

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУН

Институт физиологии им. И.П.Павлова

Российской академии наук

Член-корр.РАН Л.П.Филаретова

21.11.2016



ОТЗЫВ
ведущей организации на диссертацию Кировой Юлии Игоревны на тему
«Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (NIF-1 α и
GPR91) при адаптации к гипоксии», представленную на соискание
ученой степени доктора биологических наук по специальности: 14.03.03.
– патологическая физиология

Диссертационная работа Ю.И.Кировой посвящена изучению ключевой роли сукцинат-зависимого аппарата митохондрий в процессах адаптации к гипоксии и формировании гипоксической толерантности.

Актуальность темы выполненной работы

Гипоксия - состояние кислородного голодания как всего организма, так и отдельных органов и тканей, возникающее при различных неблагоприятных внешних и внутренних воздействиях. Хроническая гипоксия наблюдается при многих патологических состояниях, включая болезни органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, крови, печени, почек, а также неврологические и нейродегенеративные расстройства. В связи с этим гипоксию можно считать одной из центральной проблем патологии, а изучение механизмов адаптации к ней и компенсации ее негативных последствий – актуальнейшей темой для биомедицинских исследований, направленных на разработку эффективных подходов к лечению большого числа ассоциированных с гипоксией заболеваний. Именно этим вопросам и

посвящена диссертационная работа Ю.И.Кировой, что обуславливает ее актуальность и важность.

Как известно, в основе патологического действия гипоксии лежит дефицит энергетического обеспечения процессов жизнедеятельности клеток. Поэтому фокус исследований Ю.И.Кировой закономерно направлен на изучение регуляторной роли митохондрий (в частности, особенностей работы субстратного участка дыхательной цепи) при формировании адаптивных реакций в условиях дефицита кислорода. В мировой литературе данные по этому значимому для практической медицины вопросу отсутствуют, что определяет инновационность выбранного в диссертации направления и подчеркивает его новизну и приоритетность.

Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Планы биомедицинских наук тесно связаны с обеспечением здоровья граждан, что является необходимым условием для успешного прогресса народного хозяйства любого государства. Среди приоритетных направлений соответствующих научных отраслей – физиологии, патофизиологии и медицины, центральное место занимает борьба с социально-значимыми заболеваниями. Как уже отмечалось выше, значительная часть этих заболеваний каузально связана с клеточной и тканевой гипоксией, поэтому их эффективная профилактика и лечение невозможны без раскрытия механизмов, стимуляция которых приведет к адаптационным процессам. Диссертационное исследование Ю.И.Кировой впервые раскрывает один из таких механизмов, связанный с внутриклеточными сукцинат-зависимыми сигнальными системами. В исследованиях Ю.И.Кировой выявлены молекулярные мишени, которые следует использовать для разработки новых превентивных и терапевтических технологий, соответствующих нескольким направлениям Перечня критических технологий РФ - Биомедицинские и ветеринарные технологии, геномные, протеомные и постгеномные

технологии, а также технологии снижения потерь от социально значимых заболеваний.

Структура и содержание работы

Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану: включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты экспериментальных исследований», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Материал диссертации достаточно хорошо проиллюстрирован 55 рисунками и 16 таблицами. Список цитированной литературы включает 642 источника, из них 105 – отечественные, 537 – зарубежные.

Во Введении убедительно обосновывается актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также сформулированы цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту. Обзор литературы посвящен изложению и анализу известных механизмов гипоксии и адаптации к ней, начиная от классических теорий системной адаптации и до современных представлений о ее молекулярно-клеточных основах. Обзор четко сконцентрирован на предмете исследования – двух сукцинатзависимых сигнальных системах - транскрипционном факторе HIF-1 α и рецепторе сукцината GPR91, а также роли сукцината в развитии и реализации быстрой или отсроченной адаптации к гипоксии. Автором собран и проанализирован очень большой материал, доказывающий и развивающий концепцию о том, что ключевым адаптационным событием в условиях гипоксии является репрограммирование дыхательной цепи митохондрий. В последнее время эта новая концепция, сформулированная в результате многолетних исследований профессором Л.Д.Лукьяновой, широко признана специалистами и считается практически классической. По нашему мнению, она должна быть включена в учебные программы ВУЗов по биоэнергетике, и представленный в диссертации Ю.И.Кировой прекрасный Обзор может стать

основой для соответствующего учебника. Удачной находкой автора является завершение Обзора подразделом Заключение, который в краткой концептуальной форме суммирует обширную информацию, приведенную в Обзоре.

В разделе Материалы и Методы исследования описаны методические подходы, основанные на применении физиологических, биохимических, гистологических, фармакологических, иммуноцитохимических методов, комбинацию которых для решения поставленных в работе задач следует признать очень успешной. Для обработки результатов применяли набор из четырех методов математической статистики, что не позволяет сомневаться в достоверности представленных в работе сведений.

Самый обширный раздел работы – Результаты экспериментальных исследований, состоит из четырех подразделов, посвященных разным аспектам проблемы. Учитывая огромный экспериментальный материал, подобное деление выглядит целесообразным. Первый подраздел содержит описание полученных автором данных об изменениях экспрессии HIF-1 α в различные периоды гипоксии и после нее, с применением различных гипоксических воздействий и разделением животных на низко- и высокоустойчивых, далее фокус перемещается на анализ роли сукцинатного рецептора GPR91 в этих процессах. В результате детально охарактеризованы паттерны экспрессии данных двух регуляторных молекул, что позволило выявить закономерности их вовлечения в срочные и долгосрочные процессы адаптации к гипоксическим воздействиям и их особенности у низко- и высокоустойчивых животных. Следующими интересными фрагментами работы являлось исследование возможных up-stream и down-stream механизмов, в частности, окислительно-восстановительных реакций, антиоксидантного статуса, белков теплового шока и транскрипционной мишени фактора HIF-1 VEGF. Каждый из подразделов Результатов завершается обобщающим Заключением, кратко но емко суммирующим наиболее важные факты данного подраздела, что очень удобно для читателя.

В разделе Обсуждение результатов систематизировано анализируются и обобщаются полученные данные, на основе чего формулируется обновленная концепция о сукцинат-зависимых механизмах адаптации к гипоксии, увеличения резистентности к ней, а также взаимодействию ключевых звеньев этих механизмов с другими факторами. Сформулированные концепции наглядно проиллюстрированы схемами и таблицей и детально отражены в Выводах.

Диссертационная работа Ю.И.Кировой написана прекрасным академическим языком, безупречным по стилю и логике, четким и ясным. Замечаний по работе нет. Однако после ознакомления с работой остается ряд вопросов:

1. Режим ОГБГ7000 обозначен в работе как «тяжелая повреждающая». По каким параметрам оценивалось повреждающее действие данного режима?
2. Как автор объясняет тот факт (с функциональной точки зрения), что у НУ животных антиоксидантная защита в ткани мозга более эффективна? Говорит ли это о том, что антиоксидантная (глутатионовая) система не вовлекается в формирование гипоксия-устойчивого фенотипа?
3. С какой целью автор измерял площадь каждой иммунореактивной клетки (стр. 84, описание количественного анализа иммуногистохимических препаратов)? Большинство использованных в работе антигенов имеют специфическую внутриклеточную локализацию, поэтому по иммуногистохимической окраске судить о размерах клетки некорректно.

Заданные вопросы ни в коей мере не снижают высокой оценки рассматриваемой работы. Не вызывает сомнений что все результаты получены автором лично, достоверны, опубликованы в престижных изданиях, входящих в список ВАК, и апробированы на международных и российских конференциях.

Новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

На основе обширных экспериментальных доказательств, полученных в диссертационной работе Ю.И.Кировой, сформулирована новая фундаментальная концепция, постулирующая существование целостной сукцинат-зависимой регуляторной системы как важнейшей системы адаптации к гипоксии, участвующей в формировании гипоксической толерантности мозга и организма в целом. Впервые детально охарактеризована роль основных компонентов системы (сукцината, индуцибельной альфа-субъединицы фактора HIF-1, сукцинатного рецептора GPR91) и закономерности их взаимодействия между собой и с другими факторами (ГАМК-шунтом, белками теплового шока, бета-адренорецепторами, VEGF, антиоксидантной системой). Выявлены особенности вовлечения компонентов системы при гипоксических воздействиях в различных органах и тканях организма, а также у низко- и высокоустойчивых крыс.

К наиболее важным новым фактам, установленным в работе, на наш взгляд относятся следующие: показана обратная зависимость между базальным содержанием HIF-1 α и толерантностью животных к гипоксии, тогда как степень индукции HIF-1 α в ответ на гипоксию коррелирует с адаптивным ответом; установлено, что срочная гипоксическая индукция HIF-1 α зависит от сукцинооксидазного окисления, а также сукцината, сопряжено продуцирующегося в цикле Робертса (ГАМК-шунте); локализация сукцинатного рецептора GPR91 тканеспецифически коррелирует с внутриклеточным содержанием сукцината и сукцинатдегидрогеназы и его индукция осуществляется сукцинатзависимо; выраженная гипоксическая индукция экспрессии рецептора во всех тканях наблюдается только при наиболее протективном режиме гипоксии – ГБГ5000 и коррелирует с формированием толерантности; в этих же условиях максимально индуцируется экспрессия VEGF, что свидетельствует о сопряженности этих

процессов. Совокупность полученных новых сведений, характеризующих индукцию HIF-1 α в различных гипоксических условиях у животных с разной устойчивостью к гипоксии, и особенности его взаимодействия с другими регуляторными механизмами позволила сформулировать обоснованные выводы и практические рекомендации, вносящие существенный вклад в развитие современной теории и имеющие высокий трансляционный потенциал.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Полученные в диссертации сведения и разработанная на их основе новая концепция митохондриальных основ адаптации и повышения устойчивости к гипоксии вносят значительный фундаментальный вклад в понимание этих процессов. Значение данной диссертационной работы для современной науки сложно переоценить. Наряду с высокой теоретической значимостью в работе получены сведения, которые несомненно, будут полезны для медицинской практики. Особенно интересным и важным с практической точки зрения являются выявленные в работе особенности эффективности сукцинат-зависимых механизмов при низкой и высокой устойчивости к гипоксии. Показано, что гипоксическое воздействие средней тяжести (ГБГ5000) оптимально для индукции HIF-1 α , GPR91 и VEGF, а гипоксическая тренировка 8 сеансами умеренной гипоксии вызывает прогрессирующее нарастание экспрессии HIF-1 α , однако после 12 сеанса эта способность индуцировать HIF-1 α снижалась. Принимая во внимание, что в работе также показана корреляция между срочной индукцией HIF-1 α и формированием гипоксической толерантности у низко- и высокоустойчивых особей, эти данные должны учитываться при разработке режимов гипоксического прекоондиционирования и гипоксической тренировки, применяемых с целью повышения резистентности организма к гипоксии и в особенности гипоксической толерантности мозга.

Таким образом, выводы и рекомендации диссертационного исследования Ю.И.Кировой имеют высокую значимость в свете современных трендов развития персонализированной медицины и указывают на потенциальные мишени для повышения гипоксической устойчивости, то есть открывают новые возможности для создания новых подходов таргетной медицины.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы диссертационной работы целесообразно учитывать в научно-исследовательской работе ФГБУН Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАН, ФГБНУ НИИ экспериментальной медицины, НИИ фармакологии им.В.В.Закусова РАН, Института цитологии и генетики СО РАН, на кафедрах биохимии, физиологии, патофизиологии ведущих университетов страны, включая Московский государственный университет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад. И.П.Павлова.

Рекомендации по использованию материалов диссертации в учебных целях

Материалы диссертации Ю.И.Кировой рекомендуется использовать при чтении курсов лекций по физиологии, патофизиологии, биохимии, биоэнергетике, при подготовке специалистов-физиологов, патофизиологов, фармакологов и врачей различных профилей. По нашему мнению на основе материалов диссертации целесообразно создать учебник для ВУЗов, который также будет интересен и полезен более широкой аудитории специалистов разных областей физиологии и медицины.

Заключение

Диссертационная работа Кировой Юлии Игоревны «Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1 α и GPR91) при адаптации к гипоксии (экспериментальное исследование)» является законченной научно-квалификационной работой, посвященной актуальной теме, в которой на основании выполненных автором исследований разработано новое направление по изучению сукцинатзависимой системы (HIF-1 α и GPR91), впервые создана научная концепция о роли данной системы в адаптации к гипоксии и особенностях функционирования этой системы в зависимости от индивидуальной устойчивости, сделаны рекомендации по персонализированному фармакологическому и немедикаментозному (дозированные гипоксические воздействия) повышению резистентности организма, а также отдельных органов и тканей. Совокупность основных положений работы можно квалифицировать как научное достижение, которое вносит существенный вклад в решение приоритетной задачи практического здравоохранения - повышения толерантности организма и мозга к гипоксии.

Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, Кирова Юлия Игоревна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология».

Отзыв составлен заведующим лабораторией регуляции функций нейронов мозга, заведующим отделом физиологии и патологии высшей нервной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, д.м.н., профессором Самойловым Михаилом Олеговичем. Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории регуляции функций нейронов мозга ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН 18.11.16 г., протокол № 4.

Отзыв направляется в Диссертационный совет Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8).

Заведующий отделом физиологии и патологии
высшей нервной деятельности,
заведующий лабораторией регуляции
функций нейронов мозга
ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
доктор медицинских наук
(03.03.01 – физиология),
профессор

М.О. Самойлов



Самойлов
Самойлов М.О.
Винькаристе

адрес: 199034, Санкт-Петербург, Васильевский остров, набережная
Макарова, д. 6, direkcija@kolt.infran.ru, tch@infran.ru,
samoilov@pavlov.infran.ru; (812) 328-0701, (812) 328-1301, (813) 70-72-501.