

**Отзыв**  
**официального оппонента Кировой Юлии Игоревны**  
**на диссертационную работу Ветрового Олега Васильевича**  
**«РОЛЬ HIF1-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В**  
**ОБЕСПЕЧЕНИИ РЕАКЦИЙ МОЗГА НА ГИПОКСИЮ», представленную на**  
**соискание ученой степени кандидата биологических наук**  
**по специальности 03.01.04-Биохимия**

**Актуальность темы диссертации**

Цереброваскулярные и нейродегенеративные патологии являются острой медико-социальной проблемой, поскольку в последние годы отмечается прогрессирующее увеличение количества случаев острых и хронических нарушений мозгового кровообращения, их «ранней» манифестации в возрасте до 45 лет, инвалидизации, смертности (Kissela B.M. et al., 2012; Smajlovic D., 2015).

Решение проблемы ишемических повреждений мозга предполагает разработку, с одной стороны, подходов предупреждения циркуляторной недостаточности мозга и, с другой, приемов купирования постишемических нарушений. Изучение молекулярных патофизиологических механизмов снижения адаптивного потенциала мозга привело к формированию представления, согласно которому одним из триггерных патогенетических звеньев церебральной ишемии является снижение активности гипоксического фактора транскрипции HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) (Correia S.C., 2010). HIF1 модулирует активность 1-5% генома. Паттерны активируемых генов различаются в разных тканях и клеточных типах, тем не менее, существуют универсальные мишени активности HIF1 – гены VEGF, ферментов гликолиза, транспортеров глюкозы. Нейропротекторные эффекты HIF1 связаны с активацией генов эритропоэтина, ангиопоэтина, IGF2, которые детерминируют развитие механизмов толерантности нервной ткани к кислородной недостаточности. Именно дефицит активности HIF1, который усугубляется с возрастом, рассматривают как ключевой патогенетический триггерный механизм, ответственный за изреживание сосудистой сети мозга, снижение антиоксидантного и пролиферативного потенциала ткани мозга. Ингибирование пролилгидроксилаз и HIF1 $\alpha$ -VHL-взаимодействий малыми молекулами-ингибиторами составляет основу перспективных направлений в терапии ишемических состояний (Semenza G.L., 2004).

Современная базисная терапия постишемических нарушений включает стандартный комплекс тромболитических, антиоксидантных/антигипоксических, противовоспалительных препаратов.

Представленное О.В. Ветровым диссертационное исследование предлагает и доказывает правомочность нового подхода в коррекции постишемических нарушений – применение эффективной схемы гипоксического посткондиционирования (короткий курс из трех ежедневных 2-часовых воздействий умеренной гипобарической гипоксией) в сочетании с ингибитором активности HIF1.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

В диссертационном исследовании О.В. Ветрового впервые показано существование отрицательной регуляции экспрессии глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ) – ключевого скорость-лимитирующего фермента пентозофосфатного пути (ПФП) – со стороны HIF1 и причастность HIF1 в условиях тяжелой гипоксии к активации процессов свободнорадикального окисления и апоптоза. Таким образом, работа Ветрового О.В. раскрывает новые аспекты HIF1-зависимых патогенетических механизмов, инициируемых тяжелой гипоксией/ишемией.

Вопрос о патогенетических сторонах активности HIF1 является одной из краеугольных тем последних нескольких десятилетий в области исследований канцерогенеза, перинатальных поражений мозга, нейродегенеративных патологий, сердечно-сосудистой недостаточности. Механизм переключения активности транскрипционного фактора HIF1 с проадаптивной (prosurvival) на повреждающую (prodeath) остается наименее изученным аспектом знаний о HIF1. Известно, что HIF1 активирует гены проапоптотических факторов (BNIP3, NIX, NOXA; Sandau and Handa, 2007), провоспалительных факторов (p53; Eklind et al., 2006; iNOS, COX-2; Kunz et al., 2007; Mi et al., 2007), каспаз (каспаза-3, каспаза-9; Nishiyama et al., 2001; Liu et al., 2002). Таким образом, вовлеченность HIF1 в механизмы клеточной гибели – факт, доказанный на разных моделях независимыми лабораториями. Относительно механизма переключения prosurvival/prodeath активности HIF1 можно лишь предположить, что в условиях тяжелой гипоксии, сопряженной с энергодифицитом и окислительным стрессом оказываются

несостоятельными АТФ-зависимые механизмы антиапоптотической системы, эффективно блокирующей апоптоз в условиях слабой и умеренной гипоксии (в частности, подавляется антиапоптотическая активность белков теплового шока).

В работе Ветрового О.В. впервые обосновывается применение ингибитора HIF1 как неотъемлемого элемента коррекции постишемических/постгипоксических нарушений (активации апоптоза и воспаления) в мозге. Впервые показано, что HIF1 причастен к снижению интенсивности пентозофосфатного пути – главного источника НАДФН в мозге, необходимого в поддержании пула восстановленного глутатиона и эффективности глутатион-зависимых антиоксидантных механизмов. Автор доказывает вовлеченность HIF1 в условиях тяжелой гипоксии в механизмы окислительного повреждения клеток мозга. В целом при ознакомлении с диссертацией возникает представление о необходимости ингибирования HIF1 в раннем постишемическом периоде с целью подавления прооксидантных, проинфламативных и проапоптотических механизмов.

Считаю, что концептуальная основа диссертации Ветрового О.В. и полученные автором результаты инновационны, актуальны, представляют несомненную ценность для фундаментальной биолого-медицинской науки и практической медицины.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов**

Диссертационное исследование О.В. Ветрового существенно дополнило теоретические представления о механизмах развития окислительного стресса в условиях тяжелой гипоксии/ишемии. Автор доказал, что в условиях критического снижения обеспеченности мозга кислородом подавляется экспрессия гена Г6ФДГ (ключевой скорость-лимитирующий фермент ПФП), в результате чего снижается скорость НАДФН-зависимого восстановления глутатиона и эффективность глутатион-сопряженных механизмов антиоксидантной защиты мозга. Показана причастность HIF1 к супрессии гена Г6ФДГ.

Основные результаты диссертации О.В. Ветрового – индукция Bcl-2 в условиях гипоксического посткондиционирования и блокирование отсроченного апоптоза с помощью ингибитора HIF1 – имеют высокую практическую значимость, поскольку, наряду с другими активно разрабатываемыми в настоящее

время подходами (ингибирование каспаз, применение антагонистов глутаматных рецепторов и индукторов Bcl-2), составляют патогенетическое обоснование для формирования новых эффективных терапевтических стратегий модуляции интенсивности апоптоза при ишемии-реперфузии мозга.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Обращаясь к экспериментально-методической доказательной стороне исследования, необходимо отметить, что диссертантом был использован широкий арсенал современных молекулярно-биологических, биохимических, физиологических, статистических методов и подходов, позволяющих считать полученные в работе данные достоверными и достаточными для сформулированных выводов.

Модель тяжелой гипоксии, также как и схема гипоксического посткондиционирования, была многократно апробирована в исследованиях, проводимых в Институте физиологии имени И.П. Павлова, представляет собой строго дозируемое по тяжести и продолжительности гипобарическое гипоксическое воздействие и не вызывает сомнений в отношении стандартизации и воспроизводимости получаемых эффектов. Апоптоз автор оценивал двумя независимыми методами, применяя световую микроскопию (TUNEL-метод) и электрофоретический анализ фрагментации ДНК, что позволило существенно повысить достоверность и надежность данных, принципиально значимых для формирования оригинальных научных положений, составляющих суть диссертационного исследования. Специфичность всех использованных в работе антител была проверена с помощью иммуноблотинга. При изучении окислительно-восстановительного статуса мозга автором был использован комплексный многопараметрический подход. О.В. Ветровой проанализировал семь различных показателей, характеризующих интенсивность процессов свободнорадикального и перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые конъюгаты полиненасыщенных липидов, основания Шиффа, фосфолипиды, ТБК-реактивные продукты) и редокс-статус (восстановленные тиоловые группы, общий глутатион) исследуемых областей мозга. Фермент Г6ФДГ, составляющий главный фокус внимания исследователя, был изучен с безукоризненной тщательностью. Автор

определял активность и экспрессию фермента на уровне транскрипции и трансляции.

Таким образом, основные научные положения исследования, выносимые на защиту, и выводы диссертации обоснованы достаточным количеством достоверных экспериментальных данных, прошли успешную апробацию на многочисленных российских и международных конференциях (57 тезисов), полностью отражены в рецензируемых публикациях (10 статей).

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности**

Структура и оформление диссертации соответствуют традиционным стандартам и рекомендациям ВАК. Рукопись включает разделы «введение», «литературный обзор», «материалы и методы», «результаты и обсуждение», «заключение», «список литературы». Изложение материала выполнено четким и ясным академическим языком, стилистически и логически выверенным. При прочтении «введения» и «литературного обзора» формируется представление о современном уровне разработанности темы и существующих пробелах. В разделе «материалы и методы» дается подробное описание использованных методов, что указывает на глубокое понимание диссертантом базовых принципов и знание технических деталей использованной методологии. В разделе «результаты и обсуждение» последовательность изложения экспериментальных данных логична, описание результатов не вызывает вопросов и замечаний, иллюстративный материал информативен и достаточен. Представлено 23 рисунка (микрофотографии иммуногистохимических препаратов и их количественный анализ, диаграммы данных оценки редокс-статуса тканей мозга, активности ГбФДГ). В «заключении» приведена наглядная информативная схема, резюмирующая результаты исследования. Выводы обоснованы, отражают полную реализацию цели и задач, завершенность исследования в целом.

### **Замечания по диссертационной работе**

Учитывая высокую научную значимость полученных диссертантом сведений о выраженных нейропротекторных эффектах ингибирования NIF1 в раннем постгипоксическом/постишемическом периоде, считаю необходимым, в порядке дискуссии, обозначить в отзыве ряд вопросов и замечаний:

1. Применение ингибитора HIF1 – топотекан – требует, по моему мнению, детального и подробного обоснования уже на этапе литературного обзора, которое должно включать механизм и, самое важное, уровень специфичности этого ингибитора, что позволило бы оценить возможные побочные биологические эффекты, такие как собственная не связанная с HIF1 антиапоптотическая активность. С целью исключения такой возможной антиапоптотической активности топотекана представляется целесообразным на этапе выполнения экспериментов применение других ингибиторов HIF1 с принципиально отличными механизмами, например, ингибиторов активности HSP90 (гелданамицин, провоцирующий RACK1-зависимую убиквитин-протеасомную деградацию HIF1 $\alpha$ ), ингибиторы MAPK- и PK3-сигнальных путей, промотирующих синтез и активацию HIF1 $\alpha$ .

В связи с вышесказанным возникают вопросы: почему был выбран именно этот ингибитор, использовались ли в работе другие ингибиторы? Почему применяли введение топотекана только до предъявления тяжелой гипоксии? Данные об эффектах топотекана, введенного в раннем периоде реоксигенации (период т.н. «терапевтического окна») имели бы большую ценность для патогенетического обоснования новых принципов коррекции постишемических нарушений в мозге, основанных на подавлении активности HIF1.

2. Для усиления доказательной базы антиапоптотического эффекта блокады HIF1 представляются актуальными исследования с применением активаторов HIF1 (дефероксамин, CoCl<sub>2</sub>, ингибиторы PHDs). Полученное в этих условиях усиление апоптоза служило бы весомым аргументом в поддержку заявленного диссертантом нового эффективного нейропротекторного подхода в остром ишемическом периоде. Проводились ли подобные исследования?

Представленные вопросы и замечания не снижают научной ценности диссертационного исследования О.В. Ветрового.

### **Заключение**

Диссертационное исследование Ветрового Олега Васильевича является законченной научно-квалификационной работой, которая по актуальности, полноте поставленных и решенных задач, совокупности научных результатов, отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям.

Автореферат диссертации и публикации полностью отражают научную новизну и содержание работы. Замечаний к стилю, оформлению и объему автореферата нет.

На основании анализа диссертации и автореферата считаю, что исследование О.В. Ветрового «Роль HIF1-зависимой регуляции пентозофосфатного пути в обеспечении реакций мозга на гипоксию», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04-«Биохимия», является завершенной научной работой, имеющей высокую актуальность для фундаментальной и практической медицины, вносящей значительный вклад в решение проблемы коррекции постишемических церебральных нарушений, которая отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04-Биохимия.

Доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
лаборатории биоэнергетики и проблем гипоксии  
ФГБНУ «Научно-исследовательского институт  
общей патологии и патофизиологии»  
Москва, 125315, ул. Балтийская, д.8;  
тел/факс: +7(495)601-23-66, моб. 8(926)9030164  
bioenergy@mail.ru.

21.03.2018г

Кирова

Кирова  
Юлия Игоревна

Подпись Кировой Ю.И. заверяю  
Ученый секретарь  
ФГБНУ «Научно-исследовательского института  
общей патологии и патофизиологии»  
кандидат медицинских наук



Скуратовская

Л.Н. Скуратовская