

**ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Адашевой Дарьи Алексеевны
на тему: «Роль протеазы RAPP-A в сердечной ткани в норме и при
гипертрофии»
по специальности 1.5.4. Биохимия**

Настоящая диссертационная работа посвящена исследованию ассоциированного с беременностью белка А плазмы крови, RAPP-A, который может выступать в качестве потенциального маркера сердечно-сосудистых заболеваний. RAPP-A был обнаружен в 1974 году в плазме беременных женщин. Далее было показано, что уровень RAPP-A в сыворотке матери снижается в первом триместре беременности при синдроме Дауна. Сейчас это широко используется в пренатальной диагностике. В целом, некоторые другие неблагоприятные исходы беременности (задержка внутриутробного развития и преэклампсия, низкий вес при рождении) также коррелируют с пониженным уровнем RAPP-A. Это указывает на значимость RAPP-A в регуляции развития организма и физиологических процессов.

Ферментативная активность RAPP-A была впервые установлена в 1999 году, и стало ясно, что основная функция этого белка связана с регуляцией процессов роста и анаболизма. RAPP-A - эта высокоспецифичная Zn^{2+} -зависимая металлопротеиназа, которая может связываться с гликозаминогликанами на клеточных мембранах и расщеплять IGFBP - белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (IGF), освобождая IGF в среду в непосредственной близости от соответствующего рецептора на клеточной поверхности. Следовательно, протеаза RAPP-A действует как локальный усиливающий рост сигнальный фермент. Предполагается, что IGFBP-4, связывающий IGF I и II, является основным субстратом для RAPP-A. Причем уникальным свойством является то, что специфичность RAPP-A к IGFBP-4 сильно возрастает в присутствии IGF. Важно отметить, что нокаут RAPP-A у мышей ведет к карликовости и фенотип у нокаутных мышей напоминает тот, что возникает при нокауте гена IGF-II. Таким образом,

РАРР-А является важным компонентом системы IGF и регулирует процессы роста.

Известно, что РАРР-А широко представлен в тканях, однако активность этого фермента до сих пор не была продемонстрирована в сердце и кардиомиоцитах. Нет достаточных сведений об изменении связанной с РАРР-А ферментативной активности при гипертрофических изменениях в сердце. Также остается неизвестной функциональная роль РАРР-А в сердце. Таким образом, представленная работа является поисковой и новаторской, нацеленной на оценку роли РАРР-А в сердце в норме и при патологии, в частности гипертрофии.

Положения работы обоснованы и подкреплены аккуратно проанализированным экспериментальным материалом. Выводы полностью соответствуют полученным результатам, и представляют собой новое знание важное для фундаментальной науки и имеющие практический аспект в кардиологии и клинической биохимии. Основные результаты работы полностью опубликованы в авторитетных изданиях. Диссертация и автореферат написаны доступным языком, и оформлены аккуратно, в диссертации приведен исчерпывающий обзор литературы. Диссертационная работа имеет классическое построение и хорошо иллюстрирована. Методы изложены полно и позволяют воспроизвести полученные результаты сторонними группами. Результаты работы представлены на отечественных и международных конференциях.

В работе были использованы три клеточные модели (культура кардиомиоцитов, полученная из неонатальных крыс; культура кардиомиоцитов человека, полученная из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК); первичная культура кардиомиоцитов, полученная из сердец взрослых крыс), каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки, и одновременное их использование позволяет получить более достоверную картину изменений. Культуры были охарактеризованы и плотность кардиомиоцитов была оценена в каждой культуре. С помощью

флуороимунного анализа «сэндвич»-типа была проведена оценка димерной формы PAPPA в культурах кардиомиоцитов человека. Это впервые указало на способность кардиомиоцитов экспрессировать PAPPA.

Далее была выявлена протеолитическая активность PAPPA в культурах миоцитов, для этого детектировали продукты расщепления экзогенного IGFBP-4 (NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4) методом ФИА «сэндвич-типа». Образование фрагментов в среде без добавления экзогенного IGFBP-4 не было обнаружено, указывая на отсутствие его продукции культурами миоцитов. Было обнаружено, что культуры обладают различной способностью расщеплять IGFBP-4: неонатальная культура кардиомиоцитов и культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК имели относительно высокую активность, а вот в культуре взрослых кардиомиоцитов гидролиз протекал с низкой интенсивностью. IGF-II значительно усиливал PAPPA-опосредованный гидролиз IGFBP-4 во всех культурах, тогда как связывание ионов кальция и цинка экзогенными хелаторами ингибировало реакцию. Анализ каталитической активности PAPPA во внеклеточном растворе и на поверхности клеток показал, что фермент активен и на клеточной мембране кардиомиоцитов, и в растворе.

Использование моделирования гипертрофии сердца в культурах миоцитов с помощью эндотелина 1 (наномолярные концентрации) и норадреналина (микромолярные концентрации), а также монокроталин-индуцированной модели *in vivo* позволили оценить активность PAPPA в патологических условиях. Оказалось, что в данных моделях патологий протеолиз IGFBP-4 происходил усиленно, что может не коррелировать с уровнем PAPPA в среде. Следовательно, должны существовать тканеспецифичные механизмы регуляции активности PAPPA.

При прочтении диссертации возникли вопросы дискуссионного характера.

Вопросы:

1) Какая часть фермента PAPP-A в плазме крови может быть связана с его выделением кардиомиоцитами? Можно ли оценить “сердечную” фракцию PAPP-A исходя из данных текущей работы?

2) Какие условия (гормональные сигналы, паракринные агенты) могут действовать однонаправленно и разнонаправленно на продукцию IGFs и PAPP-A?

3) Каков механизм инактивации PAPP-A в организме и отдельной клетке?

4) Как изменяется число миоцитов при инкубировании с эндотелином 1 и норадреналином? Если ли индукция апоптоза в этих условиях?

5) Почему была выбрана модель гипертрофии правого желудочка, а не левого?

6) Почему уровни PAPP-A растут при моделировании гипертрофии в культуре с помощью 5 мкМ норадреналина, но не норадреналина в концентрации выше и ниже?

7) Сравните, пожалуйста, потенциальную диагностическую ценность детекции фрагментов расщепления IGFBP-4 и уровня фермента PAPP-A в плазме, с имеющимися на сегодняшний день подходами диагностики гипертрофических изменений в сердце?

8) Может ли PAPP-A функционировать в качестве эндоцитозного рецептора для IGFBP-4 и, таким образом, гидролизовать часть IGFBP-4 в эндосомальных компартментах клеток?

Заключение

Вместе с тем, указанные вопросы не умаляют значимости диссертационного исследования. 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 (по биологическим наукам).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов
Казанского института биохимии и биофизики –
структурного подразделения Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской академии наук»
Петров Алексей Михайлович _____»

подпись

Дата подписания

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.02 Биофизика; 03.03.01 Физиология

Адрес места работы:

420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, д.
2/31, а/я 261. Лаборатории биофизики синаптических процессов КИББ ФИЦ
КазНЦ РАН
Телефон: +7 (843) 292-72-99; e-mail: alexey.petrov@kazangmu.ru

Подпись сотрудника КИББ ФИЦ КазНЦ РАН А.М. Петрова удостоверяю: