

ОТЗЫВ официального оппонента
Савина Алексея Алексеевича
на диссертацию Шаковой Фатимат Мухамедовны
«Механизмы дизрегуляции 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

Диссертационное исследование Ф.М. Шаковой относится к работам, которые затрагивают фундаментальную медико-биологическую проблему изучения механизмов клеточной дизрегуляции при ишемическом инсульте. Актуальность исследования обусловлена тем, что цереброваскулярные заболевания на сегодняшний день являются одной из основных причин смертности и ведущей причиной стойкой утраты трудоспособности населения, определяя высокую медико-социальную и экономическую значимость этой проблемы. В этих условиях исследование механизмов устойчивого дисбаланса между повреждающими и защитными системами в ткани мозга, разработка и оптимизация стратегий нейропротективной терапии остаются одними из важнейших задач современной медицины. Известно, что острая или хроническая недостаточность мозгового кровообращения сопровождается метаболическими нарушениями, приводящими к дезинтегративным явлениям в ЦНС. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования последних десятилетий позволили раскрыть основные механизмы патогенеза острого инсульта. Причины, приводящие к структурно-функциональным нарушениям в нейронных сетях, обеспечивающих выполнение тех или иных мозговых функций, а также связи между различными отделами нервной системы разнообразны. В последнее десятилетие в научных трудах уделяется пристальное внимание роли митохондрий в развитии повреждения нейронов, отмечая, что поддержание их структурно-функциональной стабильности является основой эффективной и надежной нейропротекции, направленной не только на повышение энергопродукции, но и обеспечение соответствия выработки энергии потребностям мозговой ткани в областях с высокой интенсивностью обменных процессов. Автор в своей работе обращает внимание на один из малоизученных вопросов патогенеза инсульта - дизрегуляцию ключевых защитных внутриклеточных систем, таких как антиоксидантные ферменты, факторы слияния митохондрий, оказывающие антиапоптотическое действие, противовоспалительные факторы и ряд других при ишемическом повреждении ткани мозга. В этих условиях, представляют особый интерес возможные универсальные регуляторы митохондриогенеза, митохондриальной динамики, аэробного метаболизма и

энергетического гомеостаза, одним из которых является, открытый в конце прошлого века транскрипционный коактиватор PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α), координирующий механизмы выживания клеток посредством интеграции сигнальных систем. В ранее опубликованных работах имеются данные о снижении экспрессии и активности PGC-1 α при некоторых нейродегенеративных заболеваниях. При этом, исследования состояния этого важного регулятора при нарушениях мозгового кровообращения малоизучены. В связи с этим, изучение роли PGC-1 α в механизмах регуляции внутриклеточных нейропротективных систем при ишемическом инсульте – своевременный и актуальный вопрос для фундаментальной и клинической медицины. Полученные данные могут составить патогенетическую основу для разработки новых путей коррекции постишемических повреждений, повышая эффективность лечения.

Новизна исследования и полученных результатов

Исследование является новаторским, так как в развитии ишемического инсульта впервые выявлен интегральный триггерный механизм дизрегуляции внутриклеточных нейропротективных систем, характеризующийся устойчивым снижением уровня, а также деактивацией транскрипционного коактиватора PGC-1 α - координатора механизмов выживания нейрона.

Благодаря масштабному дизайну исследования, включающему целый ряд современных методов – экспериментальную модель фототромбоза, имитирующую клиническую картину инсульта; поведенческие тесты, позволяющие оценить неврологический дефицит; иммуноферментный анализ содержания нейроспецифических белков; высокоэффективную жидкостную хроматографию с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) для определения содержания моноаминов и их метаболитов в структурах мозга; МРТ-анализ, а также морфологическую оценку объема повреждения; Вестерн-блот для оценки экспрессии PGC-1 α и PGC-1 α -зависимых белков; иммуногистохимический анализ для изучения внутриклеточной локализации PGC-1 α , автором проанализировано влияние препаратов с нейропротективной активностью на динамику нейрохимических и морфофункциональных нарушений при остром ишемическом инсульте, впервые выполнен сравнительный анализ влияния пептидных и непептидных препаратов сигнального действия на экспрессию и активность PGC-1 α в разные сроки постишемического периода.

Впервые показано, что положительная модуляция PGC-1 α при курсовом введении синтетического аналога АКТГ₄₋₇ и 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП) сукцината сопровождается активацией внутриклеточных

нейропротекторных систем (биогенез митохондрий), торможением воспалительной реакции (противовоспалительная поляризация иммунцитов) и уменьшением неврологического дефицита. Впервые продемонстрирована эффективная индукция/активация PGC-1 α в перинфарктной зоне, которая осуществляется через стимуляцию специфических рецепторов (MCRs, SUCNR1), эспрессируемых всеми клеточными популяциями ткани мозга (нейронами, астроцитами, микроглиоцитами, олигодендроцитами). Показано, что сукцинатный рецептор SUCNR1 характеризуется уникальной суперэкспрессией при ишемии, что определяет высокий потенциал сукцинатсодержащих препаратов (в исследовании ЭМГП сукцинат) как положительных модуляторов PGC-1 α в постишемическом периоде. Для клинициста показанный в исследовательской работе нейропротективный эффект исследуемых препаратов, относящихся к разным фармакологическим группам, реализующих эффекты через механизм индукции и активации транскрипционного коактиватора PGC-1 α и проявляющего плейоторопное потенцирующее влияние на выживаемость и функциональную активность нейронов, представляет особый интерес. Данный факт имеет важное практическое значение, поскольку однонаправленность механизмов реализации защиты ткани мозга нейропротекторов, относящихся к разным группам, позволяет рассматривать PGC-1 α как информативный молекулярно-клеточный эффективности применяемой нейропротекторной терапии.

Оценка содержания диссертации, её завершенности, замечания по оформлению

Диссертация построена по традиционному плану и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и список использованной литературы. Работа изложена на 225 страницах, включает 30 рисунков и 7 информативных таблиц, представляющих полученные результаты. Список литературы содержит 341 источник, в него входят 53 отечественных источника (включая публикации автора диссертационного исследования) и 288 зарубежных. Обширный обзор литературы занимает по объему 69 страниц. Он включает 5 разделов, охватывающих проблемы, имеющие прямое отношение к теме диссертационного исследования.

В первом разделе кратко рассмотрено само понятие, этиология и эпидемиология инсульта с указанием актуальных данных по заболеваемости. Во втором разделе диссертант обобщает современные представления о патогенезе ишемического инсульта, акцентируя внимание на основах дизрегуляции внутриклеточных систем при ишемии, в соответствии с фундаментальными трудами

Георгия Николаевича Крыжановского – основоположника этого научного направления. В этом разделе автор подробно описывает нейроваскулярную единицу – новаторскую концепцию, подчеркивающую уникальную перекрестную связь между нейронами и сосудистой сетью головного мозга. Компоненты нейроваскулярной единицы структурно тесно связаны и являются неотъемлемой частью функции для сохранения гомеостаза мозга. Данная концепция играет крайне важную роль для практической медицины, поскольку является основой для оптимизации имеющихся и новых терапевтических тактик. В следующем разделе диссертант дает подробную характеристику транскрипционного коактиватора PGC-1 α , открытого в 1998 году, который спустя десятилетие был признан ключевым регулятором биогенеза митохондрий, доставки и утилизации энергетических субстратов и, в целом, главным координатором аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток. Этот раздел обосновывает выбор автором данного регулятора в качестве объекта исследования, поскольку в прошедшем десятилетии были раскрыты новые аспекты функциональной активности PGC-1 α , заключающиеся в трансляции широкого спектра нейропротекторных эффектов, поддержании функциональной активности нейронов и нейропластичности. Несмотря на перспективы фармакологической модуляции активности PGC-1 α , существует проблема малочисленности фармакологических препаратов, способных стимулировать активность и экспрессию PGC-1 α и диссертант обращает на это внимание, в дальнейшем, уже в рамках исследовательской работы развивая эту сложную тему.

В четвертом разделе приводится характеристика основных экспериментальных моделей ишемического инсульта, в частности – фотохимического тромбоза сосудов коры головного мозга. Обзор литературы завершается разделом, посвященным современным подходам к нейропротекции, который вызывает несомненный интерес у клинициста. Раздел дает полноценное представление о современных подходах к нейропротекции, приводятся группы препаратов, применяемые на каждом этапе ишемического каскада, дается краткая характеристика по каждой группе с указанием их преимуществ, недостатков и ограничений. Особое внимание уделяется митохондриально-адресованным антиоксидантам – направлению, которое может стать основой эффективной и надежной нейропротекции. Отдельно стоит отметить, что более 100 публикаций, процитированных автором опубликованы не ранее 2012 года, из них более 50 статей – в период с 2018 по 2021 год, что подчеркивает актуальность и современность приведенных данных.

Для реализации поставленных задач, диссертант применил современный методический инструментарий. В главе **«Материалы и методы исследования»** приведена неинвазивная модель острого инсульта, наиболее полно воспроизводящая клиническую картину фокального ишемического повреждения головного мозга - фотохимический ишемический тромбоз сосудов коры головного мозга крысы. Динамика молекулярно-клеточных нарушений и неврологического дефицита оценивалась в 1-21 сутки после фототромбоза, что дает возможность наиболее полно оценить картину постишемического периода. Автором были использованы поведенческие тесты: условный рефлекс пассивного избегания, «открытое поле», «тест Морриса», позволяющие оценить неврологический дефицит, вызванный ишемическим повреждением. Объем повреждения головного мозга экспериментальных животных оценивали гистологически, а также на магнитно-резонансном томографе BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Germany) с постоянным магнитным полем 7Тл и с градиентной системой 105мТл/м. с последующим морфометрическим анализом МРТ-изображений в программе ImageJ. Иммуноблоттинг применяли для оценки экспрессии PGC-1 α и PGC-1 α -зависимых белков: маркеров митохондриогенеза (NRF1, TFAM, NDUFV2, SDHA, cyt c1, COX2, ATP5A), ангиогенеза (VEGF), синаптогенеза (SYP). Иммуногистохимически определяли внутриклеточную локализацию PGC-1 α . Иммуноферментный анализ (ИФА) применяли для оценки уровня белка S100b в сыворотке крови. ВЖХ применяли для определения уровня нейромедиаторов в ткани мозга. Выбранные методы полностью удовлетворяют поставленным целям.

Глава **«Результаты»** включает 12 подразделов, где автор последовательно описывает действия препаратов с нейропротективной активностью, относящихся к разным фармакологическим группам на нейрохимические, морфологические и функциональные нарушения в раннем постишемическом периоде на модели фотохимического тромбоза префронтальной коры. В главе отражены результаты изучения влияния ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 α и уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 α в перинфарктной зоне префронтальной коры головного мозга, а также исследование PGC-1 α -модулирующей активности применяемых препаратов.

Обсуждение результатов приведено подробно. Завершается диссертационная работа кратким заключением и обоснованными выводами, отражающими основное содержание работы в полном соответствии с поставленными задачами, что свидетельствует о завершенности диссертационного исследования.

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

исследования и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Полученные в работе Шаковой Ф.М. данные не вызывают сомнения с точки зрения их фундаментальной и практической значимости. Научные положения и выводы полностью обоснованы экспериментальными данными, полученными с использованием современных методик, включающих в себя комплекс поведенческих, морфологических, биохимических, иммуногистохимических подходов. Достоверность результатов обеспечивается адекватной статистической обработкой, выполненной в соответствии с современными требованиями к анализу биомедицинских данных. Надлежащий уровень полученных результатов подтверждается публикациями результатов работы в 38 публикациях, из них 22 статьи в рецензируемых журналах и апробацией работы на российских и международных конгрессах и конференциях. Автореферат полно отражает содержание диссертационной работы, положения, выносимые на защиту, и выводы, оформлен в соответствии с существующими требованиями.

Практическая и теоретическая значимость работы.

Теоретическое значение работы определяется расширением знаний об молекулярно-клеточных маркерах тяжести ишемического поражения мозга и возможностью оценки эффективности применяемой нейропротективной терапии.

Практическая значимость исследования обусловлено тем, что определение экспрессии и активности PGC-1 α может быть рекомендовано в качестве критерия тяжести ишемического повреждения и как обязательный критерий оценки эффективности фармакологических препаратов с потенциальной нейропротекторной активностью в доклинических исследованиях. Наиболее специфичным подходом для оценки активности коактиватора является определение экспрессии PGC-1 α -зависимых белков-маркеров митохондриогенеза: транскрипционных факторов TFAM, NRF1 и каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи NDUFV2, SDHA.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

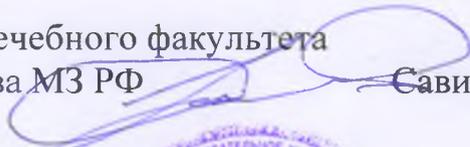
Результаты диссертационного исследования и сформулированные на их основе научные положения могут быть использованы в клинической и экспериментальной практике. Так, уровень активности транскрипционного коактиватора PGC-1 α целесообразно использовать как прогностический показатель

тяжести ишемического инсульта. При разработке новых способов лечения инсульта оценка потенцирующего влияния различных препаратов на выживаемость и функциональную активность нейронов, которые реализуется через механизм индукции и активации транскрипционного коактиватора PGC-1 α , играет, несомненно, важную роль.

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 завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной проблемы - выявление особенностей нарушения регуляции внутриклеточных нейропротективных систем в условиях острой ишемии и поиск путей их коррекции, что имеет важное значение для патологической физиологии и практической 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.

Доктор медицинских наук,
профессор кафедры нервных болезней лечебного факультета
ФГБОУ ВО МГМСУ им А.И. Евдокимова МЗ РФ  Савин А.А.

Подпись д.м.н., профессора Савина А.А. заверяю
Ученый секретарь
ФГБОУ ВО МГМСУ им А.И. Евдокимова МЗ РФ 
Заслуженный врач РФ,
д.м.н., профессор Васюк Ю.А.

«16» января 2023 г

Контактные данные: Тел. раб.: + 7 (495) 609-67-00

<https://www.msmsu.ru> e-mail: msmsu@msmsu.ru

Наименование организации: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. Федерации)
Адрес места работы: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1