

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Камилова Фэликса Хусаиновича на диссертационную работу Коротковой Натальи Васильевны «Активность катепсинов L и H при заболеваниях вен нижних конечностей», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Актуальность исследования

Ферменты с высокой субстратной специфичностью, осуществляющие селективный протеолиз, привлекают пристальное внимание, в связи с биологической значимостью и участием протеолитического процессинга в широком спектре проявлений физиологических функции. Присущее им действие в каскаде реакций регуляторных циклов и сетей характерно для процессов морфогенеза, миграции, активации иммунных и воспалительных клеток, ангиогенеза, апоптоза, регуляции клеточного цикла и др. В литературе накапливается все больше данных об их патогенетической роли, изменении уровня их экспрессии, активности при развитии заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной систем, сахарного диабета, нейродегенеративной патологии, болезней крови, суставов, печени и почек, опухолевого процесса и др. Это касается и группы лизосомальных цистеиновых протеиназ, или катепсинов, которые, как установлено сравнительно недавно, поступают и в цитозоль, и ядро клетки.

Поэтому диссертационная работа Коротковой Н.В., посвященная характеристике активности катепсинов L и H и факторов ее регуляции в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови при заболеваниях вен нижних конечностей в зависимости от тяжести воспалительной реакции и выраженности оксидативного стресса, является несомненно актуальной. Актуальность выполненных исследований определяется и отсутствием в настоящее время единого общепринятого взгляда на патогенетические механизмы повреждения венозной стенки при некоторых формах этих болезней.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы, сформулированные в диссертации Коротковой Н.В. обоснованы достаточным объемом проведенных исследований, использованием современных биохимических и клинко-лабораторных методов и аппаратуры,

статистической обработкой результатов. Теория, методология и методы исследования, представленные в работе, базируются на известных и проверяемых фактах.

Положения, выносимые на защиту, выводы диссертации определены результатами исследования, соответствуют содержанию работы, поставленной цели и задачам.

Достоверность и научная новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Результаты, полученные в диссертационной работе, а также выводы, сформулированные автором, обладают необходимой степенью достоверности и научной новизны.

В представленной работе впервые получены данные, характеризующие изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ L и H, содержание цистатина C в плазме, полиморфноядерных (ПМЯЛ) и моноядерных (МЯЛ) лейкоцитах крови у больных с варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом нижних конечностей. Полученные результаты свидетельствуют о разной выраженности активности катепсинов L и H, в исследуемых биосубстратах при заболеваниях вен нижних конечностей. Впервые проведена оценка интенсивности карбонилирования белков плазмы крови, осуществлен анализ влияния оксидативного стресса на активность катепсинов L и H, уровень цистатина C в плазме и фракциях лейкоцитов крови.

Также впервые проведен анализ корреляционной зависимости активности лизосомальных цистеиновых протеиназ L и H от клинических особенностей течения заболеваний вен нижних конечностей. Автором показано, что у пациентов с острым венозным тромбозом изменения активности катепсинов L и H в плазме крови и фракциях лейкоцитов зависят от выраженности лейкоцитоза-увеличение уровня лейкоцитоза сопровождается активацией катепсинов в ПМЯЛ, снижением активности в плазме и МЯЛ. При этом наблюдается снижение активности катепсинов L и H в сыворотке крови с увеличением лейкоцитарного индекса интоксикации. Установлены также наличие положительной сильной и средней силы корреляции между активностью катепсина L в ПМЯЛ и уровнем сиаловых кислот в плазме крови, между его активностью в МЯЛ и лейкоцитарным индексом интоксикации, уровнем цистатина C в МЯЛ и сиаловых кислот, активностью катепсина H и содержанием C-реактивного белка. Эти результаты характеризуют зависимость активности изучаемых ферментов от выраженности воспалительной реакции при остром тромбозе вен нижних конечностей.

У больных с варикозным расширением вен нижних конечностей установлена впервые прямая корреляция активности катепсина L в плазме крови с уровнем

лейкоцитарного индекса интоксикации, степени тяжести клинических симптомов варикозного расширения вен (по классификации CEAP) с активностью катепсина Н и уровнем цистатина С в МЯЛ, активностью катепсинов L и Н в плазме крови, активностью катепсина Н и в ПМЯЛ.

Диссертантом получены новые данные о характере изменений активности цистеиновых лизосомальных катепсинов L и Н, о выраженности окислительной модификации белков плазмы и сосудистой степени вен при моделировании острого венозного тромбоза у экспериментальных животных. Показано, что при экспериментальном венозном тромбозе также, как и в клинических условиях наблюдается активация изучаемых катепсинов в плазме и ПМЯЛ, но в МЯЛ в отличие от клиники обнаруживается значительная активация катепсина Н, в то время как активность катепсина L снижается. Активность изучаемых катепсинов в стенке сосудов при тромбозе существенно увеличивалась, характеризуя возможность нарастания протеолитических процессов. Карбонилирование белков сосудистой стенки выражено увеличивалась на 1-е сутки эксперимента, резко снижалась на 3-й сутки и вновь повышалась на 5-е сутки развития острого тромбоза.

Интересные и новые данные получены диссертантом и при изучении процессов аутокатализа катепсинов, позволившие высказать предположения о том, что при остром венозном тромбозе не весь имеющийся массив катепсинов L и Н в лейкоцитах находится в активной форме.

Новизну выполненных исследований подчеркивает и патент на изобретение РФ.

В целом работа выполнена на высоком методическом уровне. Используемые автором методики информативны, современны и адекватны поставленным задачам. Большой объем проведенных исследований, использование современных и классических методик, статистическая обработка полученных результатов дают основание считать полученные Коротковой Н.В. данные и сделанные на их основе выводы достоверными.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Результаты работы характеризуют участие лизосомальных цистеиновых протеиназ и ряда факторов, оказывающих влияние на их активность, при варикозном расширении вен и остром венозном тромбозе нижних конечностей. Диссертантом выявлены характер изменений их активности в зависимости от клинических особенностей течения варикозного расширения вен, взаимоотношения активности катепсинов L и Н и уровня цистатина С в плазме и фракциях лейкоцитов крови, их взаимосвязи с некоторыми

биохимическими маркерами воспаления. Эксперименты с моделированием венозного тромбоза раскрывают роль лизосомального протеолиза и окислительного карбонилирования белков сосудистой стенки пораженной и интактной вен в патохимических механизмах развития патологического процесса.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Положения, сформулированные в диссертации, могут быть использованы в проведении дальнейших исследований патохимических механизмов развития ряда заболеваний сосудистой системы, показывают возможность определения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ как биохимических маркеров в лабораторной оценке их течения. Они могут использоваться в учебном процессе по биологической химии и флебологии в учебных заведениях высшего профессионального образования медицинского профиля.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 18 таблиц и 16 рисунков. Список использованной литературы включает 299 наименований, из которых 197 зарубежных.

Введение соответствует общепринятому оформлению диссертационных работ. Автор обосновывает актуальность изучаемой темы, формулирует цель и задачи, основные положения, выносимые на защиту, трактует научную новизну, теоретическую и практическую значимость.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех частей. В первой части проведен анализ имеющихся представлений о лизосомальном цистеиновом протеолизе и его регуляции. Диссертант характеризует структуру катепсинов, особенности синтеза, активации и секреции, аутокаталитического процессинга, действие их ингибиторов, а также патогенетическую роль дисбаланса содержания цистатинов и цистеиновых лизосомальных протеиназ при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Во второй части обзора представлена подборка данных, касающихся развития оксидативного и нитрозативного стрессов как факторов, вызывающих модификацию белков, как причины нарушения функции ферментов и других протеинов. Анализ данных

литературы позволил диссертанту поставить вопрос о возможной роли активных кислородных радикалов в модификации цистеиновых протеиназ при заболеваниях сосудистой стенки. В заключительной части обзора рассматриваются вопросы участия лейкоцитов в патогенезе заболеваний вен нижних конечностей, обращая особое внимание на процесс нетоза, возрастания в нейтрофилах крови уровня карбонилирования белков при остром воспалении и участии цистеиновых катепсинов лейкоцитарного происхождения в регуляции проницаемости сосудов в очаге воспаления.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит дизайн работы и описание использованных методов. Представлена клиническая характеристика 65 обследованных больных с заболеваниями вен нижних конечностей, критерии включения и исключения их в исследование, частота выявления основных клинических симптомов, а также моделирование острого венозного тромбоза на 24 половозрелых самках крыс линии Wistar.

Диссертантом проведён большой объем биохимических исследований с использованием современных методов и аппаратуры, а также наборов реагентов известных фирм. В работе подробно описаны способы получения материала для исследований и методы изучения биохимических констант. Для статической обработки использованы параметрические и непараметрические методы.

Глава «Результаты исследования и их обсуждение» состоит из 4-х разделов. В первой показаны особенности изменения активности катепсинов L и H, уровня цистатина C у больных с варикозным расширением вен и острым венозным тромбозом в плазме крови и фракциях лейкоцитов. Автор также приводит результаты изучения процесса аутокатализа в исследуемых биосубстратах у обследованных больных. Вторая подглава посвящена описанию результатов окислительной модификации белков плазмы крови при заболеваниях вен нижних конечностей, а также изучению уровня конечных метаболитов оксида азота и оценка корреляции между показателями протеолиза и оксидативного стресса. В третьей части представлены данные, полученные при изучении выраженности лизосомального цистеинового протеолиза в зависимости от клинических особенностей течения заболевания: степени тяжести клинических проявлений варикозного расширения поверхностных вен нижних конечностей по классификации CEAP, уровня лейкоцитарного индекса интоксикации, а также выраженности лейкоцитоза, уровней лейкоцитарного индекса интоксикации, С-реактивного белка и сиаловых кислот у больных с острым венозным тромбозом в динамике его развития. Обсуждается в данной части работы и результаты выявления корреляции между изучаемыми показателями. Четвёртая часть характеризует данные изучения динамики изменений лизосомального цистеинового

протеолиза (активности катепсинов L и H, активности их аутокатализа), уровня окислительной модификации белков в плазме крови и фракциях полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов при экспериментальном венозном тромбозе. В этой же подглаве описаны результаты определения активности катепсина L, катепсина H и выраженности окислительной модификации белков стенки тромбированной и интактной вен экспериментальных животных в динамике развития (1,3 и 5 сутки) при моделировании венозного тромбоза.

В главе «Заключение» диссертант обобщает полученные результаты, сопоставляет данные клинических и экспериментальных исследований.

Диссертация завершается выводами, которые вытекают из результатов исследования, соответствуют цели и задачам диссертации. По результатам диссертации опубликовано 17 печатных работ, 7 из них в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации основных положений диссертационных работ. Материалы диссертации доложены на международных, российских и региональных конференциях. Диссертант является также соавтором патента РФ.

Автореферат диссертации и научные публикации Н.В. Коротковой полностью соответствуют содержанию диссертационного исследования и отражают основные положения работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация оформлена согласно требованиям, замечаний по оформлению работы нет. В целом она представляет собой завершённый научный труд, характеризующий активность цистеиновых лизосомальных протеиназ L и H, характер зависимости их активности от ряда факторов регуляции и особенностей клинических проявлений заболеваний вен нижних конечностей. Работа выполнена на достаточно высоком уровне с использованием современных биохимических методов. Диссертация содержит новые научные сведения и значима для медицины.

Проведённый анализ позволяет заключить, что представленная работа содержит достаточный для диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук объём исследований, позволяющий получить обоснованные и правомочные научные положения и выводы.

Замечания по диссертационной работе

В целом, положительно оценивая диссертацию Н.В. Коротковой, хотелось бы высказать ряд замечаний и задать вопросы, имеющие уточняющий или дискуссионный характер.

Имеются замечания стилистические. Например, на стр. 9 «... обнаружена прямая корреляция высокой степени между активностью катепсина Н в МЯЛ и классификацией СЕАР». Не может быть корреляции с классификацией, а с тяжестью клинических проявлений по классификации СЕАП. Стр. 71 «... увеличение синтеза продуктов деградации оксида азота», лучше увеличение уровня продуктов деградации NO. В положении 3, выносимого на защиту, идёт констатация фактов корреляции без обобщающего указания о зависимости изменений активности изучаемых катепсинов от тяжести воспалительной реакции при заболеваниях вен нижней конечности.

Вопросы:

1. В своей работе Вы используете термин протеолитический баланс, сопоставляя изменения активности катепсинов и уровня цистатина С. Может быть стоило провести корреляционный анализ этих показателей.
2. Как Вы трактуете различную динамику (нередко разнонаправленную) изменений активности двух изучаемых катепсинов L и H в разных биосубстратах (плазма, ПМЯЛ и МЯЛ) при патологии вен нижних конечностей?
3. Вами установлен интересный феномен — двукратное повышение активности катепсинов в стенке интактной вены на 3-и сутки экспериментального венозного тромбоза с последующим снижением на 5-е сутки наблюдения. С чем связано это изменение активности? Системная воспалительная реакция как у больных острым тромбозом или что-то другое?
4. При характеристике результатов определения окислительной модификации белков сосудистой стенки после моделирования венозного тромбоза Вы неоднократно говорите о переломном моменте в течении оксидативного стресса с полноценным включением факторов антиоксидантной защиты. Поясните, пожалуйста, что Вы подразумеваете под полноценным включением факторов антиоксидантной защиты.

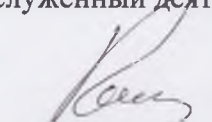
Заключение

Таким образом, диссертационное исследование Коротковой Натальи Васильевны на тему: «Активность катепсинов L и H при заболеваниях вен нижних конечностей»,

представленное на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 — биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи, по характеристике активности цистеиновых лизосомальных протеиназ при болезнях вен нижних конечностей, имеющей существенное значение для медицины и биологической химии.

Диссертация Коротковой Н.В. соответствует требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявленным к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 — биохимия.

Официальный оппонент

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  Камиллов Фэликс Хусаинович.

Адрес: ГБОУ ВПО «Башкирский государственный
медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3.
Тел.: Ректорат — 8 (347) 272-41-73;
кафедра — 8 (347) 272-66-07, e-mail: bx-bgm@yandex.ru

Подпись д.м.н. Камиллова Ф.Х. заверяю

Учёный секретарь ГБОУ ВПО «БашГМУ»
Министерства здравоохранения РФ

« 16 » октября 2015 г.

