

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, доцента Гринкевич Ларисы Николаевны на диссертацию Демьяненко Светланы Викторовны на тему «Сигнальные и эпигенетические процессы повреждения и защиты мозга после ишемического инсульта» на соискание ученой степени доктора наук по специальности 1.5.4 (03.01.04) – биохимия; 14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Демьяненко Светланы Викторовны является актуальным исследованием в важнейшей области знаний – молекулярных механизмах работы мозга и его защите от повреждений при инсультах. Значительное распространение инсультов в настоящее время становится острой социально-медицинской проблемой, что требует досконального изучения механизмов повреждения мозга и поиска современных способов лечения и реабилитации. В последние годы большое внимание исследователей приковано к комплексному изучению экспрессии множества генов кодирующих белки, вовлекаемые как в развитие патологий, индуцируемых инсультом, так и в восстановительные процессы поврежденных областей. Показано, что важную роль в регуляции экспрессии генов играют внутриклеточные сигнальные каскады, индуцирующие как модуляцию экспрессии ряда транскрипционных факторов, так и эпигенетические процессы ремоделирования хроматина и/или биогенез микроРНК. Предполагается что через влияние на эти системы возможно усилить репарационные процессы и предотвратить развитие патологий. В связи со сложностью устройства мозга и взаимодействием множества систем, регулирующих как апоптоз, так и репарацию, а также с быстротой гибели клеток успехи терапии инсультов не так значительны, как хотелось бы. Так при ишемическом инсульте гибель клеток в центре повреждения происходит в течение часа. Надежды на восстановление нарушенной области связывают

с переходной областью – пенумброй, клетки которой могут оставаться жизнеспособными в течение нескольких часов и наличием нейропластичности мозга. Выявлению молекулярных мишеней, воздействие на которые, обеспечит сохранность клеток пенумбры и повысит регенеративные возможности мозга при ишемии и повешена диссертация Демьяненко С. В. Работа представляет большой интерес как для фундаментальной науки, так и потенциально для терапии ишемических инсультов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Диссертационная работа Демьяненко С. В. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Научные положения, сформулированные в диссертации, основаны на результатах, полученных с использованием нескольких современных методов анализа (иммунофлуоресцентные микрочипы, иммуноблотинг, электронная микроскопия, электрофизиологические и поведенческие тесты). Обсуждение результатов и выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы и обоснованы. Достоверность представленных в диссертации результатов подтверждается статистическим анализом и большим числом публикаций в международных и отечественных журналах. Основные результаты опубликованы в 25 статьях из списка ВАК, причем более половины из них в высокорейтинговых иностранных журналах (Q1 – 11 статей, Q2 – 5 статей и Q3 – 2 статьи) в большинстве из которых Демьяненко С. В. является первым соавтором. Кроме того, в рецензируемых журналах опубликованы 21 тезисы и в соавторстве с Узденским А.Б. выпущена монография. Результаты работы докладывались и обсуждались на конференциях, симпозиумах и совещаниях различного уровня в том числе и международных. Исследования Демьяненко С. В. широко поддерживались грантами РНФ и РФФИ и их результаты вошли в отчеты (РНФ №14-15-00068 и №18-15-00110 и РФФИ №14-04-00741 и №16-04-01135)

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа Демьяненко Светланы Викторовны направлена на изучение молекулярных механизмов развития инсультов, возможности регенерации поврежденных областей и восстановлению полноценных поведенческих характеристик. В качестве модели инсульта используется фототромбический инсульт (ФТИ). Отличительной чертой работы является масштабность исследования процессов, происходящих как в ишемическом ядре, так и в пенумбре, причем не только в нейронах, но и глии в различных временных интервалах.

Автором, проведено комплексное протеомное исследование пенумбры на разных сроках развития ФТИ с применением микрочипов, что позволило идентифицировать и проанализировать несколько больших групп белков, участвующих в регуляции апоптоза, везикулярного транспорта и синаптических процессов, реорганизации цитоскелета и межклеточных контактов. Было показано, что в пенумбре происходит синхронная экспрессия белков, которые инициируют, опосредуют или регулируют апоптоз, причем одновременно экспрессируются и противоапоптотические белки. Эти данные свидетельствуют о том, что в пенумбре происходит борьба по меньшей мере двух процессов от исхода которой зависит выживание организма. В клетках ишемической пенумбры выявлены большие группы белков, участвующих в перестройках цитоскелета и синаптической трансмиссии содержание которых значительно изменяется на ранних сроках ФТИ. Изменение их экспрессии может лежать в основе как гибели клеток, так и нарушении синаптических процессов. В этой связи интересными представляются полученные автором данные о разнонаправленном действии ФТИ на различные медиаторные системы мозга. ФТИ вызывает подавление дофамин-ергической системы с одновременной активацией серотонинергических и ГАМК-ергических систем.

Автором были проведены комплексные исследования вовлечения эпигенетических процессов (ацетилирование гистонов) в развитии фототромботического инсульта, как в нейронах, так и клетках глии. Показано

изменение ацетилирования гистонов H3 и H4 в коре мозга в первые 24 часа после инсульта. Причем ацетилирование гистона H3 по лизину 9 в ядрах нейронов и глии регулируется противоположным образом (в нейронах снижается, а в глии повышается). Проведенный автором далее анализ экспрессии целого ряда гистондеацетилаз (HDAC) и гистонацетилтрансфераз (HAT) регулирующих процессы ацетилирования показал, что снижение уровня ацетилирования гистона H3 в ядрах связано с увеличением экспрессии гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC6, а повышение ацетилирования в астроцитах со сверхэкспрессией гистонацетилтрансфераз HAT1 и PCAF. И что интересно, сверхэкспрессия гистондеацетилаз HDAC2 и HDAC6 в нейронах сохраняется и в ранний восстановительный период (3-21 день). При этом повышается уровень ацетилирования другого гистона H4 предположительно за счет снижения уровня других деацетилаз (HDAC1 и SIRT1) из-за их перехода в цитоплазму. В этот период повышается и уровень ацетилирования другого гистона H4. Полученные результаты позволили автору сделать вывод о связи апоптоза клеток пенумбры с повышенной экспрессией гистондеацетилаз HDAC2 и HDAC6. Дальнейшие эксперименты с блокадой этих гистондеацетилаз подтвердили их важную роль в развитии апоптоза и сделали возможным предложить ингибиторы гистондеацетилаз HDAC2 - MI192 и α -фенил трополон, HDAC6 - тубастатин А и HPOB в качестве потенциальных терапевтических препаратов. Данные ингибиторы значительно снижают апоптоз клеток пенумбры и объем инфаркта мозга, сохраняют морфологию клеток и восстанавливают поведенческие функции мышей после ФТИ.

Кроме того, Демьяненко С. В. показано что снижение объема поражения и гибели клеток можно достичь через введение ингибиторов фосфорилирования кофилина T56-LIMKi (кофилины - участвуют в регуляции сборки актиновых филаментов), или человеческого рекомбинантного Hsp70. В связи с чем эти вещества предложены в качестве потенциальных

нейропротекторных препаратов для лечения ишемического инсульта. Достоверность данных не вызывает сомнения.

Многими учеными и клиницистами в настоящее время признается, что успех нейропротекции при инсульте зависит от поиска новых стратегий, основанных на достижениях базисных нейронаук, тем самым работа Демьяненко С. В. может быть полезной для разработки фармакологических препаратов для нейропротекции. Материалы диссертации могут быть использованы в курсах лекций в университетах при подготовке специалистов биологического и медицинского профиля.

Оценка структуры и содержания диссертации, полноты изложения полученных результатов

Диссертационная работа Демьяненко Светланы Викторовны написана доступным языком, изложение материала соответствует принятым в научном мире стандартам, все разделы логически связаны между собой. Выводы диссертационной работы хорошо аргументированы, логично сформулированы и соответствуют поставленным задачам. Диссертационная работа построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 307 страницах, содержит 13 таблиц (6 из которых вынесены в приложение) и 83 рисунка. Список цитируемой литературы включает 382 ссылки.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, представлена степень разработанности темы в мировой науке, сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту, методология исследований, научная новизна и практическая значимость полученных результатов и личный вклад соискателя. Заслуживает высокой оценки обзор литературы (Глава 1), который представляет собой достаточно полную и хорошо систематизированную подборку сведений по теме диссертации. В главе 2 описаны используемые в ходе выполнения работы методы. Следует отметить

широкий спектр применяемых методических подходов отличающихся значительной трудоемкостью и требующих высокого профессионализма. В качестве модели инсульта удачно использовалась малоинвазивная модель на основе фототромбоза. Главы 3-5 включают результаты исследования и их обсуждение. В главе 3 подробно описаны морфологические изменения мозга как в зоне ядра инфаркта, так и в пенумбре в разные временные точки и сделаны выводы о градуальном улучшении морфологического состояния мозга от ядра инфаркта до периферии пенумбры, а также оценен размер пенумбры необходимый для дальнейших биохимических исследований. Комплексные протеомные исследования пенумбры после ФТИ с использованием флуоресцентных чипов позволили идентифицировать белки, участвующих в регуляции апоптоза, везикулярного транспорта и синаптических процессов, реорганизации цитоскелета и межклеточных контактов. Глава 4 посвящена вовлечению эпигенетических процессов (ацетилированию/деацетилированию гистонов) в динамику развития фототромботического инсульта в пенумбре. Представлены убедительные данные о участии этих процессов в реакции ткани коры мозга в первые 24 часа после инсульта, а также на 3-21 день восстановительного периода.

В главе 5 подробно описаны способы улучшения морфологического состояния, эпигенетических процессов и неврологических характеристик животных подверженных ФТИ через блокирование гистондеацетилаз целым рядом их специфических и неспецифических блокаторов, что позволило предложить в качестве потенциальных терапевтических препаратов ингибиторы гистондеацетилаз MI192, α -фенил трополон, тубастатин А и НРОВ. Описаны также протективные эффекты ингибитора фосфорилирования кофилина - T56-LIMKi и человеческого рекомбинантного Hsp70.

Все главы очень хорошо иллюстрированы. Особенно это относится к рисункам по иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии, а также схем, которые систематизируют большее количество полученных данных.

Отдельно нужно сказать о последнем разделе главы 5 связанным с ишемическим preconditionированием. Мне непонятно, почему в этом разделе отсутствует сопоставление с литературными данными. Механизмы preconditionирования многосторонне изучались, в том числе с влиянием на ишемию в последние 2 десятилетия. В настоящее время интенсивно исследуется другой подход - ишемическое postconditionирование, который может быть реально применен на практике. Показано, что терапевтические эффекты postconditionирования могут включать стимуляцию нейрогенеза, уменьшать размер инфаркта, ослаблять повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и отек мозга, а также улучшает неврологические исходы (Esposito E et al., Effects of Postconditioning on Neurogenesis and Angiogenesis During the Recovery Phase After Focal Cerebral Ischemia Stroke. 2015; Chen, Shen, Zhao, Ischemic postconditioning for stroke treatment: current experimental advances and future directions. Cond Med. 2020. Vetrovoy, Rybnikova, Samoilov, Cerebral Mechanisms of Hypoxic/Ischemic Postconditioning Biochemistry (Mosc) 2017). Указанное замечание в целом не влияет на научную ценность диссертации Демьяненко Светланы Викторовны и возможно будет служить импульсом к проведению будущих исследований.

Заключение

Диссертационная работа Демьяненко Светланы Викторовны на тему “Сигнальные и эпигенетические процессы повреждения и защиты мозга после ишемического инсульта”, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, по специальности 03.01.04 – биохимия; 14.03.03 – патологическая физиология, является самостоятельным законченным научным трудом в котором на основании выполненных автором исследований осуществлено решение актуальных для современной биологии и медицины проблем связанных с выявлением молекулярных мишеней, воздействие на которые способно повысить регенеративные возможности мозга при нарушениях вызванных инсультами. Таким образом, по актуальности темы работы, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, обоснованности научных выводов, научной значимости, работа Демьяненко

Светланы Викторовны соответствует требованиям п. 9 “Положения о присуждении ученых степеней” утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.07.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор достоин присуждения искомой степени по специальности 03.01.04 – биохимия; 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук
(03 03 01– физиология человека и животных),
доцент, ведущий научный сотрудник
ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН



Гринкевич Лариса Николаевна

Даю согласие на сбор, обработку и хранение персональных данных.



Гринкевич Лариса Николаевна

27 сентября 2021

Подпись д.б.н. ЛН Гринкевич ЗАВЕРЯЮ:
И.О. Ученого секретаря ИФ РАН к.б.н.





Петронавловская Екатерина Алексеевна

Адрес организации: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова 6. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Телефон: (812) 328-07-01 факс: (812) 328-05-01 e-mail: Pavlov.institute@infran.ru.

27.09. 2021