

ОТЗЫВ

**официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича
на диссертацию
Адашевой Дарьи Алексеевны на тему «Роль протеазы PAPP-A в
сердечной ткани в норме и при гипертрофии», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.4. Биохимия**

Актуальность избранной темы. Хорошо известно, что и на сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются главной причиной смертности в мире. Одним из наиболее распространенных ССЗ является сердечная недостаточность (СН) – заболевание, характеризующееся расстройствами в работе сердца, приводящими к нарушению кровоснабжения всего организма. Зачастую хроническая СН сопровождается патологической гипертрофией миокарда. Одним из протеолитических ферментов, чья активность ассоциирована с развитием ССЗ, является ассоциированный с беременностью белок А плазмы крови, PAPP-A (pregnancy associated plasma protein-A). PAPP-A представляет собой металлопротеазу, которая располагается на внешней мембране или секретируется различными клетками организма человека. Одной из биологических функций PAPP-A является регуляция биодоступности инсулиноподобных факторов роста I и II (IGF). Данные факторы являются составляющими IGF-сигнальной системы, функционирование которой вовлечено в пролиферацию и поддержание жизнеспособности различных клеток и тканей организма. В эту систему кроме соответствующих рецепторов для этих факторов входят шесть типов IGF-связывающих белков IGFBP (IGFBP 1-6), которые взаимодействуют с IGF-I и IGF-II и таким образом ингибируют их доступность для рецепторов. Высвобождение лигандов из комплексов с IGFBP происходит благодаря протеазам, которые

специфически расщепляют белки IGFBP в комплексе IGF-IGFBP и делают возможным взаимодействие молекул IGF с их рецепторами и запуск соответствующих сигнальных каскадов, опосредующих их биологическое действие. PAPP-A в физиологических условиях является единственной протеазой, способной расщеплять IGFBP-4. В результате данной протеолитической реакции высвобождается IGF и образуются два протеолитических фрагмента IGFBP-4: N-концевой (NT-IGFBP-4) и C-концевой (CT-IGFBP-4). В настоящее время эти фрагменты рассматриваются как прогностические биомаркеры различных ССЗ, и, в частности, СН. Повышение уровня фрагментов IGFBP-4 в крови ассоциировано с возрастанием риска развития острого коронарного синдрома у пациентов с ишемической болезнью сердца и повышением риска летального исхода у больных диабетом 1 типа. Также было показано, что у больных острой сердечной недостаточностью CT-IGFBP-4 является прогностическим маркером риска летального исхода. Повышение уровня протеолитических фрагментов IGFBP-4 может свидетельствовать об усилении PAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 и повышении концентрации IGF в примембранном пространстве клетки при развитии различных патологий миокарда. В зависимости от концентрации IGF может выступать как кардиопротектор или как индуктор патологического состояния сердца, в частности гипертрофии. Поэтому тонкая регуляция концентрации IGF в примембранном пространстве кардиомиоцитов чрезвычайно важна как для нормального функционирования сердца, так и для развития адаптивных реакций при патологических изменениях миокарда. Однако, несмотря на множество исследований, показывающих повышение концентрации фрагментов IGFBP-4 в крови пациентов при развитии ССЗ, до сих пор не известно, происходит ли протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A в сердечной ткани в норме. Таким образом, исследование роли PAPP-A и механизма регуляции биодоступности IGF в сердечной ткани в норме и при гипертрофии является актуальной задачей как с прикладной

биомедицинской, так и с фундаментальной точек зрения. Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Адашевой Дарьи Алексеевны, посвященная исследованию роли протеазы RAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии **является безусловно актуальной и востребованной в настоящее время, а степень обоснованности положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.**

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 305 библиографических ссылок. Работа изложена на 200 страницах печатного текста, содержит 31 рисунок и 1 таблицу. Кроме того, диссертация включает в себя благодарности и список принятых сокращений.

Глава «Введение» посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту, приведен список опубликованных по теме диссертации работ.

Глава «Обзор литературы» состоит из шести основных разделов. В первом разделе автор приводит информацию об основных типах клеток сердца и их функций. В следующем разделе приводятся сведения об некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях и наблюдаемых патологических изменениях, возникающих в миокарде и сосудах. Далее разбираются методические подходы к исследованию патологической гипертрофии как в моделях *in vitro*, так и *in vivo*. Затем автор подробно описывает систему инсулиноподобных факторов роста (IGF) и связывающих их белков (IGFBP) и её роль в сердечной ткани в норме. Далее автор совершенно логично переходит к рассмотрению специфических протеаз, расщепляющих IGFBP и таким образом регулирующих биодоступность IGF

к клеткам сердечной мышцы. При этом основное внимание сосредоточено на протеазе PAPP-A. Следующий раздел посвящен роли IGF-сигнального пути в развитии патологических процессов в миокарде. При этом акцент сделан на тех компонентах IGF-сигнального пути, которые могут служить биомаркерами при диагностике ССЗ. В последнем разделе автор приводит известные на настоящий момент времени данные о кардиопротекторной роли IGF в сердечной ткани. В целом обзор написан достаточно подробно, с привлечением источников литературы последних лет и, на мой взгляд, достаточно хорошо иллюстрирован (10 рисунков). Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа.

В главе «Материалы и методы» автор подробно описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Для решения поставленных задач был выбран адекватный набор современных методов иммунологии, молекулярной и клеточной биологии: выделение первичной культуры кардиомиоцитов из сердец неонатальных крыс, получение культуры кардиомиоцитов человека из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), получение первичной культуры кардиомиоцитов из взрослых крыс, определение площади кардиомиоцитов, индукция гипертрофического ответа кардиомиоцитов под действием эндотелина-1 и норадреналина, индукция гипертрофии сердца под действием монокроталина, проточная цитофлуориметрия, иммуноцитохимическое окрашивание культур кардиомиоцитов, протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A в полученных культурах и в кондиционированной среде кардиомиоцитов методом флуороиммунного анализа «сэндвич»- типа (ФИА), Измерение концентрации натрийуритического пептида В в кондиционированной среде кардиомиоцитов методом ФИА, измерение концентрации димерного PAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов, дифференцированной из ИПСК методом ФИА, Отдельный подраздел посвящен статистической обработке результатов. В целом

материал, изложенный в этой главе, свидетельствует о методической подготовленности автора к решению задач настоящей работы.

В главе «Результаты» автор последовательно излагает полученные результаты. Важнейшее внимание уделено моделированию функционирования сердечной ткани (кардиомиоцитов), основным возможностям и ограничениям используемых в работе моделей. Подробно описаны особенности протекания протеолиза IGFBP-4, ассоциированного со специфической активностью PAPP-A в культурах кардиомиоцитов в норме, а затем и в условиях индукции гипертрофии в этих клетках. Опять же большое внимание уделено автором особенностям индукции и моделированию гипертрофии как *in vitro*, так и *in vivo*. Приводятся приоритетные данные свидетельствующие о повышении уровня протеолиза IGFBP-4, ассоциированного со специфической активностью PAPP-A. К безусловной заслуге автора следует отнести использование нескольких модельных систем, основанных на применении кардиомиоцитов крысы (как новорожденных, так и взрослых животных), а также кардиомиоцитов человека, полученных при направленной дифференцировке соответствующих ИПСК. В целом этот раздел производит приятное впечатление последовательным изложением материала и хорошо иллюстрирован.

В главе «Обсуждение результатов» автор последовательно обсуждает полученные результаты с привлечением данных опубликованных другими исследователями. В частности, большое внимание уделено обсуждению получения и характеристике культур кардиомиоцитов, полученных от новорожденных и взрослых крыс, а также кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, для исследования протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в норме. Автор критически оценивает достоинства и недостатки используемых в работе клеток. Такая же критическая оценка дается диссертантом и различным моделям гипертрофии кардиомиоцитов. Данная глава свидетельствует о способности автора всесторонне анализировать полученные результаты.

В главе «Заключение» автор подводит итоги проведенной работы и отмечает перспективность разработанных подходов и моделей для дальнейших исследований. Автор справедливо отмечает, что усиление RAPP-A зависимой протеолитической деградации IGFBP-4 связано с гипертрофическими изменениями миокарда, что, в свою очередь, проясняет роль протеазы RAPP-A в здоровой сердечной ткани и при её гипертрофических изменениях. Установленный механизм усиления протеолитической деградации IGFBP-4 под действием RAPP-A при гипертрофии, открывает широкие возможности для изучения новых механизмов развития ССЗ, которые сопровождаются развитием патологической гипертрофии миокарда.

Основные полученные результаты и их оригинальность.

Адашевой Д.А. разработаны и охарактеризованы три модельные системы на основе культур кардиомиоцитов, полученных от новорожденных и взрослых крыс, а также кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, для исследования протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в норме. Автором впервые было показано, что в норме в культурах кардиомиоцитов протекает RAPP-A зависимый протеолиз IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде. Также разработаны и охарактеризованы три модельные системы на основе полученных культур кардиомиоцитов, переведенных в гипертрофированное состояние *in vitro* под действием эндотелина-1 и норадреналина и *in vivo* под действием монокроталина. С использованием этих систем было впервые показано, что в независимости от используемого типа клеточной культуры и способа моделирования гипертрофического ответа, гипертрофия сопровождается усилением протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A. Таким образом, результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы являются новыми и оригинальными.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая и фундаментальная значимость настоящей работы заключается в получении новых и приоритетных данных относительно роли матричной металлопротеазы RAPP-A как одного из регуляторов биодоступности IGF в сердечной ткани в норме и при гипертрофии, а, с другой стороны, открывают новые возможности для создания терапевтических подходов для лечения ССЗ, связанных с гипертрофическими изменениями миокарда, основанных на поддержании постоянной (нужной организму) концентрации IGF. Кроме того, полученные данные предоставляют возможность исследовать ранее не изученные механизмы развития сердечно-сосудистых патологий. Полученные автором результаты могут быть использованы при чтении лекций по биохимии и клеточной биологии на Биологическом факультете и Медицинском факультете МГУ им. М. В. Ломоносова, а также ряде медицинских университетов.

Степень достоверности полученных результатов не вызывает сомнений. Постановка цели и задач данного исследования, а также выбор методик и протоколов, необходимых для решения поставленных задач, основаны на анализе современных публикаций по теме исследования. Достоверность представленных результатов обусловлена воспроизводимостью измерений, проведенных в необходимом количестве биологических повторностей. Постановка всех проведённых экспериментов проводилась в соответствии с современными правилами проведения научных исследований: постановка контрольных экспериментов с учётом специфики выполняемой работы, статистическая обработка результатов с использованием подходящих критериев для каждого типа полученных экспериментальных данных.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется.

Ряд вопросов и пожеланий автору приведен ниже. Автору следовало бы привести doi для статей в списке литературы, что помогает более быстро найти интересующую статью.

1. Стр. 13 и стр 76 повторение целей и задач работы можно избежать и привести их только во введении.
2. Стр. 80. Следовало указать плотность посева клеток. Тоже самое касается и подраздела 1.2.
3. Стр. 83-84. Разве автор не проводил отделение остатков клеток и мембран после ультразвуковой обработки и замораживания для дальнейшего определения белка?
4. Стр. 84. (2.1.) Если автор использует известный метод, то следует дать ссылку на первоисточник. Из описания данной методики остается непонятным, каким образом данный метод позволяет оценивать жизнеспособность клеток.
5. Стр. 85. Остается загадкой концентрация хлористого кальция, необходимого для проведения реакции.
6. Стр. 121 и 124. «Также важно отметить, что при концентрации эндотелина-1 100 нМ наблюдается значительное снижение жизнеспособности клеток через 24 часа. Это связано с цитотоксическим эффектом эндотелина-1, подтверждённым в ранее опубликованных исследованиях». Рис 24. Для ИПСК токсический эффект эндотелина-1 наблюдается и при более низких концентрациях.
7. Стр. 129. Рис. 27. Хотелось бы понимать через сколько часов после получения кардиомиоцитов проводили данные эксперименты.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ. Результаты работы были представлены на 6 симпозиумах и конференциях, как российских, так и международных.

Закключение. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.4. Биохимия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о Совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Адашева Дарья Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярной
нейрогенетики и врожденного иммунитета
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Гривенников Игорь Анатольевич

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д.2, Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт») тел.: 8499-1960014, e-mail:

Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация: 1.5.3. – молекулярная биология; 3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология.

Подпись Гривенникова И.А. заверяю,
Главный Ученый секретарь
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

О.А. Алексеева

«_____» марта 2025 г.