азота (рисунок 1).

NO способен ингибировать активность катепсина В, папаина и калпаина через S-нитрозилирование остатков цистеина в активном центре протеаз. Вполне возможно, что NO может ингибировать и активность катепсинов L и H, в результате чего снижается их активность.

При оценке корреляционных связей между показателями протеолиза и оксидативного стресса у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей была найдена отрицательная связь средней степени между концентрацией цистатина С в МЯЛ и ОМБ в плазме ($r = -0,4$).



Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$),

** – статистически значимые отличия от группы 2 ($p < 0,05$)

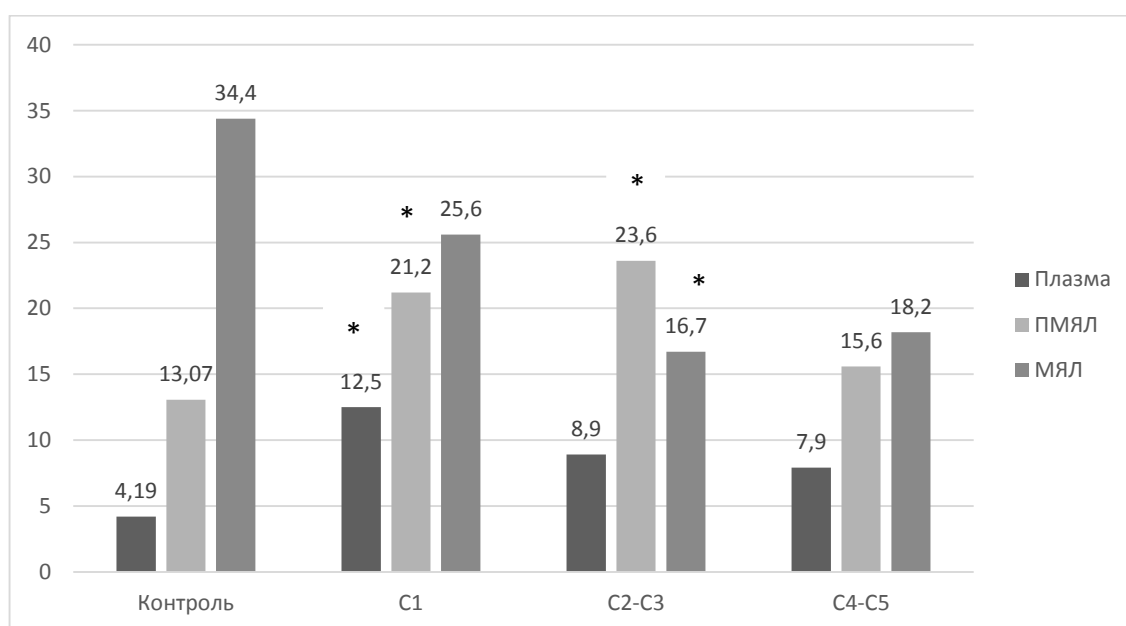
Рисунок 1. Концентрация продуктов монооксида азота в плазме крови пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей, мкмоль/л.

При оценке корреляционных связей между показателями протеолиза и оксидативного стресса у пациентов с острым венозным тромбозом были найдены отрицательные связи средней степени между активностью катепсинов L и H в плазме и концентрацией конечных метаболитов оксида азота ($r = -0,4$) и ($r = -0,34$) соответственно.

3.3. Изучение зависимости показателей лизосомального цистеинового протеолиза от клинических особенностей течения заболевания у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей

3.3.1. Зависимость показателей лизосомального цистеинового протеолиза от особенностей течения заболевания по международной классификации СЕАР у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей

Оценка изменений активности катепсина L и H в плазме и лейкоцитах крови у пациентов различных классов клинической тяжести по сравнению с контрольной группой выявила следующее: активность катепсина L оказалась максимальной в плазме и МЯЛ пациентов 1-й группы, ПМЯЛ пациентов 2-й группы; минимальной в МЯЛ пациентов 2-й группы.



Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05); *** – статистически значимые отличия от группы 2 (p<0,05).

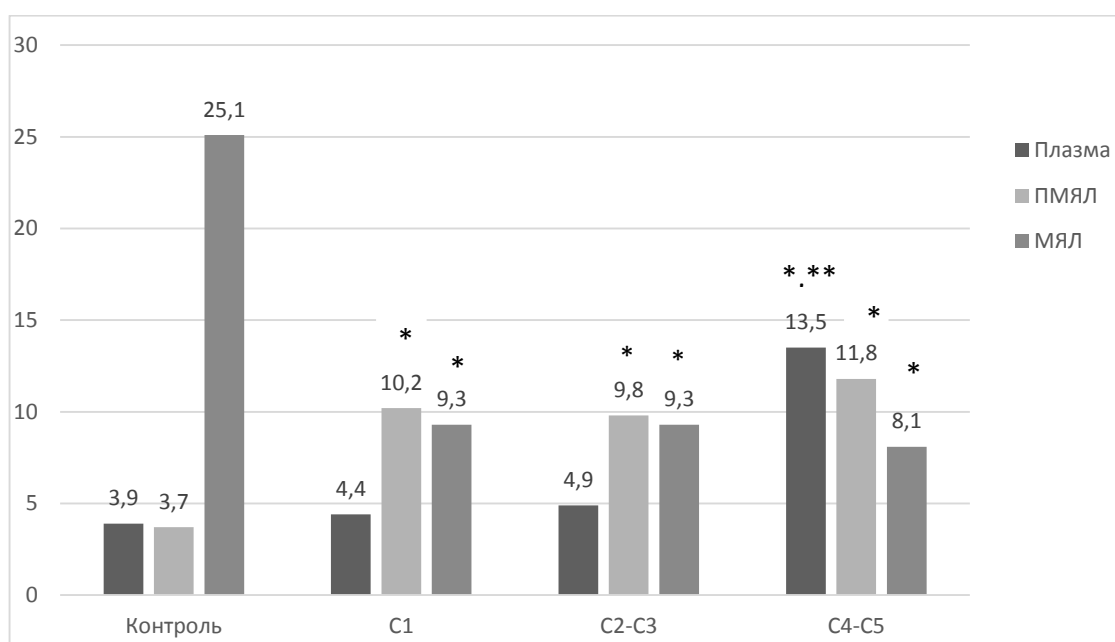
Рисунок 2. Показатели активности катепсина L в плазме (нм/ч₁₀⁶) и лейкоцитах крови (нмоль/ч₁₀⁶ клеток) у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в зависимости от особенностей течения заболевания

Активность катепсина H имела более чёткую зависимость от особенностей течения: максимальна в плазме и ПМЯЛ и минимальна в МЯЛ у пациентов с наиболее выраженной тяжестью течения заболевания по международной классификации СЕАР.

Наименьшие концентрации цистатина С отмечались в плазме и МЯЛ пациентов 1-й группы и ПМЯЛ пациентов 2-й группы, то есть там, где отмечалась наиболее высокая активность катепсина L, что подтверждает роль

цистатина С как регулятора активности катепсина L при варикозном расширении вен нижних конечностей.

При оценке корреляционных связей зависимости показателей лизосомального цистеинового протеолиза в плазме и лейкоцитах крови пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей с особенностями течения по международной классификации СЕАР и ЛИИМ были отмечены наиболее выраженные корреляционные связи между интегральной оценкой тяжести клинических симптомов по классификации СЕАР и: концентрацией цистатина С в МЯЛ $r = 0,75$ ($p=0,00001$), активностью катепсина Н в МЯЛ $r = 0,55$ ($p=0,005$), активностью катепсина Н в ПМЯЛ $r = 0,49$ ($p=0,012$), активностью катепсина Н в плазме $r = 0,41$ ($p=0,05$), активностью катепсина L в плазме и ЛИИМ $r = 0,52$ ($p=0,008$).

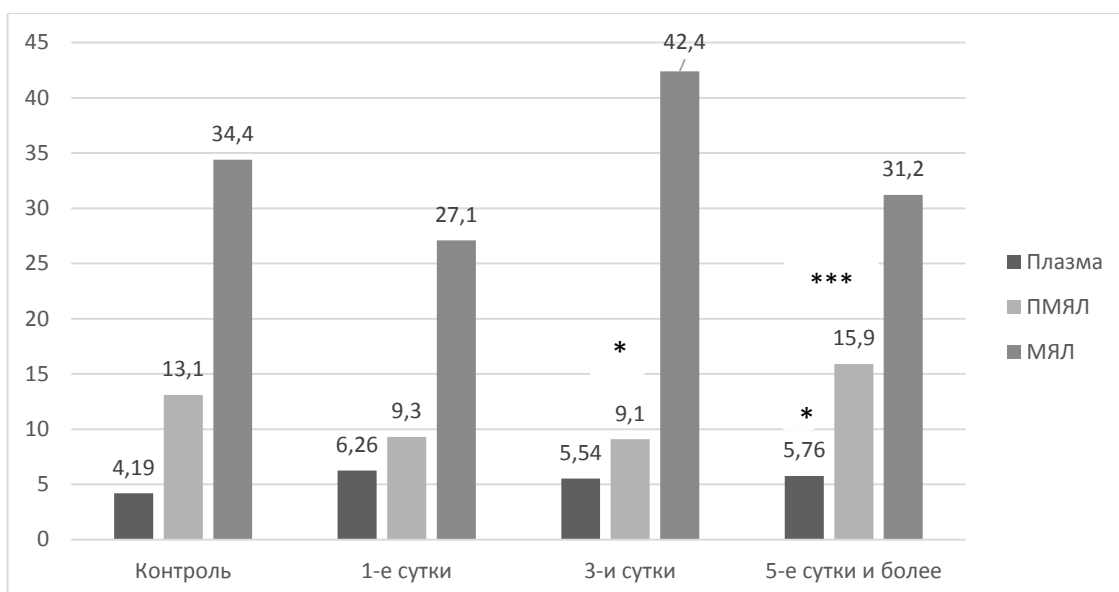


Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p<0,05$), ** – статистически значимые отличия от группы 1 ($p<0,05$); *** – статистически значимые отличия от группы 2 ($p<0,05$).

Рисунок 3. Показатели активности катепсина Н в плазме (нм/чхл) и лейкоцитах крови (нмоль/чх 10^6 клеток) у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей в зависимости от особенностей течения заболевания

3.3.3. Зависимость показателей протеолиза от динамики заболевания у пациентов с острым венозным тромбозом

Из представленных данных видно, что в плазме крови пациентов с острым венозным тромбозом происходит повышение активности катепсина L с максимальным, но статистически незначимым подъёмом на первые сутки, далее наблюдается снижение активности, при этом концентрация цистатина С повышается, достигая максимума на 5-е и более сутки. В ПМЯЛ максимум активности катепсина L приходится на 5-е сутки, в МЯЛ – на 3-и сутки.

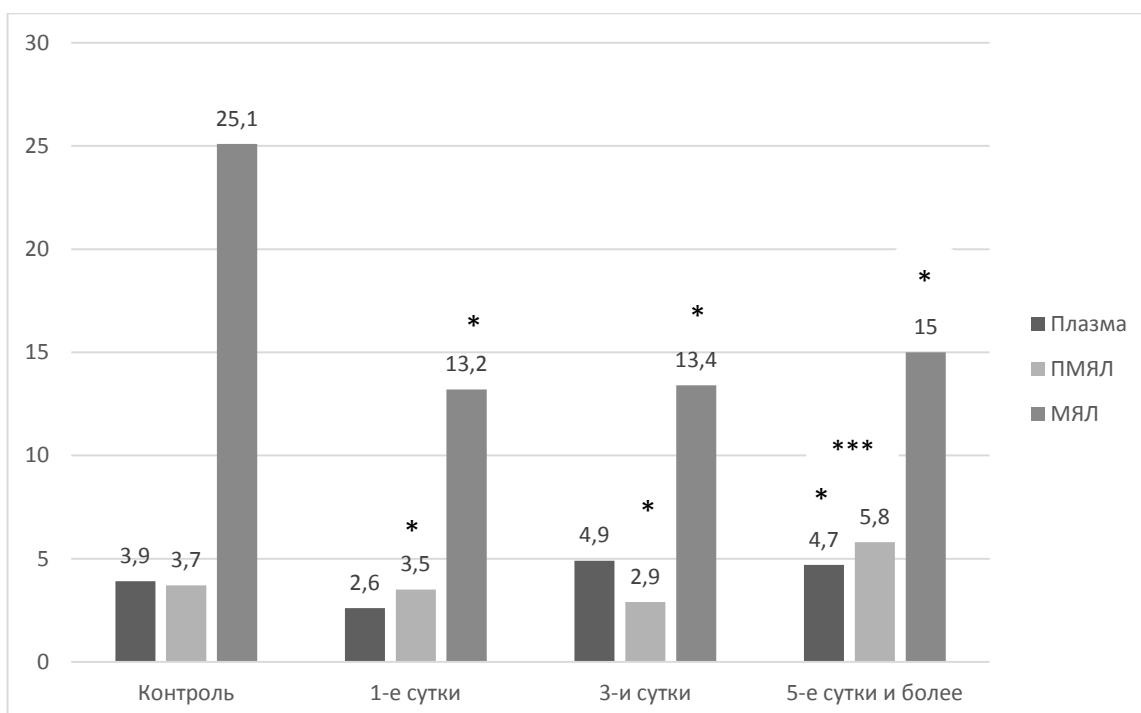


Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$), ** – статистически значимые отличия от группы 1 ($p < 0,05$); *** – статистически значимые отличия от группы 2 ($p < 0,05$).

Рисунок 4. Показатели активности катепсина L в плазме (нм/чл) и лейкоцитах крови (нмоль/ч $\times 10^6$ клеток) у пациентов с острым венозным тромбозом в динамике заболевания

Анализируя изменения активности катепсина Н в динамике, можно отметить, что в плазме его активность максимальна на третьи сутки, а в ПМЯЛ и МЯЛ – на 5 и более суток.

Концентрация цистатина С, как в ПМЯЛ, так и в МЯЛ, максимальна на 5-е и более сутки течения острого венозного тромбоза.



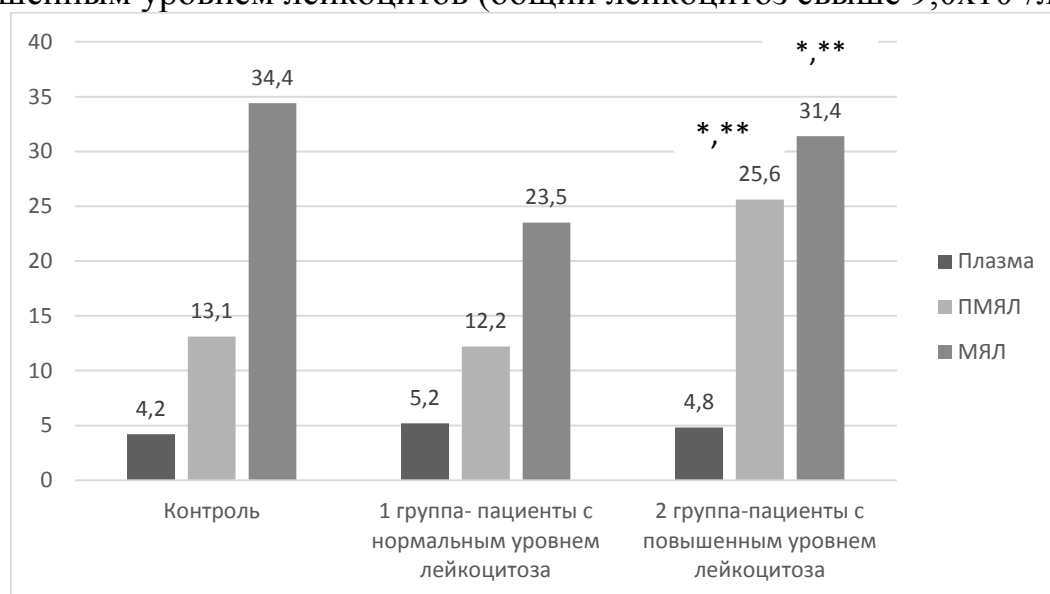
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$), ** – статистически значимые отличия от группы 1 ($p < 0,05$); *** – статистически значимые отличия от группы 2 ($p < 0,05$).

Рисунок 5. Показатели активности катепсина Н в плазме (нм/чхл) и лейкоцитах крови (нмоль/чх10⁶ клеток) у пациентов с острым венозным тромбозом в динамике заболевания

Таким образом, наибольшие изменения в показателях активности изучаемых ферментов и концентрации их эндогенного ингибитора мы наблюдаем на 3-5 и более сутки.

3.3.4. Зависимость показателей протеолиза от уровня лейкоцитоза у пациентов с острым венозным тромбозом

В процессе данного исследования все пациенты с острым венозным тромбозом были разделены на 2 группы: группа 1 – пациенты с нормальным уровнем лейкоцитов (общий лейкоцитоз до 9,0x10⁹/л), группа 2 – пациенты с повышенным уровнем лейкоцитов (общий лейкоцитоз свыше 9,0x10⁹/л).

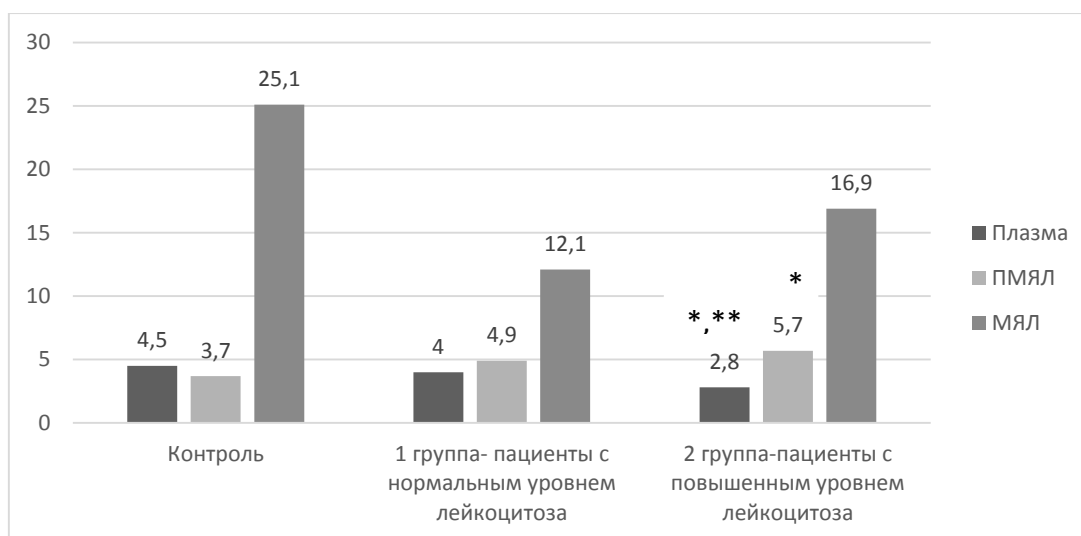


Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05); *** – статистически значимые отличия от группы 2 (p<0,05).

Рисунок 6. Зависимость активности катепсина L в плазме (нм/чхл) и лейкоцитах крови (нмоль/чх10⁶ клеток) у пациентов с острым венозным тромбозом от уровня лейкоцитоза

С нарастанием уровня лейкоцитоза активность изучаемых ферментов в плазме крови снижалась.

Причём, снижение активности катепсина Н явилось статистически значимым. В ПМЯЛ и МЯЛ крови больных острым венозным тромбозом мы обнаружили, что активность катепсина L и Н в группе 2 превышала таковую группы 1. Для катепсина L данное отличие оказалось статистически значимым в двух лейкоцитарных фракциях.



Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$),
 ** – статистически значимые отличия от группы 1 ($p < 0,05$);
 *** – статистически значимые отличия от группы 2 ($p < 0,05$).

Рисунок 7. Зависимость активности катепсина Н в плазме (нм/чхл) и лейкоцитах крови (нмоль/чх 10^6 клеток) у пациентов с острым венозным тромбозом от уровня лейкоцитоза

При корреляционном анализе, отражающем связи процессов протеолиза и выраженностью воспалительной реакции было отмечено, что наиболее выраженная положительная корреляция у пациентов с острым венозным тромбозом определяется между активностью катепсина Н в МЯЛ и концентрацией СРБ в плазме крови $r = 0,79$ ($p = 0,00002$), а также между активностью катепсина L и концентрацией сиаловых кислот в ПМЯЛ крови $r = 0,49$ ($p = 0,02$), что может явиться показателем степени выраженности воспалительного процесса при остром венозном тромбозе.

3.4. Изучение лизосомального цистеинового протеолиза в условиях моделирования экспериментального венозного тромбоза

Для более детального исследования роли цистеиновых протеиназ и регуляции их активности в динамике острого венозного тромбоза было проведено моделирование данной патологии у крыс. Согласно данным литературы и полученным нами данным в клинических исследованиях, мы предположили наличие диффузной лейкоцитарной инфильтрации стенки сосуда при остром венозном тромбозе, в связи с этим при моделировании данной патологии у крыс было принято решение включить в исследование стенку сосуда. Таким образом, материалом для изучения активности ЛЦП явились плазма и различные фракции лейкоцитов крови (таблица 4), а также стенки тромбированных и интактных вен.

Активность катепсина L в плазме крови крыс повышалась статистически значимо у крыс на первые, третьи и пятые сутки. В ПМЯЛ мы нашли статистически значимые отличия на первые сутки после моделирования венозного тромбоза. В МЯЛ активность катепсина L также повышалась на

первые и третьи сутки, но эти отличия не являлись статистически значимыми. К пятым суткам активность катепсина L в МЯЛ снизилась ниже уровня контрольных значений.

Активность катепсина Н статистически значимо повышалась в ходе экспериментального тромбоза у крыс в плазме и МЯЛ крови на первые, третьи и пятые сутки после проведённой операции. Также активность катепсина Н статистически значимо повышалась в ПМЯЛ на первые и пятые сутки экспериментального тромбоза.

Сравнивая изменения активности катепсинов L и Н, полученные в динамике острого венозного тромбоза в клинических и экспериментальных исследованиях, мы отметили однонаправленную тенденцию изменения активности изучаемых ферментов в плазме и ПМЯЛ с той лишь разницей, что пик активности для катепсина L у пациентов приходился на первые сутки, для катепсина Н - на третьи сутки, а у экспериментальных животных максимум для двух катепсинов пришёлся на пятые сутки. В ПМЯЛ максимум активности изучаемых ферментов пришёлся у пациентов на пятые сутки, у крыс - на первые.

Активность катепсинов в МЯЛ демонстрировала некоторые отличия. У пациентов мы наблюдали снижение активности изучаемых ферментов ниже контрольных значений, у крыс такое снижение наблюдалось только для катепсина L к пятым суткам. Активность же катепсина Н была максимальной на первые сутки, снизилась к пятым, но так и не достигла уровня контрольных значений.

Таблица 4

Изменение активности катепсинов L и Н в плазме (нмоль/чхл) и различных фракциях лейкоцитов крови (нмоль/чх10⁶ клеток) крыс при экспериментальном венозном тромбозе, (M±s)

Активность катепсинов	Контроль, n=6	1 сутки, n=6	3 сутки, n=6	5 сутки, n=6
Плазма крови				
L	4,98 ± 0,56	6,93 ± 0,89*	8,98 ± 1,96*	10,37 ± 1,55***
H	1,1 ± 0,68	3,18 ± 0,46*	4,08 ± 0,9*	4,45 ± 0,52*
Полиморфноядерные лейкоциты				
	Контроль	1 сутки	3 сутки	5 сутки
L	17,15 ± 4,47	29,27 ± 5,87*	22,62 ± 7,37**	25,89 ± 7,64
H	5,37 ± 1,79	12,44 ± 2,46*	10,96 ± 4,59	11,08 ± 5,05*
Моноядерные лейкоциты				
	Контроль	1 сутки	3 сутки	5 сутки
L	22,91 ± 5,66	27,95 ± 7,41	23,44 ± 5,24**	19,53 ± 8,6**
H	1,4 ± 0,29	12,31 ± 3,67*	10,36 ± 3,7*	5,74 ± 2,36*
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05);				
** – статистически значимые отличия от группы 1 (p<0,05);				
*** – статистически значимые отличия от группы 2 (p<0,05)				

Далее были изучены процессы окислительной модификации белков (таблица 5).

Таблица 5

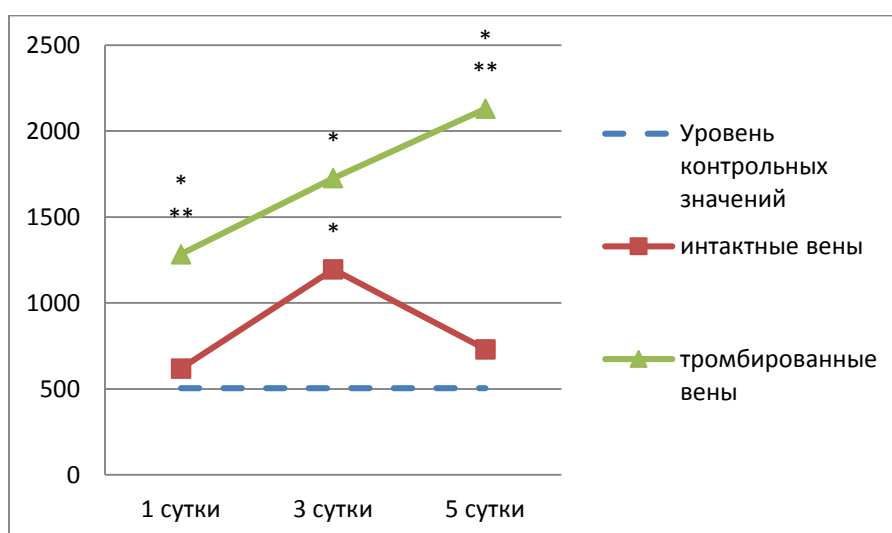
Сравнительная характеристика уровня ОМБ в плазме крови крыс при экспериментальном венозном тромбозе ед.опт.плотн./мл ($M \pm s$)

Длина волны, группы	λ 356	λ 370	λ 430	λ 530
Контрольная группа, n=6	102,3 ± 5,20	77,7 ± 3,28	24,3 ± 1,67	67,0 ± 15,48
Группа крыс с моделированным венозным тромбозом	127,5 ± 68,4	80,45 ± 43,30*	46,14 ± 6,58*	80,0 ± 53,37*

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Анализируя полученные данные, мы отметили статистически значимое повышение уровня карбонилированных белков на трёх длинах волн. Таким образом, можно сделать вывод, что процессы окислительной модификации белка в эксперименте подтвердили данные, полученные в клинических исследованиях: острый венозный тромбоз протекает на фоне повышенного карбонилирования белков.

Следующим этапом явилось изучение активности изучаемых катепсинов в стенке сосуда крыс (рисунок 8 и 9).



Примечание: * – статистически значимые отличия от контроля,

** - статистически значимые отличия от интактных вен ($p < 0,05$)

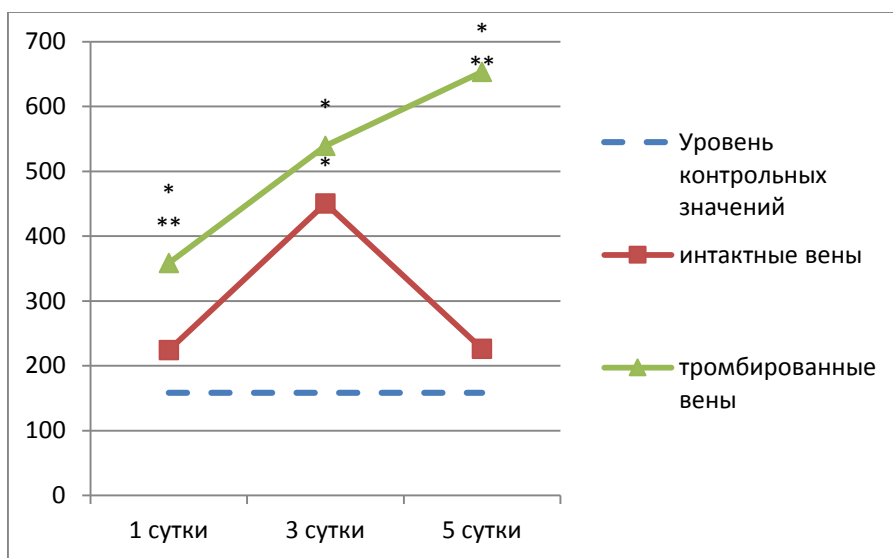
Рисунок 8. Изменение активности катепсина L в стенке тромбированных и интактных вен крыс в динамике экспериментального тромбоза на 1-е, 3-и и 5-е сутки, нмоль/чхг белка

Таким образом, лигирование общей подвздошной вены при моделировании экспериментального тромбоза приводит к статистически значимому повышению активности лизосомальных цистеиновых катепсинов L и H в стенке пораженного сосуда, начиная с 1-х суток после операции. Динамика развития экспериментального тромбоза характеризуется прогрессивным нарастанием активности изучаемых ферментов в стенке тромбированной вены к 3-м суткам и снижением к 5-м суткам.

Далее в стенке вены была проведена комплексная оценка содержания ОМБ по авторскому патенту на изобретение № 2524667 (Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А.), разработанному на кафедре биологической химии с курсом КЛД ФДПО РязГМУ Минздрава России.

Изучение процессов ОМБ в стенке тромбированных и интактных вен крыс в динамике экспериментально моделированного тромбоза позволило нам выявить следующие тенденции (таблица 6).

На первые сутки моделирования венозного тромбоза в стенке тромбированных и интактных вен отмечалось значительное достоверное повышение суммы альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ). Причём, в наибольшей степени повышались АДНФГ нейтрального характера.



Примечание: * – статистически значимые отличия от контроля,
** - статистически значимые отличия от интактных вен ($p < 0,05$)

Рисунок 9. Изменение активности катепсина H в стенке тромбированных и интактных вен крыс в динамике экспериментального тромбоза на 1-е, 3-и и 5-е сутки, нмоль/чхг белка

На третьи сутки моделирования венозного тромбоза мы отметили достоверное, по сравнению с первыми сутками, снижение суммы АДНФГ и КДНФГ в

тромбированной вене, что может свидетельствовать о переломном моменте в течении ОС при остром тромбозе и о полноценном включении факторов антиоксидантной защиты (таблица 7). В то же время интактная вена на третьи сутки демонстрирует достоверное повышение ОМБ.

Таблица 6

Изменение спонтанной ОМБ на первые сутки после моделирования венозного тромбоза, ед.опт.пл./г белка

	САДНФГн.	S ДНФГо.	S КДНФГн.	СКДНФГо.	S ОМБ
Контроль	53,08±32,30	26,74±10,70	24,72±12,46	4,07±1,37	108,61±51,45
Интактная вена	324,86±221,8*	68,54±47,3	98,10±74,57*	13,72±6,6	505,20±360,21*
Тромбированная вена	947,45±545,45**,**	280,39±191,76**,**	276,55±204,47**,**	33,66±20,41*,**	1538,10±695,65**,**
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** -статистически значимые отличия от интактной вены (p<0,05)					

Кроме того, одной из причин описываемой тенденции может оказаться обнаруженное нами ранее повышение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, так как одной из функций последних является деградация дефектных, в том числе окислительно модифицированных белков.

Таблица 7

Изменение спонтанной ОМБ на третьи сутки после моделирования венозного тромбоза, ед.опт. пл./г белка

	S АДНФГн.	САДНФГо.	S КДНФГн.	S КДНФГо.	S ОМБ
Контроль	53,08±32,30	26,74±10,70	24,72±12,46	4,07±1,37	108,61±51,45
Интактная вена	394,31±181,2*	136,46±113,5*	77,04±47,47*	31,58±19,6*	639,40±356,44*
Тромбированная вена	124,90±79,22*,**	38,38±28,95**,**	38,85±14,25	9,57±5,63**,**	211,70±120,99*,**
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), ** -статистически значимые отличия от интактной вены (p<0,05)					

Пятые сутки моделированного тромбоза сопровождались достоверным снижением продуктов ОМБ в интактной вене по сравнению с третьими сутками и с контролем и новым достоверным повышением суммы ОМБ в тромбированной вене по сравнению с третьими сутками (таблица 8). Также наибольший подъём демонстрируют АДНФГн. Возможно, новый подъём

связан с тем, что процессы организации тромба могут продолжаться до 14 суток от начала моделирования тромбоза.

Таблица 8

Изменение спонтанной ОМБ на пятые сутки после моделирования венозного тромбоза, ед.опт.пл./г белка

	S АДНФГн.	S АДНФГо.	S КДНФГн.	S КДНФГо.	S ОМБ
Контроль	53,08±32,30	26,74±10,70	24,72±12,46	4,07±1,37	108,61±5 1,45
Интактная вена	191,25±150,3 8*	0	43,62±38,36	1,97±1,77	236,84±1 88,01*
Тромбированная вена	421,58±293,6 9*,**	140,53±96,9*	124,45±118,7 *,**	19,04±10,7* ,**	705,60±4 84,2*,**
Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05), **-статистически значимые отличия от интакта (p<0,05)					

Таким образом, в настоящем исследовании нами было установлено, что процессы спонтанной окислительной модификации белков являются неотъемлемой составляющей в патогенезе острого венозного тромбоза в эксперименте и имеют динамическое развитие. На основании полученных данных можно предположить, что окисленные белки венозной стенки также являются активными участниками свободнорадикального повреждения клеток при данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Варикозное расширение вен и острый венозный тромбоз сопровождаются изменением активности катепсинов L и H: повышением – в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови, снижением – в моноядерных лейкоцитах крови. Степень изменения активности изучаемых катепсинов при варикозном расширении вен выше, чем при остром венозном тромбозе.
2. Разнонаправленное изменение активности катепсинов L и H и концентрации цистатина C в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах крови у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей может свидетельствовать о нарушении протеолитического баланса. Однонаправленное изменение активности катепсинов и концентрация их эндогенного ингибитора цистатина C у пациентов с острым венозным тромбозом свидетельствует о нормальном протеолитическом балансе при данной патологии.
3. Варикозное расширение вен нижних конечностей и острый венозный тромбоз ассоциированы с оксидативным стрессом, характеризующимся преобладанием первичных маркёров повреждения белка. Острый венозный тромбоз нижних конечностей сопровождается повышением карбонилирования

белков, варикозное расширение вен нижних конечностей – снижением карбонилирования белков.

4. Обнаружены прямые корреляционные связи: высокой степени – между концентрацией цистатина С в моноядерных лейкоцитах и особенностями клинического течения заболевания по международной классификации СЕАР $r=0,75$ ($p=0,00001$); средней степени – между активностью катепсина Н в моноядерных лейкоцитах $r=0,55$ ($p=0,005$), активностью катепсина Н в полиморфноядерных лейкоцитах $r=0,49$ ($p=0,012$) и особенностями течения заболевания по международной классификации СЕАР; а также активностью катепсина L в плазме $r=0,52$ ($p=0,008$) и ЛИИМ у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей.

5. Обнаружены прямые корреляционные связи: высокой степени – между активностью катепсина Н в моноядерных лейкоцитах и СРБ $r=0,79$ ($p=0,00002$); средней степени – между активностью катепсина L в полиморфноядерных лейкоцитах и концентрацией сиаловых кислот в плазме крови $r=0,49$ ($p=0,02$) у пациентов с острым венозным тромбозом.

6. Острый венозный тромбоз в эксперименте сопровождается изменением активности катепсинов L и Н в плазме, различных фракциях лейкоцитов крови и в гомогенатах венозных стенок. Процессы спонтанной окислительной модификации белков являются характерной составляющей в патогенезе острого венозного тромбоза в эксперименте, имеют динамическое развитие и сопровождаются изменением активности данных ферментов.

СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России:

1. **Фомина, Н.В.** Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ сыворотки крови у больных тромбофлебитом [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Р.Е. Калинин // **Астраханский мед. журн.** – 2011. – Т. 6, № 2.- С. 235 – 236. (0,13 печ.л)

2. **Фомина, Н.В.** Зависимость активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме и клетках крови больных тромбофлебитом от уровня лейкоцитоза [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // **Земский врач.** – 2012. – № 6(17). – С.38 – 40. – (Соавт.: М.А. Фомина, А.А. Царегородцев, С.А. Исаков). (0,19 печ.л)

3. **Фомина, Н.В.** Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови у пациентов с варикозным расширением вен поверхностных вен нижних конечностей различной клинической тяжести

[Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Р.Е. Калинин // **Врач – аспирант.** – 2012. – № 6.2 (55). – С. 342 – 345. (0,25 печ.л.)

4. **Фомина, Н.В.** Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови в динамике экспериментального тромбоза у крыс [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // **Фундаментальные исследования.** – 2013. – № 2. – С.197 – 200. – (Соавт.: М.А. Фомина, Р.Е. Калинин, А.А. Герасимов, А.Н. Новиков). (0,25 печ.л)

5. **Фомина, Н.В.** Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ стенки сосудов в динамике экспериментального тромбоза у крыс [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // **Вестн. НИИ им. Н.А. Пирогова.** – 2013. – Т.8, № 1. – С.73 – 76. – (Соавт.: М.А. Фомина, Р.Е. Калинин, А.А. Герасимов, А.Н. Новиков). (0,25 печ.л)

6. **Короткова, Н.В.** Лизосомальные цистеиновые катепсины L и H плазмы и лейкоцитов крови при заболеваниях вен нижних конечностей: общие тенденции изменения активности и факторов регуляции [Текст] / Н.В. Короткова, М.А. Фомина // **Современные проблемы науки и образования: Электронный журнал.** – 2014. – № 6. - Режим доступа: <http://www.science-education.ru/120-15816> (0,5 печ.л.)

7. **Фомина, Н.В.** Окислительное карбонилирование белков стенки сосудов в динамике экспериментального венозного тромбоза [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // **Ангиология и сосудистая хирургия.** – 2015. – Т. 21, № 1. – С.29 – 33. – (Соавт.: М.А. Фомина, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков). (0,4 печ. л)

Материалы научных конференций:

1. **Фомина, Н.В.** Зависимость активности катепсинов L и H в плазме крови больных тромбозом от степени окислительной модификации белков [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // **Актуальные проблемы клинической и экспериментальной патологии: межрегион. тематич. сб. науч. тр., посвящ. 110-летию смерти Пашутина Виктора Васильевича – великого патолога – патофизиолога и основателя первой школы российских патофизиологов.** – Рязань, 2011. – С.156 – 158. (0,19 печ. л.)

2. **Фомина, Н.В.** Оценка прекалитической активации катепсинов L и H в плазме крови больных тромбозом [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // **Сочетанная патология в клинической практике: сб. науч. работ по материалам конф., посвящ. юбилею Заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Гармаша Владимира Яковлевича (Рязань, 2011).** – Рязань, 2011.– С.147 – 149. (0,13 печ. л.)

3. **Фомина, Н.В.** Оценка прекалитической активации лизосомальных цистеиновых протеиназ в различных фракциях лейкоцитов и плазме крови больных тромбозом [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, В.И. Звягина // **Вестн. МГОГИ.** – М., 2011. – С. 34 – 35. (0,13 печ. л.)

4. **Фомина, Н.В.** Изменение концентрации цистатина C в сыворотке крови больных тромбозом глубоких вен нижних конечностей [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, А.И. Арапова // **Актуальные вопросы медицинской**

биохимии: сб. науч. тр. по материалам Всерос. науч. – практ. конф. «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2012). – Рязань, 2012. – С. 336 – 339. (0,19 печ. л.)

5. **Фомина, Н.В.** Оценка связи активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови с биохимическими маркёрами воспаления у больных тромбозом [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // Ветеринарные, сельскохозяйственные, биологические и химические науки: состояние и перспективы развития в XXI веке: материалы Междунар. конф. (Одесса – Лондон, 2012). – Одесса, 2012. – С.16 – 18. (0,13 печ. л.)

6. **Фомина, Н.В.** Оценка связи активности катепсинов Н и L плазмы и лейкоцитов крови со значениями лейкоцитарного индекса интоксикации при заболеваниях вен нижних конечностей [Текст] / Н.В. Фомина // Обмен веществ при адаптации и повреждении: материалы XII регион. науч. – практ. конф. с Междунар. участием (Дни лабораторной диагностики южного федерального округа) / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, С.А. Исаков. – Ростов н/Д., 2013. – С.70 – 74. (0,25 печ. л.)

7. **Фомина, Н.В.** Изучение спонтанной окислительной модификации белков в тромбированной вене крыс в динамике экспериментального венозного тромбоза [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // Материалы межрегион. науч. конф. с Междунар. участием Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.- Рязань, 2014. – С. 15 – 18. (0,19 печ. л.)

8. **Фомина, Н.В.** Окислительная модификация белков плазмы крови больных варикозным расширением вен нижних конечностей [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // Тенденции формирования науки нового времени: сб. ст. Междунар. науч. – практ. конф. (Уфа, 2014). – Уфа, 2014. – С. 278 – 281. (0,19 печ. л.)

9. **Фомина, Н.В.** Оценка окислительного карбонилирования белков при экспериментальном венозном тромбозе [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // Материалы 10-й юбил. Междунар. конф. «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии». – Пицунда (Абхазия), 2014. – С. 42. (0,06 печ. л.)

10. **Фомина, Н.В.** Оценка связи активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы крови и показателей эндотелиальной дисфункции у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // Наука молодых. – 2014. – № 1.- С.60 – 67. (0,4 печ. л.)

Патент.

1. Пат. 2524667 РФ. МПК G01N 33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов ОМБ в тканях и биологических жидкостях [Текст] / М.А. Фомина [и др.]; Ряз. гос. мед. ун-т им. акад. И.П. Павлова. – 2013102618/15; заявл.21.01.2013; опубл.27.07.2014, Бюл. № 21. – 8 с. (1,12 печ. л.)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны
АОС – антиоксидантная система
АФК – активные формы кислорода
ВБНК – варикозная болезнь нижних конечностей
КДФГ – кетондинитрофенилгидразоны
ЛЦП – лизосомальные цистеиновые протеиназы
ЛИИм – лейкоцитарный индекс интоксикации (малый)
МЯЛ – моноядерные лейкоциты
ОМБ – окислительная модификация белков
ОС – оксидативный стресс
ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
СРБ – С-реактивный белок
ТГВ – тромбоз глубоких вен
ЦС – цистатин С