

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, заведующего лабораторией комбинированной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, Покровского Вадима Сергеевича на диссертационную работу Плехановой Ольги Сергеевны «Роль урокиназного активатора плазминогена в ремоделировании кровеносных сосудов», представленную к защите в диссертационный совет Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки).

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Диссертационная работа Плехановой Ольги Сергеевны посвящена актуальной проблеме исследованию участия урокиназы (активатора плазминогена урокиназного типа, uPA – urokinase-type Plasminogen Activator) в процессах ремоделирования сосудов при различных типах поражения – при атеросклерозе, транслюминальной баллонной коронарной ангиопластике, механическом повреждении и снижении кровотока. После открытия урокиназы во второй половине 20 века длительное время считалось, что этот фермент обладает лишь фибринолитической активностью. Однако в последние годы стало очевидно, что этот белок обладает гораздо более широким спектром функций. Урокиназа, как благодаря своим протеолитическим эффектам, так и способности к связыванию с рецепторами, участвует в регуляции таких клеточных реакций, как миграция, адгезия, пролиферация и др. Выявление новых активностей урокиназы стимулировало работы по изучению ее роли в таких клинически значимых сердечно-сосудистых процессах, как атеросклероз, рестеноз артерий и ангиогенез. Таким образом, диссертация О.С. Плехановой является, безусловно, актуальной, как с фундаментальной, так и прикладной, клинической точки зрения поскольку включает в себя поиск новых подходов к коррекции распространенного и прогностически неблагоприятного состояния – констриктивного ремоделирования сосудов. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению механизмов этого явления, а также поиск мишеней и тестирование новых подходов на животных моделях риск развития рестенозов остается высоким у определенной категории пациентов. Также проблема профилактики констриктивного ремоделирования при других заболеваниях сосудов (в частности, атеросклерозе, артериальной гипертензии, васкулитах) остается критически актуальной в связи с тем, что констриктивное ремоделирование коррелирует с высокой сердечно-сосудистой смертностью. Механизмы развития неблагоприятного ремоделирования сосудов требуют дальнейшего изучения. Использование урокиназы как новой мишени для разработки

систем диагностики и коррекции нежелательного ремоделирования сосудов может помочь в оценке риска и терапии пациентов в клинической практике.

Изложенное выше подтверждает, что диссертационная работа Плехановой Ольги Сергеевны, ставящая целью изучение роли и механизмов участия урокиназного активатора плазминогена в регуляции ремоделирования кровеносных сосудов; поиск и определение новых оптимальных мишеней для предотвращения неблагоприятной структурной перестройки сосудов с целью дальнейшего использования в клинической практике, является своевременной и очень актуальной.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Научная новизна исследования и полученных результатов не вызывает сомнений. В работе было получено большое количество оригинальных результатов, открывающих и объясняющих новые, зависящие от урокиназы механизмы ремоделирования поврежденных сосудов. Впервые было убедительно и с помощью разносторонних доказательств продемонстрировано, что урокиназа является одним из ключевых участников негативного (отрицательного) ремоделирования сосудов (т.е. приводящего к сужению просвета и ограничению кровотока). Экспрессия урокиназы была повышена в зонах атеросклеротического поражения сосудов человека, а увеличение ее концентрации в крови являлось независимым предиктором рестеноза у больных ИБС после проведенной ангиопластики. В моделях повреждения сосудов на крысах показано, что динамика изменений экспрессии урокиназы в сосудистой стенке коррелирует с динамикой изменений пролиферации клеток, вызывающих негативное ремоделирование. Также было установлено, что внесение в сосудистую стенку экзогенной урокиназы стимулирует такие реакции, как образование неоинтимы, миграция гладкомышечных клеток, накопление моноцитов/макрофагов, повышение экспрессии и активности матриксных металлопротеиназ, усиление оксидативного стресса. Именно комплекс этих реакций и приводит в конечном итоге к сужению просвета поврежденного сосуда. Под действием урокиназы наблюдалось повышение уровня экспрессии провоспалительных генов и генов оксидативного стресса, указывая на важную роль этих процессов в реализации действия урокиназы в отношении отрицательного ремоделирования сосудов. Часть результатов по эффектам урокиназы, полученных в моделях на животных, была подтверждена в культуре фибробластов (стимуляция пролиферации и фенотипической трансформации, активация матриксных металлопротеиназ, активация окислительных реакций).

Крайне интересным и впервые продемонстрированным автором является тот факт, что участие урокиназы в ремоделировании сосудов было опосредовано, в первую очередь, ее протеолитической активностью, а не рецепторным взаимодействием с клетками сосудистой стенки. Вариант урокиназы с поврежденным рецепторным доменом действовал в моделях на животных так же, как и нативная молекула, а вот повреждение

протеолитического домена, наоборот приводило к исчезновению соответствующих эффектов в сторону негативного ремоделирования. Еще один неожиданный и оригинальный результат работы – противоположное действие урокиназы и тканевого активатора плазминогена на процессы перестройки сосудов. В отличие от урокиназы, тканевой активатор плазминогена, обладающий сходной протеолитической активностью, не только не стимулировал реакции отрицательного ремоделирования, но даже демонстрировал некоторую защитную активность по отношению к этому процессу.

Таким образом, объем полученных результатов, их новизна, оригинальность и актуальность указывают на то, что диссертационная работа О.С. Плехановой содержит более чем достаточно оригинальных данных для представления ее на защиту.

### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Необходимо отметить высокий методический уровень работы. Для изучения роли урокиназы в ремоделировании сосудов в работе О.С. Плехановой использовался широкий спектр разнообразных подходов и методов. Были проведены исследования аутопсийного материала сосудов человека с различной степенью атеросклеротического поражения на содержание урокиназы, ее рецептора (uPA-R), а также ингибитора активаторов плазминогена I типа (PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor 1). Было также определено содержание урокиназы и PAI-1 в крови больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), которым проводилась коронарная ангиопластика и оценена возможность использования этих показателей в качестве предикторов пост-ангиопластического рестеноза. Наиболее объемная часть работы была выполнена в моделях поражения сосудов на лабораторных животных, таких как модель баллонного повреждения артерий, перидивентициального повреждения, искусственного ограничения тока крови. Автором использован оригинальный метод введения в сосудистую стенку различных белковых препаратов с использованием содержащего их геля, который наносили на внешнюю сторону сосуда. Часть исследований проводилась также в культуре клеток разных типов фибробластов. При выполнении работы использовались такие методы, как многочисленные варианты микроскопии и иммуногистохимии с применением методов компьютерной обработки изображений, иммуноферментный анализ, электрофорез и иммуноблоттинг, зимография, методы определения экспрессии генов (полимеразная цепная реакция и метод транскрипционных матриц), специальные методы определения активности протеолитических ферментов (урокиназы, tPA, матриксных металлопротеиназ) и регистрации окислительного стресса и некоторые др. Применение разнообразных и современных методов исследования в сочетании с адекватной статистической обработкой данных не вызывают сомнений в достоверности и корректности получаемых автором данных.

Использованные методы исследования адекватны поставленным задачам и отвечают современным требованиям. Обработка данных проведена с помощью компьютерных программ Jandel SigmaStat, SAS PROC PHREG, специальных методов обработки данных микрочипов (DNA-Chip Analyzer, GeneSpring, Microarray Suite 5.0, SAM). Для анализа данных использованы методы параметрической и непараметрической статистики, регрессионно-корреляционного анализа, позволившие корректно обосновать основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации. Работа апробирована на различных уровнях, результаты исследования были представлены на международных и российских симпозиумах.

### **Научная и практическая значимость полученных результатов**

Полученные автором результаты обладают высокой теоретической и практической ценностью, расширяют существующие представления о механизмах развития неблагоприятного констриктивного ремоделирования артерий. Полученные данные способствуют более глубокому пониманию молекулярных механизмов действия активаторов плазминогена в этих процессах. Использование различных экспериментальных подходов и моделей позволило доказать, что урокиназа является уникальным регулятором перестройки сосудистой стенки, опосредующим констриктивное ремоделирование сосудов.

Оценка уровня урокиназы и ингибитора активаторов плазминогена I типа в крови пациентов перед проведением баллонной ангиопластики способствует развитию персонализированного подхода к терапии пациентов со стенозирующим атеросклерозом сосудов. Определение уровня урокиназы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца до проведения процедур эндоваскулярной реваскуляризации позволяет выявить пациентов с высоким риском возобновления стенокардии. Локальное ингибирование протеолитической активности урокиназы в сосудистой стенке является новым перспективным подходом к регуляции ремоделирования сосудов.

Научная и практическая значимость исследования подтверждается внедрением результатов в практику работы Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ; результаты используются в учебном процессе кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

### **Содержание работы, ее завершенность и оформление**

Диссертация традиционно включает введение, обзор литературы, главу «Материалы и методы исследования», собственные результаты и их

обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации. Объем диссертации составляет 280 страниц. В библиографическом указателе приведен 451 источник. Диссертация изложена четко, хорошим литературным языком. Главы представляют собой самостоятельные разделы исследования, связанные между собой внутренней логикой.

Во введении раскрывается актуальность темы, четко и конкретно излагаются цели и задачи исследования, новизна и научно-практическая значимость работы, основные научные положения диссертации. Выводы соответствуют поставленным задачам.

В главе 1 представлен обзор литературы; в свете современных представлений рассмотрены механизмы ремоделирования кровеносных сосудов, суммированы имеющиеся данные о роли активаторов плазминогена в этих процессах, подробно раскрываются биологические функции урокиназы и сложные процессы ее клеточных взаимодействий и сигнализации. Обоснована важность профилактики констриктивного ремоделирования сосудов, представлены пути решения данной проблемы, разрабатываемые в мире. Из обзора с очевидностью вытекает актуальность цели и задач исследования.

Глава 2 включает характеристику материалов и методов исследования. Выбранные клиническая патология, а также экспериментальные модели, использованные методы исследования и статистической обработки данных в полной мере соответствуют цели и задачам работы. Как отмечалось выше, обращает на себя внимание широкий спектр использованных в работе методов и подходов, а также использование как клинических данных, так и материалов аутопсий, а также животных моделей и экспериментов в культуре клеток. Заслуживает положительной оценки дифференцированное использование в работе современных методов статистической обработки данных.

В главе 3 изложены результаты, полученные автором, их обсуждение, интерпретация, место в системе современных представлений о ремоделировании сосудов. В подглаве 3.1 демонстрируются результаты исследования компонентов урокиназной системы на аутопсийном материале в сосудах, пораженных атеросклерозом. Также представлено исследование прогностической значимости компонентов системы фибринолиза у пациентов с ишемической болезнью сердца для возврата стенокардии после коронарной баллонной ангиопластики. В подглаве 3.2 приведены данные исследования роли урокиназного активатора плазминогена в развитии констриктивного ремоделирования сосудов, в частности, данные об экспрессии урокиназы и ее рецептора в стенке артерии после экспериментального баллонирования, результаты влияния активаторов плазминогена на поврежденную сосудистую стенку, данные о механизмах и каскадах, благодаря которым урокиназа реализует свои функции уникального регулятора ремоделирования сосудистой стенки. Представлены данные, полученные на модели экспериментальной баллонной

ангиопластики, изолированного периадвентициального повреждения артерий, модели снижения кровотока, данные о фенотипической трансформации фибробластов и о значении образования активных форм кислорода в стимуляции пролиферации гладкомышечных клеток, полученные в культуре клеток.

Заключение представлено в виде отдельной подглавы, в которой аргументированы основные научные положения. Выводы и практические рекомендации логично следуют из поставленных задач и соответствуют основным положениям диссертации, полностью отражают результаты исследования, отличаются четкостью формулировок и обоснованностью.

#### **Подтверждение опубликования результатов диссертации в научных изданиях**

По теме диссертации опубликованы 30 статей, в том числе 17 статей в российских журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 13 статей в зарубежных журналах, 1 глава в сборнике, 1 патент на изобретение. Публикации в полной мере отражают основные положения диссертации.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью отражает содержание работы, оформление автореферата соответствует общепринятым требованиям.

#### **Замечания по диссертационной работе**

В тексте присутствуют англицизмы, в некоторых частях текста также очевидно присутствуют предложения, построенные не в полном соответствии со стилистикой русского языка, однако это не снижает научной ценности и значимости проведенного исследования. Что касается основных результатов работы, в части исследования аутопсийного материала для большей полноты картины желательно в последующем оценить солокализацию компонентов урокиназной системы другими маркерами, например, с экспрессией фактора некроза опухолей. Кроме того, было бы полезно исследовать другие рекомбинантные формы урокиназы на использованных моделях, например, аминотерминальный фрагмент для оценки его возможного конкурентного взаимодействия с мишенями связывания урокиназы. Выводы работы полно и четко отражают полученные результаты, однако, в некоторых выводах сложно понять, какие из них сделаны на основании данных, полученных при анализе аутопсийного материала у человека или крови пациентов, какие в моделях на животных, а какие в клеточных культурах. Кроме того, в тексте присутствует некоторое количество опечаток. Необходимо отметить, что эти замечания носят формальный характер, нисколько не умаляют высокой научной ценности полученных результатов и завершенности исследования.


#### **Заключение**

Диссертация О.С. Плехановой «Роль урокиназного активатора плазминогена в ремоделировании кровеносных сосудов» представляет собой самостоятельное законченное научно-квалификационное исследование,

открывающее новое направление в биомедицинской науке – исследование процессов ремоделирования кровеносных сосудов, а также предлагающее решение проблемы констриктивного неблагоприятного ремоделирования сосудов с помощью разработки локального ингибирования протеолитической активности урокиназы; а также способствующее развитию персонализированного подхода при лечении пациентов со стенозирующим атеросклерозом сосудов с помощью определения уровня урокиназы крови и оценки риска процедур эндоваскулярных вмешательств. Разработка данной проблематики имеет важное медико-социальное значение и вносит существенный вклад в развитие новых подходов к лечению сердечно-сосудистых заболеваний.


Изложенное выше свидетельствует, что диссертационная работа Плехановой Ольги Сергеевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утв. Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), а автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки).

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией комбинированной терапии опухолей  
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный  
медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
д.м.н. (03.01.04 – биохимия,  
14.01.12 – онкология),  В.С. Покровский

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный  
медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, г. Москва,  
Каширское шоссе 23; Телефон: +7 (499) 324-10-94; e-mail: info@ronc.ru

Подпись д.м.н. Покровского В.С. заверяю:

Заместитель директора по научной работе – директор Научно-  
исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии  
опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр  
онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации  
к.фарм.н.,  З.С. Шпрах

« 10 » октябрь 2017 г.

