

ОТЗЫВ

официального оппонента Сергеевой Марины Глебовны
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Бабкиной Ирины Игоревны
на тему: «Участие агонистов ПАР-1 в регуляции нейровоспаления *in vitro*»
по специальности 03.03.01 – «Физиология»

Актуальность проблемы. Диссертационная работа И.И. Бабкиной посвящена изучению влияния агонистов ПАР-1 на функциональное состояние основных участников нейровоспаления – тучных клеток, астроцитов и нейронов в модели нейровоспаления *in vitro*. Нейровоспаление является характерным признаком нейродегенеративных нарушений ЦНС при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, рассеянный склероз и другие, а также различные повреждения мозга, например, при инсультах. В настоящее время нейровоспаление рассматривается как мишень для терапии патологий ЦНС. Ведутся интенсивные исследования нейровоспалительных процессов как на уровне организма, так и *in vitro*, на уровне клеток. В настоящее время появляется всё больше доказательств о вовлечении факторов свёртывания крови в повреждения ЦНС разной этиологии. Внимание учёных привлекают сериновые протеазы – активированный протеин С (АПС) и тромбин, у которых помимо протеолитической активности, проявляются свойства сигнальных молекул – клеточных регуляторов самих процессов воспаления, а также процессов нейрорепарации и нейродегенерации.

Актуальность данного исследования не вызывает сомнений, поскольку, несмотря на многочисленные исследования последних лет, которые расширили наши знания о механизмах развития и регуляции нейровоспаления, многие фундаментальные вопросы по-прежнему остаются без ответа. В частности, нет ясного понимания о сложных взаимосвязях и роли разных типов клеток мозга в развитии этого сложного многофакторного

процесса. Кроме того, одна из фундаментальных проблем современной физиологии - это расшифровка механизмов влияния протеаз гемостаза на ход воспалительных и репаративных процессов в тканях мозга. Ключевым моментом процессов сопряжения коагуляции и воспаления является активация рецепторов, активируемых протеазами (ПАР). Фокус работы на рецепторе, активируемом протеазами 1 типа (ПАР-1), поскольку тромбин и активированный протеин С (основные протеазы гемостаза) являются агонистами ПАР-1. Известно, что активация ПАР-1 активированным протеином С и тромбином приводит к запуску противонаправленных процессов: к противовоспалительному в первом случае, и провоспалительному – во втором. Данное явление получило название «смещенный агонизм». Исследования явления смещенного агонизма сами по себе имеют значение для понимания фундаментальных процессов проведения внутриклеточных и межклеточных сигналов.

Известно, что агонистами ПАР могут быть синтетические пептиды с аминокислотной последовательностью, аналогичной той последовательности, которая образуется при расщеплении внеклеточного N-конца рецептора протеазой. Такие пептиды также приводят к активации ПАР-зависимого сигнального пути и с их разработкой связывают появление новых терапевтических веществ. Поиск новых пептидов-агонистов ПАР – регуляторов воспаления – может быть одним из перспективных направлений для терапевтических стратегий ингибирования процессов нейровоспаления и нейродегенерации.

Таким образом, исследование механизмов ПАР-1 зависимой регуляции функций тучных клеток, астроцитов и нейронов в условиях моделирования нейровоспаления *in vitro*, проведенное в данной работе, представляется весьма актуальным и перспективным для фундаментальной физиологии и практической медицины. Именно этим важнейшим аспектам данной медико-биологической проблемы посвящено исследование И.И. Бабкиной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В диссертационной работе четко сформулированы цель и задачи исследования, которые в полной мере решены при выполнении исследования. Выводы диссертации вытекают из полученных результатов и обоснованы. Достоверность полученных результатов подтверждается соответствием поставленным задачам выбранных методов исследования, достаточным объемом материала, использованием адекватных методов статистического анализа.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов. Полученные автором данные о влиянии агонистов ПАР-1 на клетки-участники нейровоспаления *in vitro* являются новыми, указывают на разнонаправленный характер канонической (тромбином) и неканонической (активированным протеином С и пептидом АП9) активации ПАР-1 тучных клеток, астроцитов и нейронов при нейровоспалении *in vitro*. Автором впервые показана возможность регуляции клеточных ответов на провоспалительные стимулы новым синтетическим пептидом АП9, который выступает неканоническим агонистом ПАР-1. Продемонстрировано защитное действие пептида АП9 на тучные клетки, астроциты и нейроны, что проявляется в стабилизации основных показателей функционирования клеток при их провоспалительной активации. Полученные результаты демонстрируют возможность АПС-зависимой регуляции функций клеток RBL-2H3 через рецепторы ПАР-1 и ЭРПС, экспрессия которых впервые продемонстрирована в представленной работе.

Теоретическая и практическая значимость. Совокупность полученных автором результатов можно квалифицировать как новый вклад в изучении механизмов нейровоспаления. Особый интерес как для практической медицины, так и для фундаментальной физиологии представляют впервые полученные данные о роли канонической и неканонической активации ПАР-1 в регуляции нейровоспаления *in vitro*. Полученные автором результаты раскрывают механизмы регуляции

клеточных функций протеазами гемостаза через ПАР-1 при нейровоспалении. Это проясняет механизмы сопряжения процессов свертывания крови и развития воспаления в нервной ткани, что расширяет представление о функциях АПС и тромбина вне системы гемостаза. Полученные в ходе работы результаты об агонистах ПАР-1, как регуляторах воспаления, в дальнейшем могут быть использованы при разработке стратегий терапии, направленной на купирование процессов нейровоспаления и нейродегенерации.

Структура и содержание работы. Диссертация изложена на 155 страницах и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы, что полностью соответствует стандартам описания научных исследований. Работа иллюстрирована 66 рисунками. Список цитируемой литературы включает 385 источников, из них 10 на русском языке.

Общая характеристика работы. Во введении диссертант обосновывает актуальность проведенного исследования, формулирует его цели и задачи. Четко сформулированы научная новизна и положения, выносимые на защиту. Основные идеи и положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на многочисленных отечественных и международных симпозиумах и конференциях и отражены в научных публикациях. По теме исследования опубликованы 3 статьи и 7 тезисов докладов конференций в журналах, индексируемых аналитическими базами Web of Science, Scopus и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06. по специальности физиология 03.03.01, а также 13 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Публикации полностью соответствуют теме диссертационного исследования и раскрывают его основные положения.

В разделе «Обзор литературы» подробно описаны имеющиеся в мировой литературе данные о структуре и свойствах ПАР-1 и его агонистах –

протеаз гемостаза - АПС и тромбина. Представлены современные данные о ПАР-1-зависимой регуляции клеточных функций при патофизиологических процессах в организме. Проведен анализ данных литературы об индукторах, участниках и механизмах нейровоспаления. Обзор обосновывает новизну, фундаментальную и практическую значимость темы диссертационной работы.

Материалы и методы исследования подробно описаны во 2-ой главе диссертации. Раздел включает описание разнообразных методов оценки выживаемости и активации клеток, отражает многообразие экспериментальных подходов, использованных автором, что указывает на высокий научный уровень проведенных автором исследований. Следует также отметить использование автором большого разнообразия клеточных культур в качестве объектов исследования. Все эти подходы требуют высокого экспериментального мастерства и свидетельствуют о высоком профессионализме автора диссертационной работы. Применяемые подходы адекватны поставленным задачам.

Экспериментальная часть диссертационной работы изложена в 3 главе и включает в себя описание полученных результатов и их обсуждение. Полученные результаты описаны ясно и отражают значительный объем выполненной работы. Автором дан обстоятельный анализ полученных экспериментальных данных в сопоставлении с уже имеющимися в мировой научной литературе фактами. Из текста экспериментальной части и представленных рисунков видно, что все задачи, поставленные в работе, были успешно решены и получены оригинальные результаты. Выводы, сделанные автором, соответствуют поставленным задачам и отражают основные положения диссертационной работы.

Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно.

Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности 03.03.01 – «Физиология».

Автореферат соответствует всем требованиям, предъявляемым к подобным работам, дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертации.

Замечания по диссертации следующие.

1. Литературный обзор в общей части, вводящий в предмет исследования, представлен ясно и хорошо иллюстрирован, однако, когда автор переходит к описанию исследований, связанных непосредственно с темой работы, то текст выглядит как реферативное перечисление этих исследований, без структуры и анализа (например, стр 27-32). При прочтении литературного обзора не возникает четкого представления, какие именно вопросы не имели ответов. Некая постановка проблемы осуществляется в начале каждого экспериментального раздела, но чаще всего это опять описание литературы, повторяющее другими словами информацию (например, начало экспериментального раздела - пишут о важности тучных клеток (стр. 62), хотя этому уже посвящен целый раздел литературного обзора (стр. 39)).

2. Замечания по стилю (стр 39). Вводится название «тучные клетки», которые в следующем предложении называются «мастоциты». В научной литературе рекомендуется всегда пользоваться одним синонимом для обозначения одного явления (процесса, объекта).

3. Замечания по стилю (стр 42). Автор пишет: «Появляется осознание того, что глия и микроглия <...> являются важным источником медиаторов воспаления и могут играть фундаментальную роль в нарушениях ЦНС». Этим исследованиям уже около 30 лет, поэтому настоящее время для осознания не усиливает актуальность, а, наоборот, проявляет недостаточное знакомство с исходными исследованиями.

4. Замечания к описанию методов. При изучении воспалительных процессов и связанных с иммунитетом работах лучше указывать источники (виварии), откуда брали животных (стр. 52), поскольку качество содержания животных и их предыстория может влиять на результаты.

5. Замечания к описанию методов. Выделение тучных клеток похоже по

методике на выделение перитонеальных макрофагов. Проводилось ли какое-то типирование клеток по маркерам?

6. Вопрос к экспериментальной части. Рис. 23 стр. 67. Ионофор А23187 (24 часа) и ЛПС (90 мин) изменяли структуру актинового цитоскелета клеток линии RBL-2H3, обеспечивая перестройку актина, характерную для экзоцитоза. Почему один контроль для разных времен? Описание работы с линией не подразумевает её синхронизации. При таких разных временах нужно показывать контроли для каждого времени.

7. Вопрос к экспериментальной части. На рис. 22 указано, что эксперименты проводились на «не менее 2-х независимых культурах клеток». Что такое независимые культуры относительно линии клеток - не понятно. Также странно выглядят колебания флуоресценции от 100 до 300 мкс, если это не отдельный трейс, а сумма, как следует из подписи.

8. на стр. 67 приведено, что «Астроциты составляют 20 – 30% от общего числа глиальных клеток в мозге человека [Pelvig et al., 2008]». Вопрос соотношения количества клеток в мозге человека до сих пор остается дискуссионным, не смотря на более 150-летний период исследования данной проблемы, см. например обзор [Bartheld et.al. 2016, PMID: 27187682]. В выбранной автором работе по подсчету количества клеток приводятся конкретные цифры для астроцитов: 17,3% для женщин от общего числа глиальных клеток, 20,2% для мужчин. Таким образом надо или привести конкретные цифры из процитированной работы, или выбрать работу для цитирования где рассматриваются различные исследования по подсчету количества клеток.

9. стр. 64 - МТТ и LDH тест, автор не приводит ни в разделе результаты, ни в описаниях рисунков, ни в разделе методы такой важный параметр как время инкубации клеток с исследуемыми стимулами перед тестированием на выживаемость клеток (МТТ) и гибель клеток (LDH). Если подразумевается, что время добавления такое же, как и в предыдущем разделе, то наблюдается выраженная токсичность используемых веществ (например всего 90 мин. с

ЛПС на 20% снижает выживаемость клеток, а добавление A23187 на 24 часа снижало выживаемость клеток на 75%. При этом совместное добавление A23187 + PMA (на 24 часа) усиливало клеточную гибель в 1,5 раза по сравнению с контролем. К сожалению, клеточная гибель приведена только для точки A23187 + PMA, целесообразно провести измерения LDH-теста и для других соединений, если у них наблюдается столь выраженная токсичность.

10. Исследование выживаемости тучных клеток проводили на культуре клеток линии RBL-2H3 (рис.21). При этом про-воспалительные факторы приливали к тучным клеткам (рис.20). Автору рекомендуется уточнить насколько корректно переносить данные с выживаемости клеток линии RBL-2H3 на тучные клетки, выделенные из брюшной полости крыс. В тексте работы чаще всего ставится знак равенства, т.е. RBL-2H3 = тучным клетки, выделенные из брюшной полости крыс, при этом нигде не уточняются основания для такого равенства.

11. На стр. 68 указано, что однократное 15-минутное воздействие ЛПС (0,1 мкг/мл) не влияло на пролиферацию астроцитов, в то время как трёхкратная аппликация ЛПС приводила к повышению пролиферации астроцитов через 48 часов приблизительно в 1,3 раза по сравнению с контролем. К сожалению из описания в тексте результатов и в описании рисунка не понятно, как проводилась 15 минутная аппликация ЛПС, как проводилась трехкратная аппликация (со сменой среды, без смены среды, 3 аппликации по 15 минут это 45 минут стимуляции, был ли использован полимиксин В для нейтрализации ЛПС?). Необходимо уточнить описание данного эксперимента!

12. В разделе 3.1.2.1. оценивалось «Влияние провоспалительных факторов на пролиферацию астроцитов». К сожалению, информации каким именно тестом (MTT, WST-1, или BrdU?) оценивалась пролиферация астроцитов в тексте раздела результатов или в разделе методы не приведено.

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Бабкиной Ирины Игоревны на тему: «Участие агонистов ПАР-1 в регуляции нейровоспаления *in vitro*» 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. Соискатель Бабкина Ирина Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология».

Официальный оппонент:

Сергеева Марина Глебовна

Доктор химических наук

МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел биокинетики, ведущий научный сотрудник.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.04 - Биохимия (хим. науки)

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40.

Тел. рабочий 495-939-43-32

Адрес электронной почты: _____

«29» сентября 2020 года

Подпись М.Г. Сергеевой заверяю

ПОДПИСЬ
УДОЛОВОЕРЯЮ
ЗАВ КАВ (СЕРГЕЕВА)
ИИ СЛ (СЕРГЕЕВА)


М.Г. Сергеева
