

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Куренковой Анастасии Дмитриевны на тему: «Влияние пролил-глицил-пролина (PGP) и его ацетилированной формы (N-АсPGP) на развитие ишемического повреждения миокарда у крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа А.Д. Куренковой посвящена изучению влияния эндогенных пептидов пролил-глицил-пролина (PGP) и его *N*-ацетилированного производного (*N*-АсPGP) на активацию и секреторную активность тучных клеток, а также морфологические, гемодинамические и др. функциональные показатели работы сердца после экспериментально-вызванного инфаркта миокарда. Эта работа является продолжением начатых ранее на факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова исследований, направленных на выяснение механизмов модулирующего действия глипролинов на воспалительные процессы, ассоциированные с различными патологиями. При этом особое внимание в этих исследованиях уделялось роли тучных клеток в патологическом воспалении. Имеющиеся в литературе сведения касаются в основном исследования провоспалительных эффектов PGP и *N*-АсPGP, опосредованных нейтрофилами, при некоторых хронических заболеваниях легких. При этом выдвинуто несколько альтернативных гипотез о предполагаемых механизмах провоспалительного действия этих пептидов. Противовоспалительные эффекты глипролинов менее изучены. Также до сих пор не выявлены конкретные молекулярные мишени про-/противовоспалительного действия глипролинов. Актуальность данной диссертационной работы обусловлена тремя обстоятельствами: чрезвычайно важной ролью воспаления в патогенезе острого ишемического повреждения миокарда, достаточно неоднозначной ролью в этом процессе тучных клеток и, наконец, потенциальной возможностью накопления эндогенных

глипролинов в очаге повреждения. Изучение роли эндогенных регуляторных пептидов (матрикинов и глипролинов) в регуляции воспалительных процессов, сопутствующих развитию ишемического повреждения миокарда и процессам регенерации ткани, также, как и выяснение фармакологических эффектов синтетических аналогов данных пептидов на эти процессы, могут служить основой для разработки новых подходов в фармакотерапии инфаркта миокарда.

Новизна исследований и полученных результатов

В диссертационной работе А.Д. Куренковой впервые предпринята попытка комплексно изучить фармакологические эффекты пептидов PGP и *N*-AcPGP на провоспалительные процессы, связанные с активацией тучных клеток, и на развитие ишемических повреждений миокарда в модели необратимой ишемии (окклюзия левой ветви коронарной артерии). Автором впервые была продемонстрирована способность *N*-AcPGP в наномолярных концентрациях снижать секрецию гистамина изолированными перитонеальными тучными клетками, а также препятствовать увеличению проницаемости сосудов кожи. Причем *N*-AcPGP оказывал более сильное стабилизирующее действие на изолированные тучные клетки по сравнению с его немодифицированным прототипом. Несмотря на то, что PGP и *N*-AcPGP демонстрировали аналогичное действие на тучные клетки миокарда после воспроизведения необратимой ишемии сердечной мышцы, влияние этих пептидов на развитие ряда патологических процессов в данной модели сильно различалось. В частности, показано, что *N*-AcPGP (но не PGP) способен усиливать патологические проявления инфаркта миокарда (усиление фиброза, увеличение размера инфаркта и смертности животных). Также в работе было установлено, что динамика развития ряда патологических нарушений при инфаркте миокарда у крыс в значительной степени зависит от исходного уровня активности вегетативной нервной системы. При этом PGP и *N*-AcPGP оказывали различное влияние на ритм

сердца и некоторые гемодинамические показатели у крыс с исходно низким / высоким уровнем вариабельности ритма сердца (BPC).

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа А.Д. Куренковой значительно расширяет наши представления о потенциальных регуляторных и фармакологических свойствах эндогенных глипролинов (PG, GP, PGP, *N*-AcPGP), связанных (свойствах), в частности, с их влиянием на опосредованные тучными клетками воспалительные процессы, вызываемые ишемическими повреждениями миокарда. Выявлена взаимосвязь между стабилизирующим действием глипролинов на тучные клетки и их способностью предотвращать развитие дизрегуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} . Сделано предположение, что образование эндогенного *N*-AcPGP в результате деградации белков внеклеточного матрикса, потенциально может оказывать негативное влияние на развитие патологических процессов при инфаркте миокарда. Полученные результаты также важны с практической точки зрения, так как многие пептиды группы глипролинов в настоящее время рассматриваются в качестве перспективных фармакологических агентов для лечения ряда заболеваний, сопровождаемых острым или хроническим воспалением.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа А.Д. Куренковой составлена по традиционному плану, включающему введение и следующие главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Литература». Работа изложена на 117 страницах машинописного текста и содержит 5 таблиц и 47 рисунков. Список цитируемой литературы состоит из 135 источников.

Во **введении** описана фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа и обоснована ее актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, теоретическая и практическая значимость работы, а

также перечислены основные положения, выносимые на защиту. Помимо этого, во введении приведены сведения об основных подходах и методах исследования, публикациях по результатам работы, апробации результатов и о личном вкладе автора.

Обзор литературы включает пять тематических разделов, в которых автором достаточно полно и глубоко изложены теоретические основы тех явлений, с которыми непосредственно сталкивается диссертант в своих экспериментальных исследованиях. Это, прежде всего, разделы «1.2. Тучные клетки и их роль в воспалении» и «1.3. Воспалительный ответ при инфаркте миокарда и роль тучных клеток в регуляции процесса». При этом автором также детально рассмотрено состояние исследований в ряде узкоспециализированных направлений исследований, касающихся, например, влияния глипролинов на развитие воспалительного процесса в тканях при ряде патологий (раздел 1.1.) и изменений variability ритма сердца и особенностей вегетативной регуляции сердца при инфаркте миокарда (раздел 1.4.). В обзоре также описаны методические подходы, используемые для оценки variability ритма сердца и гемодинамических показателей в клинической и экспериментальной практике.

Несомненно, проделанная автором теоретическая работа с литературой способствует лучшему пониманию сути диссертационной работы и затрагиваемых в ней научных аспектов. Обзор изложен лаконичным научным языком, доступен для понимания неспециалистов и может быть весьма полезен для исследователей, начинающих работу в данной области. Обзор проиллюстрирован великолепными рисунками и схемами, что значительно облегчает его восприятие. Следует отметить, что значительное число использованных автором источников литературы приходится на последние 10 лет.

Глава «**Материалы и методы**» содержит полный список использованных реагентов и исчерпывающее описание методов исследования. Приведенные в ней методики описаны настолько подробно,

что могут быть легко воспроизведены в других исследованиях. Используемые автором экспериментальные модели и подходы полностью соответствуют поставленным в работе целям и задачам, что позволило автору достаточно полно охарактеризовать эффекты пептидов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Примененные в работе методы статистического анализа позволяют адекватно оценивать достоверность наблюдаемых различий между сравниваемыми экспериментальными группами / выборками.

Глава «**Результаты**» содержит 7 разделов. Учитывая использованные в работе методические подходы и решаемые задачи, все проведенные автором исследования можно условно разделить на три части, *первая* из которых посвящена изучению влияния PGP и N-AsPGP и их синтетических аналогов на секреторную активность перитонеальных тучных клеток крыс и опосредуемую ими проницаемость сосудов, *вторая* – изучению роли парасимпатического и симпатического отделов вегетативной нервной системы в регуляции гемодинамики крови и вариабельности ритмов сердца (BPC) в норме и после необратимой ишемии миокарда левого желудочка и *третья* – изучению кардиопротекторных и других фармакологических эффектов PGP и N-AsPGP у крыс инфарктом миокарда, характеризующихся с разными исходными уровнями BPC.

В первой части работы автором было установлено, что пептид N-AsPGP при достаточно низких концентрациях (3×10^{-10} – 6×10^{-5} М), наряду с PGP, способен эффективно снижать стимулированную синактеном (аналог АКТГ) секрецию гистамина изолированными перитонеальными тучными клетками крысы. Автором были получены убедительные данные, указывающие на то, что эти эффекты PGP и N-AsPGP, по всей видимости, опосредованы их влиянием на гомеостаз ионов Ca^{2+} в клетке. Способность обоих пептидов уменьшать активацию и дегрануляцию тучных клеток также была выявлена на модели инфаркта (необратимой ишемии) миокарда, и в тесте на опосредованное тучными клетками патологическое увеличение

проницаемости сосудов кожи. Аналогичные активности проявлял и ряд их структурных аналогов – ди-, три- и тетрапептидов. Ключевым требованием было наличие в структуре пептида N- или C-концевых последовательностей – PG и GP, соответственно. Вместе с тем замена остатков Pro или Gly на другие аминокислотные остатки приводила к потере стабилизирующего тучные клетки действия аналогов PGP, что указывает на определенную специфичность наблюдаемых эффектов. Однако к высказываемому автором тезису об аллостерической модуляции потенциальных молекулярных мишеней как возможному механизму действия исследуемых трипептидов на клетки (в данном случае на тучные клетки) следует отнестись с осторожностью, так как до сих пор не было получено убедительных экспериментальных доказательств этого.

Во второй части работы автором аргументированно, и как показывает дальнейший ход исследований вполне оправданно, предлагается разделить экспериментальные группы на две субпопуляции – на животных с низким и высоким уровнем ВРС. В качестве критерия использованы экспериментальные значения стандартного отклонения NN-интервалов (показатель SDNN). Было показано, что крысы с исходно высокой ВРС отличаются от крыс с низкой ВРС в норме по ряду статистических и спектральных показателей ВРС, а также по гемодинамическим параметрам как в норме, так и в условиях стрессорного воздействия (холодовая проба), и в ответ на фармакологические нагрузки. Интересно, что после инфаркта миокарда животные с исходно низкой ВРС демонстрировали лучшую сохранность вегетативной регуляции чем животные с высокой ВРС. При этом в группе животных с исходно низкой ВРС степень повреждения миокарда (размер рубца и выживаемость животных) была значительно ниже, чем у животных с высокой ВРС.

В третьей части работы автор показал, что N-AsPGP, в отличие от своего немодифицированного прототипа, оказывал выраженное негативное влияние на развитие инфаркта миокарда в группе крыс с исходно низкой

активностью вегетативной нервной системы. Это выразалось в увеличении размеров некроза передней стенки левого желудочка и в снижении сократительной способности миокарда. Используемые в работе фармакологические нагрузочные тесты показали, что действие пептида в определенной степени может быть опосредовано его влиянием на сосудистое русло, а взаимосвязь эффектов с уровнем ВРС может свидетельствовать об непосредственном участии ЦНС в наблюдаемых эффектах *N*-AcPGR.

Анализ данной главы показывает, что автором проделана огромная и очень трудоемкая работа на большом количестве лабораторных животных. При этом работа изобилует большим арсеналом разнообразных методов исследования. В результате получен большой массив оригинальных экспериментальных данных, причем большинство результатов получено и описано автором впервые.

В главе «Обсуждение» проведен скрупулезный критический анализ полученных данных. Проведено сопоставление полученных данных с результатами других исследований. Автором обоснованы важнейшие выводы, вытекающие из результатов исследования, и сделан ряд предположений, позволяющих логически объяснить некоторые неоднозначные результаты.

В целом следует отметить, что полученные в данном исследовании результаты выглядят абсолютно убедительными, все выносимые на защиту положения хорошо аргументированы и подтверждены полученными результатами. Выводы четко сформулированы и позволяют без труда оценить научную и практическую значимость проведенных исследований. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Это прежде всего обусловлено выбором релевантных моделей и экспериментальных подходов, достаточным объемом выборок животных, тщательностью проведения всех экспериментов, адекватных методов статистического анализа.

Публикации и апробация работы

Содержание диссертационной работы достаточно полно представлено в публикациях. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 4 статьи в периодических изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – «физиология» и 15 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских научных конференций. Следует отметить, что в большинстве публикаций Куренкова А.Д. является первым автором, что указывает на решающий вклад соискателя в выполненных экспериментальных исследованиях. Результаты диссертационной работы были также многократно представлены на международных и отечественных научных форумах.

Автореферат, изложенный на 24 страницах, дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертационной работы, а также использованных в ней методах и подходах, научной и практической значимости полученных результатов.

Замечания к диссертационной работе

К диссертационной работе А.Д. Куренковой есть ряд замечаний, вопросов и комментариев.

1. Чем обусловлен выбор использованной в работе экспериментальной модели ишемического повреждения (инфаркта) миокарда левого желудочка? В обзоре литературы следовало бы провести сравнительный анализ распространенных экспериментальных моделей инфаркта миокарда, перечислить их преимущества и недостатки, указать для решения каких задач целесообразно применять ту или иную модель.
2. При анализе сократительной функции сердца следовало бы использовать стандартный показатель – величину фракции выброса левого желудочка, измеряемую с помощью ЭхоКГ, что позволило бы объективно оценивать степень развития сердечной недостаточности.

3. В диссертации и автореферате не приведены схемы фармакологического введения пептидов при проведении разных экспериментов на животных. Также не указаны дозы и способы введения пептидов, не описана процедура приготовления растворов для инъекций.

4. Основываясь на публикациях автора по теме диссертации, в работе во всех экспериментах на животных применяли одну определенную дозу пептида. Поскольку эффекты пептидов могут сильно зависеть от дозы, не исключено, что наблюдаемые в том или ином исследовании эффекты (либо их отсутствие) не проявились (или наоборот, проявились) бы при использовании пептидов в других дозах. Поэтому следовало бы везде при описании эффектов пептидов, или при формулировании выводов уточнять, что они касаются именно той дозы (диапазона доз) которые были испытаны в данном исследовании.

5. При анализе синтетических аналогов PGP на секрецию гистамина и проницаемость сосудов автором использован ряд вариантов замен аминокислотных остатков: Gly₂→Leu, Pro₃→Ala, Pro₁→Arg. Чем обусловлен такой выбор? Более логичным представляется использование во всех случаях одинаковой замены аминокислотного остатка, например Ala или Leu. Кроме того, было бы уместно уточнить роль N-As заместителя, проведя анализ активности других N-As производных пептидов, например N-As PG или N-As PGPL.

6. Какими соображениями руководствовался автор при установлении количественных критериев (границы значений SDNN) для отнесения животных к субпопуляциям с низкой или высокой ВРС? В автореферате следовало бы тоже привести заданные границы значений SDNN для кластеризации популяции по уровню ВРС.

7. На каком основании автор считает, что негативное влияние N-AsPGP на развитие ишемического поражения передней стенки миокарда левого желудочка (3 сут, субпопуляция крыс с НВ ВРС) обусловлены его

провоспалительным действием, а не какими-то другими фармакологическими активностями?

8. Чем объясняются различия в фармакологических эффектах PGP и N-AsPGP, выявленные в результате данного исследования?

9. В автореферате текст на стр. 18 следующего содержания «Через 28 суток в подгруппе НВ животных введение N-AsPGP приводило к уменьшению в 3 раза количества тучных клеток в передней стенке, в то время как у ВВ крыс после инъекций как PGP, так и N-AsPGP количество тучных клеток в передней стенке увеличилось в 2 раза (рисунок 8, А).» не соответствует представленным на рис. 8А данным.

10. Представление данных и оформление рисунков в диссертации и автореферате имеет ряд недостатков.

- В некоторых случаях используются разные варианты одного и того же показателя, что значительно затрудняет сравнение данных разных экспериментов. Например, на рисунках 9 и 12 (в автореферате – 1А и 2, соответственно) представлены данные по влиянию пептидов на секрецию гистамина в однотипных экспериментах, но из-за разной формы представления показателя интенсивности секреции гистамина сравнение эффектов PGP/N-AsPGP и их аналогов представляется весьма затруднительным.

- Чем обусловлен различный диапазон значений показателя проницаемости сосудов на рисунках 11 и 13 (в автореферате рисунки 1В и 3, соответственно)?

- Далеко не во всех подписях к рисункам автором указан использованный метод статистического анализа.

11. Формулировка выводов.

- В выводах, касающихся экспериментов на животных нигде не указано, что речь идет об ишемии (инфаркте) миокарда.

- Формулировка выводов 3 и 4 не очень удачная. По сути это краткое изложение полученных результатов.

- Следовало бы сделать вывод, который бы акцентировал внимание на то, какие различия в фармакологическом действии PGP и N-АсPGP выявлены в результате данного исследования.

12. В тексте диссертации и автореферата встречаются опечатки, неудачные и не согласованные выражения, жаргонизмы. Например:

- «...*Реакция индексов* сократимости и расслабления миокарда...» (стр. 3 и далее);
- «...состояния ткани в *интактном контроле*...» (стр. 50 и далее);
- «...*реакция параметра* общей ВРС SDNN...» (стр. 65 и далее);
- «...увеличились *параметры, интерпретируемые как вклад*...» (стр. 103, вывод 3);
- «...увеличились *сниженные* вследствие ишемии *ответы индексов* сокращения и расслабления миокарда...» (стр. 103, вывод 5).

Вместе с тем, перечисленные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают высокую научную и практическую значимость полученных автором результатов, их достоверность, а также корректность сформулированных выводов.

Заключение о соответствии диссертации предъявляемым требованиям

Диссертация А.Д. Куренковой «Влияние пролил-глицил-пролина (PGP) и его ацетилированной формы (N-АсPGP) на развитие ишемического повреждения миокарда у крыс» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.01 – «физиология» (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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Куренкова Анастасия Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидат биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология».

Официальный оппонент:

кандидат химических наук,
Заведующий Сектором нейробиологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт молекулярной
генетики Российской академии наук

Шрам Станислав Иванович



30.11.2018г.

Контактные данные:

Тел. +7(499)196-0213, E-mail: [REDACTED]

Шифр и наименование специальности, по
которой защищена диссертация:

03.00.04 – биохимия; 03.00.23 – биотехнология

Адрес места работы:

123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова,
д. 2, Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт молекулярной
генетики Российской академии наук (ИМГ
РАН) Тел. +7(499)196-0000, www.img.ras.ru

Подпись сотрудника ИМГ РАН С.И. Шрама удостоверяю:

кандидат биологических наук,
Ученый секретарь Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Институт молекулярной генетики
Российской академии наук

Андреева Людмила Евгеньевна



30.11.2018г.