

ОТЗЫВ

главного научного сотрудника Лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Министерства здравоохранения Российской Федерации, д. м. н. профессора Всеволода Григорьевича Пинелиса на диссертацию Сергеевой Светланы Павловны «Закономерности изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ишемического инсульта» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология и 3.1.24. Неврология.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Сергеевой Светланы Павловны «Закономерности изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ишемического инсульта» является актуальной прежде всего, потому что, несмотря на интенсивные и многочисленные исследования, а проблеме уже более 100 лет, молекулярные механизмы их функционирования в норме, а особенно в патологии, окончательно не изучены. Основное внимание уделено изучению молекулярных механизмов апоптоза как основного механизма повреждения и гибели нейронов при ишемическом инсульте. Апоптоз - это сложный энергозависимый процесс регулируемого разрушения клетки. Он считается одним из основных механизмов гибели нейронов при различных повреждениях головного мозга, в том числе и при развитии ишемического инсульта. Тяжесть клинических проявлений после развития инсульта связана с объемом поврежденной ткани и количеством погибших нейронов. Исходя из этого в экспериментальных исследованиях традиционно трактуется как положительный эффект уменьшения доли реализующих механизмы апоптоза нейронов после применения лекарственных субстанций и других воздействий. В рекомендациях по лечению ишемического инсульта одним из направлений нейропротекторной терапии выделяют ограничение реализации программируемой гибели нейронов. При этом общебиологическая роль апоптоза заключается в регуляции клеточного состава тканей. В нервной ткани головного мозга апоптоз также является одним из значимых механизмов нейропластичности. Такое противоречие в определении роли апоптоза в патогенезе повреждений головного мозга разной этиологии (и в особенности ишемического инсульта) представляет актуальную проблему фундаментальной медицины, отсутствие решения которой тормозит научный прогресс и ограничивает практические лечебно-профилактические мероприятия. Инсульт является одной из самых распространенных причин инвалидизации и стойкой утраты трудоспособности населения во всем мире. Его высокая распространенность, а также значительные ограничения в применении

реперфузионной терапии (единственно эффективного способа лечения с позиций доказательной медицины на сегодняшний день) обуславливают актуальность темы диссертационного исследования С.П. Сергеевой также и для клинической неврологии.

Научная значимость, теоретическая и прикладная ценность исследования определяется установлением следующих основных закономерностей:

1. Разработан уникальный комплексный подход с использованием современных биохимических, микроскопических, молекулярно-генетических исследований на значимом клиническом материале для изучения механизмов гибели нейронов мозга при ишемии мозга

2. Впервые на достаточной и однородной выборке данных о пациентах с острым ИИ определены закономерности динамики у них концентрации в периферической крови регулирующих апоптоз молекул системы Fas (sFas, sFasL, CD95 на CD3⁺ лимфоцитах) и TNF (TNF α , sTNF-R1).

3. Для острого периода ИИ характерно закономерное увеличение концентрации в крови растворимых регулирующих апоптоз факторов sFasL, sFas и TNF α по сравнению с контролем. При этом для растворимых эффекторов системы Fas свойственно прогрессивное нарастание их концентрации в течение всего острого периода, а для эффекторов системы TNF α характерна более сложная разнонаправленная динамика.

4. Впервые доказана взаимосвязь динамики концентрации гормонов стресс-реализующей системы (АКТГ, кортизола, адреналина, норадреналина) и вышеуказанных молекул гуморальной регуляции апоптоза, их влияние на динамику неврологического дефекта и психоэмоционального состояния пациентов после ИИ.

5. Впервые у пациентов, умерших в остром периоде ИИ, в их коре головного мозга выявлено закономерное пропорциональное приближенности к ишемическому очагу увеличение доли нейронов, экспрессирующих регулирующие апоптоз молекулы (каспаза-3, каспаза-8, p53, Fas, NOTCH 1) по сравнению с контролем, а также уменьшение доли нейронов, экспрессирующих молекулы, связанных с их выживанием и адаптацией (Faim2, c-fos, ERK_{1/2}, MAP2).

6. Доказано, что у пациентов после ИИ повышение уровня кортизола в крови сочетается с увеличением доли нейронов в коре головного мозга, реализующих апоптоз. Установлено наличие корреляции между уровнем в периферической крови растворимых молекул системы Fas и долей нейронов, имеющих на своей поверхности их трансмембранную форму. Также выявлены связи обоих с экспрессией в нейронах каспаз и маркеров нейрональной активации Faim2, c-fos, ERK_{1/2}, MAP2.

7. Соотношение уровней растворимых регулирующих апоптоз рецепторов и лигандов в крови при поступлении пациента с ИИ в стационар целесообразно использовать для прогноза исхода его острого периода.

8. Эффекты и роль регулирующих апоптоз лиганд-рецепторных взаимодействий в патогенезе ИИ зависят от времени, прошедшего с момента его манифестации.

9. Динамика содержания в периферической крови кортизола и АКТГ в определенной мере отражает состояние стресс-реализующей системы в остром периоде ИИ. Однако, их уровни находятся в рамках диапазона общепопуляционной нормы, что необходимо учитывать в совокупности с другими показателями.

10. В остром периоде ИИ в коре головного мозга наблюдается закономерное увеличение по сравнению с контролем доли нейронов, экспрессирующих регулирующие апоптоз молекулы.

11. Апоптоз нейрона, с одной стороны, может быть звеном патогенеза и приводить к усугублению тяжести состояния пациента, а с другой, - адаптивным механизмом нейропластичности. Для трактовки роли апоптоза при ИИ необходимо учитывать уровень изучения системы (синапс, нейрон, нейронная сеть, нервная ткань головного мозга, целостный организм пациента, социальная адаптация пациента, общество) и критерии адаптивности ее ответа.

12. Получен патент №2517471 на основании данных о соотношении концентраций растворимых регулирующих апоптоз рецепторов и лигандов при поступлении пациента с ИИ в стационар, что позволяет использовать для прогноза исхода его острого периода. В ходе настоящего исследования разработаны и введены новые информативные интегративные показатели для оценки как текущего состояния пациентов, так и его прогноза.

12. Наконец, большое научно-практическое значение имеют 17 опубликованных статей в отечественных журналах и 1 статья в зарубежном журнале с высоким импакт фактором.

13. Статистическая обработка данных проводилась при помощи программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для проверки гипотезы о законе распределения данных применяли критерий Пирсона, критерий χ^2 и критерий Колмогорова-Смирнова. При неподтверждении нормальности распределения у выборки указывали медиану, в скобках приводили нижний квартиль и верхний квартиль. Для работы с такими выборками использовали непараметрические методы. При подтверждении нормальности распределения количественные данные представляли в виде среднего (M) \pm стандартное отклонение (SD). Для сравнения средних использовали параметрические методы анализа. Оценка уровня значимости различия двух выборок (p-уровень) проводилась при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ и $p < 0.001$.

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

14. Выносимые на защиту научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации четко обоснованы автором полученными результатами исследования и опубликованы в 18 статьях, из которых 17 вышли в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, утвержденный ВАК при Минобрнауки России, а 1 статья в зарубежном журнале с высоким импакт фактором. Статьи и патент соответствуют теме диссертационного исследования и отражают его содержание.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Высокая достоверность результатов обеспечена использованием при выполнении исследования современных стандартизированных общепринятых методов и валидных шкал. В работе использовано сертифицированное оборудование и реактивы, соблюдались инструкции работы с ними. Дизайн исследования адекватен поставленной цели и задачам. Статистическая обработка данных выполнена на современном уровне. Полученные Сергеевой С.П. данные не противоречат и сопоставимы с результатами других отечественных и зарубежных исследовательских групп.

Впервые на достаточной и однородной выборке данных о пациентах с острым ИИ определены закономерности динамики у них концентрации в периферической крови регулирующих апоптоз молекул системы Fas (sFas, sFasL, CD95 на CD3⁺ лимфоцитах) и TNF (TNF α , sTNF-R1). Выявлено существенное влияние величины и динамики соотношения концентраций факторов гуморальной регуляции апоптоза (sFasL и sFas; TNF α и sTNF-R1) на особенности клинического течения и прогноз исхода острого периода ИИ. Определено, что роль регулирующих апоптоз лиганд-рецепторных соотношений системы Fas и TNF α в патогенезе ИИ зависит от времени, прошедшего с момента его начала, а также от функционального исхода острого периода ИИ. Впервые доказана взаимосвязь динамики концентрации гормонов стресс-реализующей системы (АКТГ, кортизола, адреналина, норадреналина) и вышеуказанных молекул гуморальной регуляции апоптоза, их влияние на динамику неврологического дефекта и психоэмоционального состояния пациентов после ИИ. Впервые у пациентов, умерших в остром периоде ИИ, в их коре головного мозга выявлено закономерное пропорциональное приближенности к ишемическому очагу увеличение доли нейронов, экспрессирующих регулирующие апоптоз молекулы (каспаза-3, каспаза-8, p53, Fas, NOTCH1) по сравнению с контролем, а также уменьшение доли нейронов,

экспрессирующих молекулы, связанных с их выживанием и адаптацией (Faim2, c-fos, ERK_{1/2}, MAP2). Доказано, что у пациентов после ИИ повышение уровня кортизола в крови сочетается с увеличением доли нейронов в коре головного мозга, реализующих апоптоз. Установлено наличие корреляции между уровнем в периферической крови растворимых молекул системы Fas и долей нейронов, имеющих на своей поверхности их трансмембранную форму. Также выявлены связи обоих с экспрессией в нейронах каспаз и маркеров нейрональной активации Faim2, c-fos, ERK_{1/2}, MAP2.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Результаты настоящей работы имеют значимость как для фундаментальной медицины, так и для клинической неврологии.

Автор обоснованно определяет ишемию головного мозга как отдельную типовую форму патологии, а апоптоз как неспецифический механизм адаптации к последствиям ишемического повреждения головного мозга. Такой подход интересен и стратегически важен для клинической тактики, а также для экстраполяции результатов экспериментальных исследований на клинические модели при разработке новых способов лечения ИИ, связанных с регулирующим воздействием на механизмы инициации и реализации апоптоза.

Автором впервые предложено фундаментальное понятие «запрос системы на адаптацию». Оно представляет собой совокупность изменений всех факторов окружающей объект среды, которая приводит к изменению параметров ее функционирования. На основании этого понятия сформулирована концепция о закономерностях изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ИИ. Эта концепция учитывает, что изменение каждого фактора в отдельности (например, взаимодействие рецепторов смерти Fas на нейроне с лигандами) не является ключевым событием для определения судьбы клетки, но создает прецедент для начала конкуренции многоуровневых внутриклеточных каскадов за энергию и вторичные мессенджеры. Определяющим является совокупность всех факторов микроокружения в текущий момент времени (или «запрос системы на адаптацию»). Автор также формулирует принцип управления механизмами регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ИИ, который заключается в целенаправленном моделировании и последовательной модификации текущего запроса на адаптацию.

Оценка содержания диссертации

Диссертация традиционно составлена и оформлена в соответствии с рекомендациями ВАК РФ. В ее состав входит оглавление, введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования. В пяти последующих главах представлены результаты собственных исследований. В восьмой главе приведено обсуждение полученных автором результатов,

формулируется авторская концепция регуляции процесса апоптоза нейронов в головном мозге в остром периоде ИИ. Также в этой главе автором сформулирован принцип управления механизмами регуляции апоптоза нейронов головного мозга в остром периоде ИИ. Далее приведены выводы, практические рекомендации и список использованной литературы, включающий 1300 современных зарубежных и отечественных источников.

В главе 1 приведен обзор современной научной отечественной и зарубежной литературы об апоптозе нейронов при ишемическом инсульте, закономерностях нейрогуморальной регуляции при ишемическом инсульте, а также влиянии нейрогуморальных механизмов регуляции на апоптоз нейронов. Тема раскрыта полностью, вопросы глубоко проанализированы.

В главе 2 представлено описание пациентов, материалов и методов исследования. Объектами исследования были пациенты после ишемического инсульта в бассейне левой или правой средней мозговой артерии. Материалом исследования были периферическая кровь и образцы коры головного мозга.

Изложены методы проведения клинического неврологического обследования пациентов и определение их психоэмоционального статуса с использованием специальных шкал для объективизации полученных данных. Подробно приведены методы выявления и анализа содержания в периферической крови БАВ и клеточных элементов. Описание методики предварительной обработки и изучения образцов ткани коры головного мозга дано очень подробно. Хорошо описаны методы статистической обработки. Отдельное внимание автор уделила описанию этических аспектов работы.

В главах 3-7 приведены результаты собственных исследований автора. Описаны данные о закономерностях динамики концентрации растворимых регулирующих апоптоз молекул системы Fas и TNF и мембранных рецепторов Fas (CD95) на СЭЗ-позитивных лимфоцитах. Затем - о динамике содержания эффекторов стресс-реализующих систем (АКТГ, кортизола, адреналина, норадреналина, IL-6) в периферической крови, а также выраженности стресса, тревоги, депрессии у пациентов в остром периоде ИИ. Представлены результаты корреляционного, кластерного, ретроспективного анализа полученных данных. Описаны новые, выявленные в работе, прогностические и диагностические маркеры. Обращает на себя внимание большой объем графического материала.

В 7-ой главе описаны результаты гистологического и иммуногистохимического исследования образцов коры головного мозга. Описаны закономерности экспрессии регулирующих апоптоз молекул, а также маркеров активации в нейронах головного мозга у пациентов из группы исследования с летальным исходом. Иммуногистохимическим методом автор выявляла NSE, GFAP, белок p53, каспаза 3, каспаза 8, Fas; FasL, Faim2, C-Fos, ERK_{1/2}, NOTCH1). Особенностью работы и сильной стороной ее дизайна является возможность выполнения корреляционного анализа между

показателями экспрессии выявляемых белков в коре головного мозга и концентрацией в крови гуморальных до летального исхода того же пациента.

В обсуждении автор обобщает полученные результаты, формулирует выявленные закономерности изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ишемического инсульта, сопоставляет свои данные с данными других исследователей. Определяет роль апоптоза нейронов головного мозга в патогенезе острого периода ИИ. Формулирует концепцию регуляции процесса апоптоза нейронов в головном мозге в остром периоде ИИ, а также принципы управления его механизмами.

В качестве замечаний по тексту изложения диссертационной работы я бы рекомендовал в будущем переформулировать отдельные высказывания, чтобы сократить их в объеме и упростить восприятие материала. Также я рекомендовал бы сократить объем иллюстративного материала, а в главе 6 структурировать, сократить и разделить слишком громоздкие таблицы с коэффициентами корреляции.

Рекомендую также в приложении привести шкалы, которые автор использовал при проведении клинической части исследования.

Высказанные замечания не отменяют научной новизны, теоретической и практической значимости настоящего диссертационного исследования.

При рецензировании работы возникли следующие вопросы:

1. Вы выявляли в своей работе патогенетические подтипы ишемического инсульта. Имелись ли достоверные различия по каким-либо исследованным вами параметрам между группами пациентов с разными патогенетическими подтипами инсульта?

2. Опишите подробнее группу контроля для патоморфологической части исследования.

3. Каков механизм влияния гормонов стресс-реализующей системы на показатели экспрессии маркеров нейрональной активации в коре головного мозга? Имеется ли корреляционная связь между изученными показателями у здоровых и больных ИИ?

4. Различалась ли тактика ведения пациентов, умерших в остром периоде ИИ, материал которых Вы изучали в патоморфологической части работы?

5. Автор справедливо отмечает, что глутаматная эксайтотоксичность - один из ведущих механизмов патогенеза ИИ - может приводить к индукции апоптоза в нейронах головного мозга и ссылается на одну из наших последних работ (Efremov Y.M. et al., 2020). Однако согласно современным представлениям, в том числе и согласно нашим публикациям, пусковым механизмом развития глутаматной эксайтотоксичности являются гиперактивация глутаматных рецепторов и нарушения ионного гомеостаза и в частности, кальциевого гомеостаза. Причем Ca^{2+} является пусковым триггером всех выявленных при ИИ механизмов, в том числе молекулярных. Однако об этом в диссертации нет даже упоминания. Огромную роль в гибели нейронов

играют глутаматные рецепторы, которые запускают при ИИ гиперстимуляцию различного типа глутаматных рецепторов, в результате развивается отсроченная кальциевая дерегуляция и синхронная с ней митохондриальная деполяризация, которые запускают гибель нейронов как по пути некроза, так и апоптоза (см., работы Ходорова и другие наши работы). Некроз характеризуется отеком нейронов, а апоптоз уменьшением объема нейронов, так называемым shrinking эффектом. Изменения в содержании NSE, GFAP, cFos, cJun, провоспалительных цитокинов, отдельных гормонов характерны и для некроза, и для апоптоза. Но об этом даже не упоминается. Из недостатков отметил бы также отсутствие указаний на достоверность в подписях к рис. и табл., приходится искать только в тексте или на самих рисунках.

6. Автореферат и опубликованные работы отражают содержание диссертации.

Заключение

Диссертационная работа на соискание ученой степени доктора медицинских наук Сергеевой Светланы Павловны «Закономерности изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ишемического инсульта» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании самостоятельно выполненных ей исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение актуальной проблемы фундаментальной и клинической медицины, имеющей важное практическое и теоретическое значение. По своей актуальности темы, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация С. П. Сергеевой соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями, утвержденными постановлением Правительства Российской Федерации № 1168 от 01.10.2018 в редакции от 31.08.2019). Работа рекомендуется для подачи в диссертационный совет для защиты по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология и 3.1.24. Неврология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Министерства здравоохранения Российской Федерации,

д. м. н. профессор

В.Г. Пинелис

Подпись профессора, д.м.н. В.Г. Пинелиса «Удостоверяю»

Учёный секретарь ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», Минздрава России

кандидат медицинских наук

А.Г. Тимофеева

03 октября 2022 г.

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России
119296, Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1

Телефон: +7499-134-30-83

Официальный сайт: <http://nczd.ru>. Адрес электронной почты: fisenko@nczd.ru