

ОТЗЫВ

официального оппонента **Зинченко Валерия Петровича**
на диссертационную работу **Кировой Юлии Игоревны** на тему:
«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

Актуальность исследования. Диссертационная работа Ю.И. Кировой посвящена исследованию механизмов адаптации органов и тканей к гипоксии и путей восстановления их функциональной активности после гипоксии. В связи этим, актуальность исследования не вызывает сомнений.

Цель работы Ю.И. Кировой состояла в исследовании сигнального пути с участием сукцината, фактора транскрипции HIF-1 α и рецептора GPR91 в процессах адаптации клеток к гипоксии различной тяжести.

Научная новизна. В диссертационной работе установлено несколько новых фактов, которые, несомненно, будут использованы другими исследователями в данной области. Так, автором впервые показано, что индуцируемая гипоксией экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 α и рецептора GPR91 тканеспецифична и способствует развитию резистентности животных к дефициту кислорода. Впервые установлена прямая зависимость между экспрессией HIF-1 α , внутриклеточным содержанием сукцината и активностью СДГ в коре головного мозга (КГМ) при гипоксии. Подтверждено существование двух фенотипов крыс низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии. Наибольшие сдвиги параметров сукцинатной системы наблюдаются при адаптации к гипоксии у НУ животных. Впервые получены сравнительные данные о распределении в различных тканях сукцинатного рецептора GPR91 и корреляции его концентрации с внутриклеточным содержанием сукцината и СДГ. Впервые показано, что в

механизм гипоксической экспрессии HIF-1 α вовлечен белок теплового шока HSP90. Также впервые получены данные об активации сигнальной системы сукцината в КГМ агонистами β -адренергических рецепторов.

Теоретическая и практическая значимость работы не вызывает сомнений. Показано, что сукцинат-зависимая сигнальная система регуляции существует и является важным механизмом адаптации организма к гипоксии. Развита представления о молекулярно-клеточных механизмах индивидуальной толерантности организма к гипоксии. Показано, что неустойчивость к гипоксии коррелирует с высокими уровнями экспрессии HIF-1 α во всех тканях организма. Показано, что существуют оптимальные для экспрессии HIF-1 α и GPR91 режимы гипоксии. Сформированы новые терапевтические схемы применения сукцинат-содержащих препаратов в качестве активаторов толерантности организма к гипоксии. Таким образом, данные, полученные Ю.И. Кировой, вносят существенный вклад в развитие фундаментальных представлений о путях адаптации к гипоксии тканей и организмов с различным уровнем экспрессии HIF-1 α .

Обоснованность и достоверность результатов исследования. Диссертационная работа Ю.И. Кировой, представляет собой законченное научное исследование, выполненное с использованием современных физиологических, биофизических, молекулярных и биохимических методов исследования. Полученные результаты обработаны с помощью программных пакетов Statistica 6,0 и других, обеспечивающих достоверность и надежность выводов проведенной работы. Основные научные положения, выдвигаемые соискателем, достаточно полно изложены в опубликованных по теме диссертации 34 печатных работах, из которых 12 опубликованы в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Научные исследования Ю.И. Кировой, неоднократно докладывались и обсуждались на конференциях российского и международного уровня.

Структура диссертации. Диссертация изложена грамотным литературным языком на 280 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов, что полностью соответствует стандартам описания научных исследований. Изложение собственных результатов включает 4 раздела, Работа содержит 16 таблиц и иллюстрирована 55 рисунками. Библиографический список включает 642 источников, из них 105 на русском языке.

Содержание работы. В общем введении диссертант обосновывает целесообразность проведения исследования, его научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Корректно формулирует цель, задачи диссертационной работы и положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор литературы по исследуемой тематике, в котором приведены общие сведения о молекулярных механизмах адаптации к гипоксии. Дано определение и подробно описаны две стадии формирования механизмов адаптации при нарушении доставки кислорода в клетку. Первая фаза индукции адаптации описана как срочный этап адаптационной реакции, который представляет собой реакцию активации различных сигнальных систем и реализуется на основе готовых, ранее сформированных физиологических механизмов и составляют основу для формирования отсроченных геном-зависимых защитных эффектов долгосрочной адаптации. Вторая фаза геном-зависимых реакций адаптации сопровождается экспрессией мРНК и синтезом белков *de novo*.

Особое внимание в обзоре уделено способности митохондрий к структурному ремоделированию и метаболическому репрограммированию в гипоксических условиях: обратимому подавлению электронтранспортной функции комплекса МФК I и компенсаторной активации МФК II, способствующей усилению синтеза АТФ. При этом, предполагаемые молекулярные механизмы данных явлений в обзоре не представлены, хотя и

говорится об их универсальности. То же можно сказать о стадии 2 «митохондриальная дисфункция».

Подробно описана роль HIF-1 в развитии адаптивных и патологических процессов. Рассмотрены механизмы стабилизации и транслокации HIF-1 α в ядро при гипоксии. Показано, что чувствительность HIF-1 к гипоксии связана с доменом кислород-зависимой деградации, локализованном в субъединице HIF-1 α . Описан также механизм ограничения кислород-независимой деградации субъединицы белком теплового шока HSP90. В отличие от системы передачи сигнала в ядро, механизмы срочной адаптации описаны слабо.

Достаточно полно представлены данные о сигнальной системе сукцинат-сукцинатный рецептор GPR91. Показано существование различных рецепторов сукцината, сопряженных либо с Gi/o белком в гемопоэтических клетках, либо с Gs белком в кардиомиоцитах. Несмотря на широкое распространение рецепторов, эффекты активации GPR91 для большинства тканей остаются не исследованными.

Экспериментальные результаты изложены в 4 разделах. Первый раздел посвящен исследованию роли HIF-1 α в ответной реакции организма на гипоксию. Показано, что содержание HIF-1 α в тканях крыс в нормоксических условиях очень низок и наблюдаются значительные различия в содержании HIF-1 α . Существует также обратная зависимость между базовым содержанием HIF-1 α в неокортексе и толерантностью животных к гипоксии: у НУ животных уровень HIF-1 α в КГМ был в 1,7 раза выше, чем у ВУ. Причем у НУ крыс количество нейронов с высоким содержанием HIF-1 α превышало количество аналогичных клеток у ВУ крыс в 5 раз.

Все режимы гипоксических воздействий, использованные в работе, уже через 15 мин индуцировали экспрессию ядерного HIF-1 α . При тяжелой гипоксии после кратковременной экспрессии HIF-1 α наблюдали снижение содержания HIF-1 α на 25-30% ниже исходного, что говорило о повреждающем воздействии гипоксии. Реоксигенация снижала уровень HIF-1 α до базовых значений, после

чего начиналось вторичное увеличение уровня HIF-1 α , которое развивалось в течении суток. Таким образом, автор обнаружил две волны экспрессии HIF-1 α : срочную (в течение первого часа воздействия) и отсроченную (через 24ч постгипоксического периода).

Повторные эпизоды гипоксии в КГМ НУ животных вызывали увеличение экспрессии HIF-1 α на протяжении восьми воздействий. Эта динамика коррелировала с динамикой формирования толерантности животного на системном уровне и была ограничена во времени несколькими днями после сеансов гипоксии.

Для оценки роли сукцината и активности МФК II в формировании срочной экспрессии HIF-1 α при гипоксии автором было измерено содержание сукцината в норме и в гипоксических условиях. Оказалось, что оно очень гетерогенно и не коррелировало с HIF-1 α . Через 15 мин после начала гипоксического воздействия в КГМ НУ крыс наблюдается увеличение содержания сукцината, уровня HIF-1 α и активности СДГ.

Далее автор оценивает роль ГАМК-шунта (превращения альфа-глутарата в ГАМК и далее в сукцинат) в наблюдаемом феномене накопления сукцината в КГМ при гипоксии. Как и предполагалось, ингибиторы шунта понижали сукцинат и HIF-1 α и ускоряли судороги при гипоксии.

Поскольку известно, что при слабых и умеренных гипоксических воздействиях белок теплового шока HSP90 усиливает аккумуляцию HIF-1 α , в следующем разделе автор исследует роль HSP90 в качестве фактора, ограничивающего деградацию HIF-1 α . Проведенные эксперименты показали, что гипоксия слабой и средней тяжести действительно индуцировала экспрессию HSP90 в КГМ НУ крыс, параллельно с экспрессией HIF-1 α , что могло способствовать реализации O₂-независимых механизмы стабилизации HIF-1 α .

В следующем разделе показано, что важным регулятором экспрессии HIF-1 α в условиях нормоксии и гипоксии являются β -адренорецепторы. Антагонист β_1 - и β_2 -адренорецепторов соталол вызывал быстрое увеличение экспрессии HIF-1 α в КГМ крыс, как в норме, так и после гипоксии.

Таким образом, в первой части работы показано, что существуют тканеспецифические и фенотипические различия в базовом содержании HIF-1 α , особенно в КГМ НУ и ВУ крыс. Установлено существование обратной зависимости между базовым содержанием HIF-1 α в КГМ и толерантностью животных к гипоксии. Впервые показано, что в условиях *in vivo* экспрессия HIF-1 α , действительно, сукцинат-зависима и контролируется двумя различными путями образования эндогенного сукцината при гипоксии: митохондриозависимым путем, связанным с репрограммированием работы дыхательной цепи, и механизмом образования сукцината при активации ГАМК-шунта в условиях гипоксии. Показано также, что в нейронах КГМ при неповреждающих режимах гипоксии возможна активация экспрессии HIF-1 α с участием белка теплового шока HSP90.

Вторая часть работы посвящена исследованию роли сукцинатного рецептора GPR91 в формировании механизмов адаптации к гипоксии. Здесь было определено базовое содержание рецептора в тканях крыс. Несмотря на то, что корреляция между плотностью GPR91, уровнем янтарной кислоты и содержанием СДГ в исследованных тканях отсутствовала, экзогенная янтарная кислота увеличивала содержание GPR91 в КГМ крыс. Увеличение внутриклеточного уровня сукцината в КГМ НУ крыс в ответ на гипоксическое воздействие также коррелировало с увеличением уровня GPR91 в первые 30 мин гипоксии.

В этой части работы автор также исследовал возможность адренергической регуляции плотности GPR91 и содержания сукцината в КГМ при гипоксии. $\beta_{1/2}$ -адреноблокатор соталола снижал плотность GPR91 и ингибировал увеличение содержания сукцината в КГМ крыс, что

свидетельствует о положительной регуляции β -адренорецепторами экспрессии GPR91, и содержания сукцината в нейронах.

Поскольку GPR91 может индуцировать HIF-1–независимую экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия VEGF и ангиогенез, то в последних параграфах этой части работы автор рассмотрел взаимодействие GPR91 и VEGF при разных режимах гипоксии. Во всех исследованных тканях увеличение плотности GPR91 коррелировало с увеличением экспрессии VEGF, однако гипоксическая индукция VEGF выявлялась всегда позже, чем происходило увеличение уровня рецептора. К тому же гипоксическая индукция рецептора во всех исследованных тканях происходила только в условиях умеренной гипоксии. Исходя из этого автор предположил, что индукция GPR91 связана с индукцией VEGF в КГМ крыс лишь при умеренных гипоксических воздействиях.

Для оценки роли редокс-сигналикации в гипоксической экспрессии HIF-1 α и GPR91 **в третьей части работы** диссертант рассматривает действие разных режимов гипоксии на состояние системы глутатиона и сопряженных окислительно-восстановительных процессов в коре головного мозга крыс. Для этого в работе было измерено содержание компонентов пула глутатиона, гидроперекисных метаболитов, продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в КГМ в условиях нормоксии и при разных режимах гипоксии.

Из полученных результатов следовало, что регуляторная антиоксидантная активность системы глутатиона и ее восстановительная способность сохранялись в КГМ обоих типов крыс на протяжении всего периода воздействия гипоксии легкой и средней тяжести, хотя у ВУ крыс она была несколько снижена по сравнению с НУ крысами. И лишь при воздействии тяжелой гипоксии в КГМ крыс наблюдалось достоверное увеличение содержания GSSG, гидроперекисей и ДК что указывало на развитие окислительного стресса, нарушение регуляторной функции глутатионового цикла, и дисбаланса про- и антиоксидантных систем. Таким образом, экспериментальные результаты свидетельствуют о независимости срочной ответной реакции HIF-1 α и GPR91 на гипоксическое воздействие слабой и средней тяжести от интенсивности

свободнорадикальных процессов при гипоксии. Из полученных данных следует, что для развития прекондиционирования необходимо выбирать режимы гипоксического воздействия, при которых не происходит развитие окислительного стресса.

В последней части экспериментальных результатов полученные выше данные сопоставлялись с влиянием разных режимов гипоксии на резистентность НУ и ВУ крыс к острой гипоксии. Мягкие режимы гипоксии индуцировали у НУ крыс кратковременное двукратное увеличение срочной резистентности к острой гипоксии. Резистентность ВУ крыс при этом значимо не менялась. Гипоксия средней тяжести увеличивала срочную резистентность к острой гипоксии в 8 раз у НУ крыс и в 5 раз у ВУ крыс. Через сутки после воздействия гипоксии у НУ крыс резистентность к острой гипоксии вторично увеличивалась в 2 раза, что коррелировало с экспрессией HIF-1 α . Воздействие тяжелой гипоксии увеличивало резистентность в гораздо меньшей степени. Формирование долговременной адаптации к гипоксии было установлено только у НУ крыс в условиях повторяющихся воздействий гипоксии средней тяжести. У ВУ крыс ни один из использованных режимов ГБГ при их курсовом применении не увеличивал резистентность к острой гипоксии, указывая на изначальную активацию механизмов срочной адаптации у этих животных.

В главе **обсуждение результатов** диссертант рассматривает индукцию сукцинат-зависимого фактора транскрипции HIF-1 α и сукцинатного рецептора GPR91 при гипоксии, как часть молекулярных механизмов срочной и отсроченной адаптации к гипоксическому стрессу и увеличению резистентности организма к острой гипоксии. Обсуждаются причины различий экспрессии HIF-1 α в тканях животных и в КГМ НУ и ВУ крыс. Проанализирована обратная зависимость между базовым содержанием HIF-1 α в нейронах КГМ и толерантностью животных к гипоксии. В результате, автор приходит к выводу, что при гипоксии в условиях *in vivo* в нейронах КГМ реализуется сложная, многокомпонентная система срочного регулирования стабильности HIF-1 α ,

включающая как образование сукцината, так и экспрессию HSP90, и обеспечивающая оптимальные условия для экспрессии HIF-1 α . В целом в работе доказано, что экспрессия HIF-1 α является сукцинатзависимым процессом, который потенцируется активацией СДГ при гипоксии (репрограммирование работы дыхательной цепи митохондрий), продукцией сукцината в цикле Робертса (ГАМК-шунт), гипоксической экспрессией HSP90 и ограничивается β -адренергической сигнализацией.

Резюмируя данные о вовлеченности GPR91 в формирование адаптивных механизмов как у НУ, так и у ВУ крыс, автор заключает, что метаботропный сукцинатный рецептор GPR91 может рассматриваться как триггерный механизм, потенцируемый сукцинатом, эффекты которого реализуются по типу аутокринного сигнала и с участием β -адренергической системы в формирование срочных и отсроченных адаптивных реакций. Учитывая, что активация GPR91 сукцинатом может инициировать сигнальные каскады через Gq- и Gi-белки, сопряженные с внутриклеточной мобилизацией Ca²⁺, активацией ERK1/2, и ингибированием аккумуляции цАМФ, автор полагает, что система сукцинат-GPR91 может функционировать как более чувствительный сенсор гипоксии, чем HIF-1 α .

В заключении диссертант обсуждает перспективы применения результатов исследования сукцинат-зависимых механизмов формирования срочной и отсроченной адаптации к гипоксии. Показанная в диссертации сукцинат-зависимая сигнальная регуляция, реализуется при гипоксии через активацию транскрипционного фактора HIF-1 α и рецептор GPR91, и направлена на формирование срочных и отсроченных молекулярных механизмов адаптации и резистентности организма к дефициту кислорода. Полученные данные позволяют обосновать клиническое применение сукцинат-содержащих препаратов для ускорения процессов адаптации и защиты организма в условиях гипоксии. Представленное исследование сукцинат-зависимых механизмов адаптации к гипоксии, открывает новые перспективы в изучении роли сукцината

и сопряженных систем в адаптационных процессах при ишемии и других нейроденеративных процессах.

Выводы диссертации адекватны, соответствуют поставленным задачам, и следуют из основных результатов выполненного исследования.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание и основные научные положения диссертационной работы.

Замечания и вопросы. Существенных замечаний к работе нет. В целом, работа Ю.И. Кировой, производит благоприятное впечатление, хотя ряд вопросов требует дополнительного пояснения. В основном они касаются обзора и упомянуты выше. В работе не исследована система передачи сигнала с рецептора, поэтому остается не ясным, каков тип рецептора и с каким G-белком он сопряжен, с G_i/Go и G_q , либо только с G_i , пути передачи сигнала с которых существенно различаются. В эксперименте везде присутствуют НУ и ВУ животные. Однако не ясно, существуют ли действительно две популяции, или взяты крайние случаи непрерывного распределения животных по параметрам потребления кислорода, и скорости фосфорилирующего дыхания.

Заключение. Диссертационная работа Ю.И. Кировой на тему «Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1 α и GPR91) при адаптации к гипоксии», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, представляет собой законченную работу, в которой содержится решение актуальной задачи участия сукцината, фактора транскрипции HIF-1 α и рецептора GPR91 в процессах адаптации клеток к гипоксии различной тяжести.

Совокупность полученных автором данных можно квалифицировать как новое крупное научное достижение.

Представленная диссертация Ю.И. Кировой, по актуальности, научной новизне, значимости, методическому уровню и достоверности полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г.

№842 с внесенными изменениями от 21.04.2016 г. №335, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией
внутриклеточной сигнализации
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
доктор биологических наук, профессор

Зинченко В. П.

«28» ноября 2016 г.

Заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
канд. биол. наук



Масулис И.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биофизики клетки Российской академии наук.
142290, г.Пушино Московской области,
Телефон: (495)925-59-84
E-mail: admin@ibfk.nifhi.ac.ru