

Отзыв официального оппонента д.б.н., профессора

Авдони́на Павла Владимировича на диссертацию П.И. Макаревича

**«Разработка метода комбинированной генной терапии ишемических заболеваний с использованием плазмидных конструкций с генами VEGF165 и HGF человека»,
представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по двум
специальностям: 14.01.05 – кардиология и 03.01.04 – биохимия**

Актуальность исследования

Ишемические заболевания являются наиболее распространенной причиной инвалидизации и ранней смертности населения развитых стран. Разработка методов профилактики и лечения ишемических заболеваний относится к числу наиболее актуальных задач современной медико-биологической науки. Перспективным подходом является стимуляция роста новых сосудов в ишемизированных тканях с помощью генных конструкций, производящих ангиогенные факторы роста (АФР). Диссертационная работа П.И. Макаревича посвящена исследованию данной проблемы. Конкретная задача заключалась в изучении сочетанного действия на рост сосудов производимых плазмидами двух АФР – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста гепатоцитов (HGF). Актуальность этой работы обусловлена тем, что в настоящее время отсутствуют эффективные методы стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях. Эти исследования находятся на начальной стадии, и работа П.И. Макаревича способствует решению данной проблемы. Важной представляется часть работы, посвященная оценке уровней VEGF и HGF у больных ишемической болезнью сердца.

Научная новизна исследования и научно-практическая значимость полученных результатов

В исследованиях П.И. Макаревича новым является подход к поиску сочетания ангиогенных факторов, оптимальных для искусственной стимуляции роста сосудов при ишемических заболеваниях. Он основан на изучении адаптивных процессов,

происходящих в организме больных с хронической сердечной недостаточностью и постинфарктным кардиосклерозом. Выбор VEGF и HGF для терапевтического воздействия базируется на обнаруженной автором работы корреляции их содержания с уровнем маркеров тяжести ХСН и наличием сопутствующего диабета 2-го типа. Впервые на экспериментальных моделях ишемии нижних конечностей и сердца продемонстрирована возможность увеличения эффективности стимуляции ангиогенеза при сочетанном применении VEGF и HGF. Получены новые данные, касающиеся сигнальных механизмов, реализующихся в эндотелиальных клетках при совместном действии VEGF и HGF. Оригинальным представляется также техническое решение вопроса - использование для доставки плазмидного вектора отечественного производства с оптимизированными последовательностями генов ангиогенных факторов VEGF и HGF.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций сформулированных в диссертации

Представленные в диссертации П.И. Макаревича результаты получены в ходе хорошо спланированных и аккуратно выполненных исследований. Оценку содержания VEGF и HGF в плазме крови проводили у большой группы больных и группы здоровых добровольцев. Все эксперименты на животных и клеточных культурах проводились с достаточным количеством повторов. Данные подвергнуты тщательному статистическому анализу и полностью достоверны. Выносимые на защиту положения и выводы диссертационной работы четко сформулированы и хорошо обоснованы. В работе апробированы оригинальные плазмидные конструкции, несущие оптимизированные последовательности генов VEGF и HGF. Эти конструкции могут быть рекомендованы к использованию для разработки на их основе препаратов для генной терапии.

Оценка содержания диссертации

Рассмотрим более детально содержание диссертационной работы П.И. Макаревича. Это солидный труд, изложенный на 171 странице с большим количеством

иллюстраций. Введение и литературный обзор занимают примерно четверть от объёма диссертации. Содержание литературного обзора соответствует теме экспериментальной работы. Материал изложен логично, четко структурирован. Информация, приведенная диссертантом, на мой взгляд, весьма полезна и даёт возможность неспециалисту в рассматриваемой области войти в тему. Проанализирован большой объём научной литературы (434 ссылки). В дальнейшем, при ознакомлении с собственными результатами диссертанта, удобно возвращаться к литературным данным. Хорошо и интересно написан раздел 1.2 "Механизмы вакуляризации". По главе **Обзор литературы** есть некоторые замечания. На странице 18 допущена неточность или опечатка - кальциевые каналы обозначены как "K⁺ каналы". Автор использует неудачный термин "деплеция" моноцитов (стр.19). Судя по контексту можно сказать по-русски удаление или уменьшение количества. Аналогичное замечание относится к нововведенному термину эффлюкс (стр. 41). Не очень хорош, как мне кажется, термин перицитарные клетки (стр.43). Почему не перициты? На стр. 26 допущена ошибка - фосфолипаза С-гамма отнесена к классу сигнальных белков src. По-видимому, это не смысловая, а стилистическая ошибка. Вместо 1,4,5-трифосфат следует писать 1,4,5- трисфосфат (стр.26, 2 строка снизу). Часть литобзора, посвященная рецепторам VEGF и механизмам их действия, могла бы быть расширена. В частности, ее можно дополнить данными об участии вторичного посредника NAADP в действии VEGF (Favia et al., 2014). Несмотря на эти мелкие недочеты, в целом глава "Обзор литературы" заслуживает высокой оценки. Его важным достоинством является четкое логичное построение. План хорошо продуман, поэтому при дальнейшей работе над этой темой можно будет просто дорабатывать отдельные разделы и подразделы, дополняя их новыми данными. Возможно, такого рода обзор стоит дополнить подразделом о васкулогенезе при онкологических заболеваниях. Эту часть своей диссертационной работы автору можно рекомендовать к публикации в виде журнального обзора или главы в монографии, если это ещё не сделано.

Глава 2 Материалы и методы говорит о том, что диссертант использовал широкий спектр современных методов молекулярной биологии, биохимии, клеточной биологии, гистологии, хирургических методов для операций на животных и других для решения актуальной медико-биологической проблемы. Проведен грамотный отбор обследуемых пациентов с описанием клинических характеристик. Методическая база диссертационной работы П.И. Макаревича заслуживает самой высокой оценки. У меня нет каких-либо замечаний к описанию биохимических методов (раздел 2.2). В молекулярно-биологической части возможно стоило указать, какие куски генов VEGF HGF, а именно какие части 5'-UTR и 3'UTR, вводились в плазмиду. По цитологическим методам можно отметить в качестве замечания отсутствие ссылки на метод получения эндотелиальных клеток HUVEC. Стандартное замечание к тексту этой главы - использование жаргонных терминов, таких как "депривировали", "конфлюэнт" (стр.55,56).

Глава 3. Результаты.

Первым результатом работы П.И. Макаревича, обосновывающим направление дальнейших исследований, было выявление повышенных уровней VEGF и HGF у пациентов с ИБС (раздел 3.1). Диссертант уделил большое внимание поиску корреляционных связей между уровнями этих АФР и ИБС. Согласно полученным данным, отраженных в первом выводе, существует "ассоциация повышения HGF с наличием ИБС". По расчетам автора работы, при увеличении концентрации HGF на 1 пг/мл вероятность развития ИБС увеличивается на 1,22%. В связи с этим интересно оценить, насколько может быть выше вероятность развития ИБС у относительно здоровых людей, имеющих превышение концентрации HGF на более, чем 200 пг/мл по сравнению со средним значением (рис.6). Следующий этап работы - конструирование плазмид и оценка эффективности синтеза АФР (раздел 3.2). Проведенные тесты однозначно продемонстрировали более высокую эффективность конструкций на основе

отечественной плазмиды по сравнению с коммерческим вектором. В разделе 3.3. представлены результаты экспериментов, вполне убедительно доказывающих возможность применения конструкций с VEGF и HGF для продукции АФР *in vivo*. Главная часть экспериментальной работы П.И. Макаревича представлена в разделах 3.4 и 3.5. Эти исследования безусловно успешны. Особенно стоит отметить опыты с использованием модели ишемизированных конечностей. Применяя комплекс методов (гистологических, биохимических, доплеровского определения кровотока, иммунофлуоресцентного окрашивания), диссертант доказал, что созданные конструкции улучшают кровоснабжение конечностей за счет стимуляции ангиогенеза, причем сочетание VEGF и HGF более эффективно, чем факторы ангиогенеза по отдельности. Эксперименты на ишемизированном сердце показали, что оба ростовых фактора оказывают положительное действие, уменьшая зону фиброза, хотя при одновременном введении обоих плазмид эффективность не возрастает. Сочетанная экспрессия VEGF и HGF лучше, чем каждый фактор по отдельности, стимулирует капиллярогенез в периинфарктной зоне. По этой части работы у меня есть замечание, касающееся качества цветных иллюстраций. Они небольшого размера и печать не очень четкая, поэтому ориентироваться приходится в основном по тексту и табличным данным. Логическим продолжением исследований стал поиск возможного внутриклеточного механизма, отвечающего за усиление ангиогенного эффекта при совместном действии VEGF и HGF (раздел 3.6). П.И. Макаревич обнаружил, что усиление может происходить на стадии активации киназ ERK1/2 и p38 и активации синтеза интерлейкина-8. С другой стороны, установлено, что влияние VEGF и HGF на активность NFκарраВ, экспрессию ICAM-1/VCAM-1 имеет разную направленность, что, по-видимому, объясняет различие в действии этих АФР на аккумуляцию моноцитов в периинфарктной зоне. В этой части работы, как и в предшествующих исследованиях,

диссертант продемонстрировал методический уровень, соответствующий мировым стандартам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация П.И. Макаревича на тему: «Разработка метода комбинированной генной терапии ишемических заболеваний с использованием плазмидных конструкций с генами VEG165 и HGF человека», по специальностям 14.01.05 (кардиология) и 03.01.04 (биохимия), выполненная под руководством д.м.н., проф. Е.В. Парфёновой, по объему изучаемого материала, используемым методам исследования, научной новизне и практической значимости является законченной научно-исследовательской работой. В ней содержится решение актуальной задачи по разработке метода комбинированной генной терапии ишемических заболеваний плазмидными конструкциями с встроенными генами VEGF и HGF. Результаты исследований П.И. Макаревича опубликованы в 11 статьях в журналах, входящих в список ВАК. В них изложены все основные положения диссертационной работы. Личный вклад диссертанта является определяющим. Диссертация и автореферат полностью соответствуют требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.05 (кардиология) и 03.01.04 (биохимия).


Официальный оппонент:

Руководитель лаборатории физиологии рецепторов и сигнальных систем Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (119334, Москва, Вавилова 26, тел. +7-499-135-7009, e-mail pvavdonin@yandex.ru) д.б.н., профессор



П.В. Авдонин

Подпись П.В. Авдонина заверяю
Учёный секретарь ИБР РАН, к.б.н.



Е.Б. Абрамова

«21» октября 2015 г.

В диссертационный совет Д 208.016.01

при ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Петроверигский пер., д. 10, стр.3, г. Москва, 101990)

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Макаревича Павла Игоревича на тему: «Разработка метода комбинированной генной терапии ишемических заболеваний с использованием плазмидных конструкций с генами VEGF165 и HGF человека» по специальностям 14.01.05 – кардиология и 03.01.04 – биохимия, медицинские науки

| Фамилия, Имя, Отчество (полностью), дата рождения, гражданство | Ученая степень, наименование отрасли науки, научная специальность, по которой защищена диссертация, ученое звание (при наличии) | Полное название организации, являющейся основным местом работы официального оппонента (на момент предоставления отзыва) | Занимаемая должность в организации (на момент предоставления отзыва) | Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях (не менее 5-ти работ за последние 5 лет, близкие по теме оппонируемой диссертации) |
|--|---|---|--|--|
| Авдонин Павел Владимирович, 30 октября 1954, гражданство РФ | доктор биологических наук, биологические науки, 03.00.04 – биохимия. Профессор | Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» Российской академии наук | Руководитель лабораторий физиологии рецепторов и сигнальных систем | 1) Терехина И.Л., Надеев А.Д., Кожевникова Л.М., Гончаров Н.В., Авдонин П.В. 5HT1В и 5HT2В-рецепторы вызывают увеличение концентрации ионов кальция в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов. Патогенез. 2012. Т. 10. № 1. С. 70-72 2) Muslikhov E.R., Surkov K.V., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. Elevation of the expression of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptors and increase of calcium signaling in response to ATP during differentiation of skeletal myoblasts C2C12 into myotubes. Biochemistry (Moscow) Supplement. |

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | <p>Series A: Membrane and Cell Biology 2010. T. 4. № 4. С. 383-388.</p> <p>3) Надеев А.Д., Зинченко В.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Токсические и сигнальные свойства активных форм кислорода Токсикологический вестник. 2014. № 2. С. 22-27.</p> <p>4) Goncharov NV, Avdonin PV, Nadeev AD, Zharkikh IL, Jenkins RO. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis. Curr Pharm Des. 2015;21(9):1134-46.</p> <p>5) Kozhevnikova LM, Sukhanova IF, Avdonin PV. Activation of "silent" vasoconstrictive 5-HT1A receptors as a possible mechanism of synergism in angiotensin II and serotonin effect on vascular tone. Izv Akad Nauk Ser Biol. 2011 Jan-Feb;(1):68-76. Russian.</p> |
|--|--|--|--|--|

Авдонин Павел Владимирович



(подпись)

«2» июня 2015г.

Абрамова Елена Борисовна, учёный секретарь ИБР РАН, к.б.н.



(подпись)

