

**ОТЗЫВ официального оппонента  
Гребенчикова Олега Александровича  
на диссертацию Шаковой Фатимат Мухамедовны  
«Механизмы дисрегуляции внутриклеточных нейропротективных систем  
при ишемическом повреждении головного мозга (экспериментальное  
исследование)», представленную на соискание ученой степени доктора  
медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология**

**Актуальность темы исследования**

Актуальность темы диссертационного исследования обусловлена тем, что из всех болезней сердечно-сосудистой системы именно инсульт привлекает особенно пристальное внимание. Это связано как с высокой смертностью при данном заболевании, так и со стойкой инвалидизацией даже в случае своевременно оказанной медицинской помощи. Кроме того, отмечается рост частоты встречаемости инсульта как среди лиц молодого возраста, так и пожилого населения. Независимо от причин, приведших к развитию инсульта, прогноз как для молодых, так и для пожилых пациентов остается достаточно сложным и зависящим от целого ряда причин, повлиять на которые либо крайне проблематично, либо невозможно. Прежде всего, это объем поврежденной ткани головного мозга, индивидуальные резервы организма, степень развитости коллатерального кровотока и толерантность к ишемии. Решающими факторами исхода ишемического инсульта являются: своевременная диагностика, сроки транспортировки в специализированные медицинские учреждения и эффективность проводимой терапии. Разноплановость данных проблем определяет важность поиска решений, способных если не предотвратить, то, по крайней мере, значимо снизить процент летальности и инвалидизации при данной патологии. В этих условиях поиск механизмов, которые потенциально могут раскрыть новые возможности стимуляции внутриклеточных защитных систем при ишемическом повреждении головного мозга, а впоследствии возможно станут новыми мишенями для новых терапевтических тактик, представляет несомненный интерес. В этой связи совершенно оправдана и корректно сформулирована цель диссертационной работы - изучить механизмы нарушения регуляции внутриклеточных нейропротективных систем в условиях острой ишемии и выявить возможные пути их коррекции.

Известно, что экспериментальные исследования нужны и могут быть эффективным инструментом в разработке новых технологий лечения инсульта в современных условиях. В последние годы опубликовано значительное количество статей, посвященных доклиническим и клиническим исследованиям лекарственных средств в ангионеврологии. Большая часть исследований была посвящена нейропротекторам - лекарственным средствам, которые направлены на

блокирование основных звеньев ишемического поражения головного мозга или на восстановление его поврежденной ткани. При этом, согласно данным обзоров и метаанализов, наблюдается разрыв между результатами экспериментальных и клинических исследований.

В настоящее время показано, что все специфические для нервной ткани процессы, характеризующие деятельность головного мозга в целом, такие как - передача импульса, синаптогенез, хранение и переработка информации, поддержание функциональной архитектоники мозга, образование функциональных сетей нейронов и прочее, очень тесно зависят от уровня энергетического гомеостаза. Исследования патогенетических механизмов ишемического инсульта, выполненные в минувшем десятилетии, показали, что ведущая роль в развитии повреждения нейронов принадлежит митохондриальной дисфункции, а поддержание структурно-функциональной стабильности митохондрий является основой эффективной нейропротекции. По данным ряда авторов, открытый в конце прошлого века транскрипционный коактиватор PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) является регулятором митохондриогенеза, митохондриальной динамики, аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток. Выбор этого регулятора, как объект исследования представляется своевременным, обоснованным и весьма перспективным для оптимизации подходов к патогенетической терапии ишемических инсультов.

### **Научная новизна исследования**

Новизна проведенного Шаковой Ф.М. исследования состоит, прежде всего, в том, что впервые получены данные по динамике транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  – координатора биогенеза митохондрий при ишемическом инсульте. Впервые показано, что нарушение регуляции внутриклеточных нейропротекторных систем вызывает устойчивую супрессию и деактивацию PGC-1 $\alpha$ , которая сопровождается развитием воспалительной реакции, инфильтрацией макрофагов в пенумбру, поражением микрососудистого русла, вторичной ишемизацией, увеличением пенумбры и вторичной постишемической гибелью нейронов. Эффективная индукция/активация PGC-1 $\alpha$  в периинфарктной зоне может осуществляться через стимуляцию специфических рецепторов (MCRs, SUCNR1), экспрессируемых всеми клеточными популяциями ткани мозга (нейронами, астроцитами, микроглиоцитами, олигодендроцитами), что может способствовать активации внутриклеточных нейропротекторных систем, в первую очередь, биогенезу митохондрий, снижению воспаления и уменьшению сенсомоторного и когнитивного дефицита. Впервые показано, что фармакологические препараты с



экспериментально и клинически подтвержденным нейропротекторным действием, реализуют свои эффекты посредством положительной модуляции транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ . Таким образом, в развитии ишемического повреждения ткани мозга выявлен единый механизм дизрегуляции внутриклеточных нейропротекторных систем – устойчивая супрессия и деактивация транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  – ключевого координатора биогенеза митохондрий и митохондриальной динамики, антиоксидантных систем, ангио- и синаптогенеза, противовоспалительной трансформации иммунцитов.

Полученные в диссертационном исследовании данные о роли транскрипционного коактиватора в процессах биогенеза митохондрий PGC-1 $\alpha$  и наиболее важных маркерах его активности, безусловно актуальны для более глубокого понимания патогенеза ишемического повреждения мозга и, в перспективе, могут быть использованы в фундаментальной и практической медицине при лечении последствий инсульта.

#### **Оценка содержания диссертации, её завершенности, замечания по оформлению**

Материалы диссертационной работы изложены на 225 страницах печатного текста, включают 30 рисунков и 7 таблиц, представляющих полученные результаты. Диссертация построена по традиционному плану и включает: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, главу с результатами экспериментального исследования, обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, который содержит 54 источника на русском и 288 источников на английском языках.

Глава «Обзор литературы» содержит определения используемых понятий, сведения о современных представлениях в данной области, перспективные направления для будущих исследований. Приведенные в этом разделе данные свидетельствуют об обоснованности цели и задач диссертационной работы. Описывая современные представления о патогенезе ишемического инсульта, автор дает характеристику ключевым этапам ишемического «каскада» - сложного комплекса нейрохимических процессов, включающего: клеточную энергетическую недостаточность, глутаматную эксайтотоксичность, окислительный стресс, дисфункцию гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), постишемическую аутоиммунную реакцию, патологический апоптоз и гибель нейронов. Дается характеристика PGC-1 $\alpha$  в соответствии с результатами исследований прошедшего десятилетия. Отдельный раздел посвящен современным подходам к нейропротекции, например, индукция биогенеза митохондрий рассматривается как новая терапевтическая стратегия. Известно, что митохондрии осуществляют

энергопродукцию, участвуют в пластическом обмене, контролируют выживание и гибель клеток, а митохондриальная дисфункция сопровождается неврологическими заболеваниями и острыми нарушениями мозгового кровообращения, что служит основанием рассматривать митохондрию как значимую мишень для фармакологических воздействий при ишемии мозга. В целом, литературный обзор отражает хорошую ориентированность автора в сфере его научных интересов и дает читателю полноценное представление о современном состоянии проблемы, решаемой в диссертации.

Для объективного изучения патоморфологических, биохимических и ультраструктурных процессов, происходящих в ЦНС при ишемическом повреждении различных структур головного мозга, а также оценки функциональных нарушений и поиска способов фармакологической коррекции необходимо использовать экспериментальные модели, воспроизводящие патологический процесс с высокой точностью. Арсенал методов, примененных диссертантом для решения экспериментальных задач, достаточно разнообразен. Выбранная автором экспериментальная модель селективного фотохимического ишемического повреждения головного мозга соответствует основным требованиям, предъявляемым к таким моделям - ишемический очаг стандартен по объему, локализации и легко воспроизводим из эксперимента в эксперимент. В опытах показано, что локальное ишемическое повреждение префронтальной коры вызывает селективные нарушения процессов выработки условных рефлексов и сохранения памятного следа, что позволяет оценить динамику функциональных нарушений и процессов восстановления интегративной деятельности ЦНС.

Использованы поведенческие тесты - условный рефлекс пассивного избегания, «открытое поле», «тест Морриса», позволяют объективно оценить сенсомоторный и когнитивный дефицит, вызванный ишемическим повреждением.

Методом иммуноблоттинга оценивали экспрессию коактиватора PGC-1 $\alpha$  и PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков; иммуногистохимически определяли внутриклеточную локализацию PGC-1 $\alpha$ . Иммуноферментный анализ (ИФА) применяли для оценки уровня белка S100b в сыворотке крови. Уровень нейромедиаторов в ткани мозга определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем повреждения головного мозга экспериментальных животных оценивали на магнитно-резонансном томографе. Проводилась морфометрическая оценка объема ишемического повреждения. Обзорное окрашивание гематоксилином-эозином серийных срезов использовали для оценки выраженности воспалительной реакции в области пенумбры. Окраску крезилковым фиолетовым по Нисслю применяли для оценки морфологии нейронов.



В первой серии экспериментов оценивали нейрохимические и морфофункциональные нарушения при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга и анализ действия препаратов с нейропротективной активностью в этих условиях. Во второй серии экспериментов изучали влияние ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  - ключевого регулятора митохондриогенеза, митохондриальной динамики, аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток и на уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  в перинфарктной зоне префронтальной коры головного мозга, а также оценивали потенциальную PGC-1 $\alpha$ -модулирующую активность препаратов с нейропротективным действием из разных фармакологических групп.

Завершается диссертационная работа обсуждением, кратким заключением и обоснованными выводами, отражающими основное содержание работы в полном соответствии с поставленными задачами, что свидетельствует о завершенности диссертационного исследования. Работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком теоретическом и методическом уровне, опирающейся на солидную методическую базу.

#### ***Замечания и вопросы по диссертации***

Принципиальных замечаний по диссертационному исследованию нет. В тексте встречаются опечатки и неточности, не снижающие ценность проведенного исследования.

При ознакомлении с экспериментальной частью работы возник вопрос: В рамках исследования проводился анализ действия широкого перечня препаратов с нейропротективной активностью в условиях ишемии. Чем обусловлен выбор именно этилметилгидроксипиридина сукцината и синтетического аналога АКТГ как потенциальных модуляторов активности PGC-1 $\alpha$ ?

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

#### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Представленные в диссертации Ф.М. Шаковой. положения и выводы полностью обоснованы экспериментальными данными. Поведение и когнитивные функции крыс были изучены с помощью современных, большей частью автоматизированных, методов и рекомендованных протоколов их применения, что повышает надежность полученных данных. С помощью методов иммуноферментного анализа, Вестерн-блоттинга, иммуногистохимии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, МРТ получены данные, которые в

совокупности позволяют комплексно оценить патофизиологические изменения у крыс, с ишемическим повреждением головного мозга. Достоверность результатов обеспечивается адекватной статистической обработкой. Данные представлены в виде диаграмм, таблиц, рисунков, ясно демонстрирующих полученные результаты. Полученные в работе Шаковой Ф.М. данные не вызывают сомнения с точки зрения их фундаментальной и практической значимости. Надлежащий уровень полученных результатов подтверждается публикациями результатов работы в 22 статьях в рецензируемых научных изданиях, включая рекомендованные ВАК и апробацией работы на российских и международных конгрессах и конференциях.

### **Практическая и теоретическая значимость работы.**

Теоретическая значимость диссертационного исследования Шаковой Ф.М. состоит в том, что автору удалось показать, что для оценки активности PGC-1 $\alpha$  наиболее адекватным специфическим подходом является определение экспрессии PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков-маркеров митохондриогенеза: транскрипционных факторов TFAM, NRF1, а также каталитических субъединиц первого и второго комплексов дыхательной цепи митохондрий, а именно, NDUFV2 и SDHA.

Практическая значимость исследования Шаковой Ф.М. заключается в том, что фармакологические препараты с клинически и экспериментально подтвержденным плеiotропным нейропротекторным действием, реализуют эффекты через положительную модуляцию транскрипционного ко-активатора PGC-1 $\alpha$ . Определение экспрессии и активности PGC-1 $\alpha$  может быть рекомендовано в качестве критерия оценки эффективности нейропротекторов

Результаты диссертационного исследования и сформулированные на их основе научные положения могут быть использованы в клинической и экспериментальной практике.

Полученные в диссертационном исследовании результаты внедрены в учебный план для аспирантов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Материалы исследования целесообразно использовать в курсе преподавания патологической физиологии и неврологии при обучении студентов.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Шаковой Фатимат Мухамедовны «Механизмы дизрегуляции внутриклеточных нейропротективных систем при ишемическом повреждении головного мозга (экспериментальное исследование)» является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, содержащей



решение актуальной научной проблемы – раскрытия механизма дизрегуляции внутриклеточных нейропротективных систем в условиях острой ишемии и фармакологической коррекции этих нарушений, что имеет важное значение научно-практическое значение как для патологической физиологии, так и клинической неврологии. По актуальности темы, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, а также объему выполненных автором исследований диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент,  
доктор медицинских наук, главный научный сотрудник  
заведующий лабораторией органопротекции  
при критических состояниях  
Научно-исследовательского института  
общей реаниматологии имени В.А. Неговского  
Федерального научно-клинического центра  
реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР)

О.А. Гребенчиков

Контактные данные: Тел. раб.: 8 (495) 694-27-08

<https://fnkcerr.ru> e-mail: [kanc.niior@fnkcerr.ru](mailto:kanc.niior@fnkcerr.ru)

Наименование организации: Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского  
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР). Адрес места работы: 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

«16» января 2023 г

Подпись д.м.н., Гребенчикова О.А. заверяю  
зам. директора – руководитель  
НИИ общей реаниматологии  
им. В.А. Неговского ФНКЦ РР д.м.н., доцент



А.Н. Кузовлев