

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Ю.Г.Кировой «Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1 α и GPR91) при адаптации к гипоксии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03. Патологическая физиология

Гипоксия является широко распространённым патологическим состоянием организма, которое возникает не только при недостатке кислорода в окружающей среде и усиленных нагрузках на организм, но, что особенно важно, она является сопутствующим синдромом при очень многих заболеваниях. Поэтому исследование механизмов её возникновения и регуляции, без сомнения, является актуальной задачей, изучением которой занимаются во многих лабораториях мира.

Следует отметить, что в нашей стране для изучения этого явления, в стенах этого Института, проф. Л.Д. Лукьяновой, а также в Институте физиологии имени Богомольца, проф. В.Я. Березовским, был разработан новый подход к изучению этого состояния организма, используя животных с различной устойчивостью к гипоксии. Этот подход был и остаётся весьма эффективным и позволил изучить основные механизмы развития и адаптации организма к гипоксии. Хотелось бы подчеркнуть, что родоначальником исследований общих механизмов адаптации организма к гипоксии в мире был проф. Ф.З. Меерсон, а проф. Л.Д. Лукьянова некоторое время назад возглавляла международное общество по изучению механизмов адаптации к гипоксии.

В настоящее время наступает новый этап в изучении гипоксии, а именно: выяснение молекулярных механизмов адаптации и регуляции этого состояния на уровне отдельных белков и рецепторов, чему и посвящена настоящая работа.

Диссертант поставил перед собой задачу найти новые типы сигнальной регуляции, реализующиеся при гипоксии через активацию недавно открытых транскрипционного фактора HIF-1 α и сукцинатного рецептора GPR91, которые участвуют в запуске адаптационных процессов при гипоксии, и как эти системы проявляются на моделях животных с различной чувствительностью к гипоксии. Использование этих моделей имеет большое значение в практическом плане потому, что неустойчивые к гипоксии животные близки по протекающим в них биохимическим процессам к ослабленным больным. На этих двух моделях в ряде лабораторий мира было показано, что те факторы, которые оказывают значительный защитный эффект у неустойчивых к гипоксии ослабленных животных, могут по-другому и даже отрицательно влиять на животных с повышенной устойчивостью к гипоксии.

Следовательно, биохимические процессы у них различны. В связи с этим хочу ещё раз подчеркнуть большую актуальную значимость рецензируемой работы.

Хочу отметить, что работа Э.Ю. Кировой выполнена на огромном по количеству экспериментов материале. В ней представлено 55 рисунков и 15 таблиц с большим информационным материалом в каждом. Всё это автор удачно обобщает в «Заключениях» по каждой из глав раздела «Результаты», а также в общем разделе «Обсуждение результатов». Диссертация изложена на 280 страницах и в ней приведено 642 литературных источника.

В работе впервые убедительно доказано существование сукцинатзависимой сигнальной регуляции систем, участвующих в формировании как срочных, так и отсроченных молекулярных механизмов адаптации организма к гипоксии. Показано, что механизм действия сукцината при изучении этих систем связан не с тем, что он является субстратом дыхания, а с его сигнальной функцией, реализующейся через активацию факторов транскрипции HIF-1 α и GPR91.

Диссертантом установлено, что в условиях нормоксии существует не только тканеспецифические, но и феноспецифические различия в содержании HIF-1 α , так что у низкоустойчивых к гипоксии животных уровень этой сигнальной системы достоверно выше, чем у устойчивых животных. Показано, что при однократном гипоксическом воздействии наибольшая зависимость срочной экспрессии HIF-1 α от концентрации кислорода была также характерна для нейронов низкоустойчивых крыс, следовательно система HIF-1 α используется при формировании срочных механизмов адаптации преимущественно у этого фенотипа, а высокая исходная толерантность к гипоксии высокоустойчивых животных обеспечивается другими механизмами.

Срочная резистентность зависит от активности как сукцинатоксидазного окисления в комплексе МФКII, так и от ГАМК-шунта, т.е. регулируется сукцинатом как эндогенного, так и экзогенного происхождения. Автором впервые показано, что в систему активации HIF-1 α включается белок теплового шока БТШ90, а также установлена возможная роль HIF-1 α как индуктора фактора роста сосудов.

При курсовом ежедневном однократном введении, которое обычно используется с лечебной целью, автором было установлено, что экспрессия HIF-1 α у ослабленных животных индуцируется только в первые несколько дней и коррелирует с повышением толерантности организма к дефициту кислорода. Эти данные позволили автору определить оптимальные условия для срочной экспрессии HIF-1 α .

В работе получены инновационные данные, свидетельствующие о принципиальных различиях в механизме формирования толерантности к дефициту

кислорода низкоустойчивых и высокоустойчивых к острой гипоксии животных, что подробно отражено в заключительной части раздела по изучению HIF-1 α рецептора.

В следующем большом разделе изучена роль сукцинатного рецептора в формировании процессов адаптации организма к гипоксии. Установлено, что при нормоксии наблюдается гетерогенность в плотности рецептора, активности СДГ и количестве сукцината. Наибольшее количество этого рецептора обнаруживается в ткани сердца. В этой же ткани обнаружено низкое базовое содержание янтарной кислоты и высокий уровень плотности сукцинатного рецептора. Показано, что сукцинат, введённый животному *in vivo* (3-8 инъекций), способствует увеличению плотности рецептора в КГМ, т.е. выполняет роль лиганда этого рецептора. Хотелось бы узнать у диссертанта, как влияет введённый сукцинат на выносливость организма к гипоксии, развивается ли при этом резистентность к ней организма.

Плотность рецептора увеличивается, по данным диссертанта, во всех тканях и при однократном гипоксическом воздействии на организм в условиях умеренной гипоксии. Показано, что эта плотность увеличивается через 40-60 мин после воздействия, что совпадает по времени с периодом формирования срочной резистентности организма к гипоксии. При курсовой гипобарической гипоксии наблюдается дополнительное увеличение плотности сукцинатного рецептора, что наиболее проявляется в КГМ.

В работе также впервые изучено взаимодействие между фактором, влияющим на рост сосудов (VEGF) и сукцинатным рецептором. Установлено, что при однократном применении ГБГ в оптимальном режиме увеличению экспрессии сукцинатного рецептора предшествует индукция фактора роста сосудов и это взаимоотношение прослеживается на протяжении всего гипоксического периода. Именно в оптимальных условиях прослеживается корреляция этой динамики и при курсовом применении гипоксии, где также индукция фактора выявляется всегда позже, чем увеличение экспрессии сукцинатного рецептора.

Обнаружены также принципиальные различия в механизме индукции сукцинатного рецептора и сопряжённых процессов у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных.

Следующий большой раздел работы касается действия разных режимов гипоксии на состояние системы глутатиона и сопряжённых окислительно-восстановительных процессов в коре головного мозга. Это очень важный, с моей точки зрения, раздел в плане понимания процессов регуляции изучаемой адаптации. Значимость представленной в этом разделе работы определяется тем, что HIF-1 α и

GPR91 содержат легко окисляющиеся тиоловые группы, следовательно являются редокс-чувствительными белками.

Автором установлено, что функциональная активность системы глутатиона зависит, как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости гипоксии, т.е. она генетически детерминирована и различается у низкоустойчивых и высокоустойчивых животных. Что касается роли свободно-радикальных процессов в функционировании HIF-1 α и GPR91 белков, то автор, основываясь на своих результатах по определению гидроперекисей и продуктов ПОЛ, утверждает, что изменения в них происходят только при тяжёлых гипоксических воздействиях, из чего следует, что окисление SH-групп в HIF-1 α и GPR91 белках наблюдаются только при патологической стадии гипоксии. Из этого автор делает вывод о независимости срочной ответной реакции HIF-1 α и GPR91 при гипоксии от свободно-радикальных процессов.

В связи с этим у меня возникает вопрос, существуют ли в литературе данные о влиянии низких (микромольных, их ещё называют сигнальных) концентраций перекиси водорода на стабилизацию или активность HIF-1 α и GPR91. Не кажется ли вам, что изменения в свободно-радикальных процессах могут происходить и на первых стадиях гипоксии, когда даже небольшое образование перекиси водорода (до 1-2 мкМ) в дыхательной цепи, может активировать изучаемые автором тиол-содержащие белки. Известно, что в начале гипоксии из-за восстановления дыхательной цепи и повышения митохондриального мембранного потенциала может образовываться такое количество перекиси, которое трудно определяемо современными методами,

Вопрос этот возникает в связи с тем, что при изучении митохондриального АТФ – зависимого калиевого канала было показано, что микромольные концентрации перекиси водорода активируют канал. Сейчас полагают, что активация этого канала перекисью при создании эпизодов гипоксии лежит в основе положительного действия прекодиционирования, которое, кстати, снимается ингибиторами канала. Следовательно, предполагается, что формирование срочной ответной реакции при гипоксии связано с небольшим и проходящим увеличением перекиси водорода, влияющим, вероятно, на тиоловые группы белка-канала.

В последнем разделе работы автор показывает, что различные режимы гипоксии по-разному влияют на формирование срочной и отсроченной резистентности животных к гипоксии с различной устойчивостью к ней. К этой части работы у меня только одно техническое замечание, касающиеся того, что рисунки этого раздела, да и

ряда рисунков по всей диссертации, из-за перегрузки данными читать трудно. Нужно было их увеличить, особенно подписи внутри рисунков.

Высказанные в настоящем отзыве замечания по работе не подрывают общую стройность диссертации Юлии Игоревны Кировой. Представленная работа является законченным фундаментальным исследованием, где впервые изучен вопрос о влиянии индивидуальной толерантности животного к гипоксии на характер защитного ответа недавно обнаруженных сукцинатзависимых сигнальных систем, а также подробно изучена роль этих систем в формировании срочной и отсроченной адаптации организма к гипоксии. Работа аргументировано предлагает также практические рекомендации при выборе режимов гипоксического воздействия на организм с целью терапевтического применения прекондиционирования.

Диссертация написана и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Автореферат и опубликованные работы целиком отражают содержание диссертации. Основные выводы работы в достаточной степени аргументированы. Считаю, что диссертационная работа Э.Ю.Кировой «Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1 α и GPR91) при адаптации к гипоксии», отвечает требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук.

Заведующий лабораторией митохондриального транспорта
ФГУН Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН
заслуженный деятель наук РФ,
доктор биол. наук, профессор

Г.Д. Миронова



Имя: Миронова
Достоверно - Зам. Канц.
Е. П. Груздева
02.12.2016.

Миронова Галина Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель наук РФ, и.о. заведующий лабораторией митохондриального транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3. Тел. 8(495)532-78-69, факс (4967)33-05-53; mironova40@mail.ru.