

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, заведующего лабораторией и главного научного сотрудника лаборатории молекулярных механизмов критических состояний Научно-исследовательского института общей реаниматологии им. В.А. Неговского Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Писарева Владимира Митрофановича на диссертационную работу Денисовой Алины Евгеньевны на тему: «Действие пептидных препаратов на экспрессию генов в условиях экспериментальной модели преходящей ишемии мозга у крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика

Актуальность темы

Приблизительно 85% от всех типов инсультов приходится на ишемический инсульт, представляющий собой серьезную экономическую и социальную проблему во всем мире. Интенсивные исследования в области патогенеза данного жизнеугрожающего заболевания показали, что ишемическое повреждение областей головного мозга приводит к эксайтотоксичности, воспалению, окислительному стрессу и митохондриальным нарушениям в нервной ткани головного мозга. Эти процессы могут увеличивать зону ядра ишемии, нарушать регенеративный ответ клеток головного мозга, тем самым, усугубляя течение ишемического инсульта и затрудняя последующее восстановление. Поэтому терапевтические воздействия на данные процессы считается перспективной стратегией в лечении, способствующей улучшению прогноза перенесенного ишемического инсульта. Исследования молекулярных механизмов развития острой фазы ишемического инсульта, позволяющие идентифицировать больше ключевых генов, контролирующих процессы, связанные с ишемически-реперфузионными повреждениями в ткани головного мозга, представляют особую ценность. Именно такие исследования несут высокий потенциал для внедрения, поскольку обосновывают не только направления экспериментального поиска новых молекулярных мишеней для терапевтических вмешательств, но и целесообразность направлений клинической валидации при последующих этапах трансляционных исследований, в том числе — для повышения адаптационных возможностей организма.

В диссертационной работе в качестве основного подхода к проблеме применен генетический метод - секвенирование РНК, которое проводили при экспериментальном моделировании ишемического инсульта. Этот метод в настоящее время признается высокоинформативным при исследованиях молекулярных основ патогенеза заболеваний и гетерогенных механизмов терапевтической эффективности фармакологических препаратов.

В настоящее время тромболитическая реперфузионная терапия является основным эффективным методом лечения пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения (преимущественно — с ишемическим инсультом) в острейшем периоде, однако, ее успешность

существенно ограничена временным окном. В связи с задержкой диагностики и поступления пациентов в медицинское учреждение, частота применения этого метода лечения у пациентов, поступивших достаточно рано (в первые 4,5 часа от начала инсульта), составляет менее 8%. В связи с этим в настоящее время существует острая необходимость поиска альтернативных методов лечения, в том числе лекарственных препаратов, способных уменьшить тяжесть развивающихся ишемических повреждений клеток нервной системы или замедлить их развитие и усилить процессы восстановления при использовании в более поздние сроки от начала инсульта.

Диссертационная работа Алины Евгеньевны Денисовой имеет непосредственное отношение к закрытию имеющейся брешы - недостаточности альтернативных методов лечения, поскольку посвящена изучению ответа транскриптома в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, поиску генетических механизмов нейропротективного действия длительно применяющегося в клинической практике препарата семакс, выяснению воздействий перспективных соединений глипролинового ряда на экспрессию ряда патогенетически значимых генов, участвующих в воспалительном ответе, процессах нейротрансмиссии, адаптационных и дисадаптационных реакциях клеток на повреждение. В связи с вышеизложенным тема диссертационной работы Алины Евгеньевны Денисовой и характер ее выполнения представляются высокоактуальными.

Достоверность и новизна результатов диссертация

Достоверность научного исследования не вызывает сомнения, так как оно было выполнено на достаточной выборке лабораторных животных, при использовании адекватной экспериментальной модели ишемии головного мозга, с применением современных молекулярно-генетических и достаточно мощных статистических методов обработки данных при личном участии Алины Евгеньевны Денисовой на всех этапах работы. Диссертационное исследование было одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Все основные результаты опубликованы в 7 рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 статьи – в журналах первого квартиля, 2 статьи – в профильном журнале по генетике 2 квартиля (международная база Scopus).

Диссертантом были получены новые данные об особенностях функционирования генов на транскриптомном уровне в подкорковых структурах головного мозга в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, вызванной эндоваскулярной окклюзией средней мозговой артерии. Данная модель фокальной ишемии является адекватной и актуальной, позволяя имитировать события, происходящие в головном мозге людей с окклюзией М1 сегмента СМА с последующей механической реканализацией. Алиной Евгеньевной Денисовой

получен большой массив данных, выявлены ключевые гены, экспрессия которых значительно изменялась в ходе развития патологического состояния и под воздействием экспериментальной терапии регуляторными пептидами при моделировании ишемического инсульта. В процессе исследования идентифицированы сигнатуры генной экспрессии, участвующие в ишемически-реперфузионном повреждении в первые 4 часа и через 24 часа после начала окклюзии. На основании дифференциальной экспрессии генов охарактеризованы сигнальные пути, контролирующие процессы воспаления, участвующие в нейросигнализации, образовании и функционировании рибосом, функционировании протеаз, репликации ДНК и других биологических процессах, происходящих в клетках головного мозга в условиях ишемически-реперфузионного повреждения. Впервые выявлен ответ транскриптома на введение российского лекарственного препарата семакс (метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин) в условиях использованной модели экспериментальной ишемии, установлено статистически значимые воздействия препарата на экспрессию генов, ответственных за передачу сигналов в ЦНС и воспаления. Экспериментально обоснован факт ассоциации введения препарата семакс и компенсаторной направленности изменений паттернов экспрессии мРНК при ишемически-реперфузионном повреждении, выразившейся в стимуляции экспрессии генов кластера нейросигнализации и подавления генов кластера воспаления. Впервые получены данные, позволяющие проведение сопоставления структурно-морфологических изменений, выявляемых МРТ в динамике при воздействии регуляторных пептидов в экспериментальной модели ишемии-реперфузии.

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

Содержащиеся в диссертационной работе Денисовой Алины Евгеньевны научные положения, выводы и практические рекомендации сформулированы точно и грамотно, аргументированы, обоснованы и подкрепляются результатами научного исследования с применением современных методов, используемых в медицинской генетике.

Ценность для науки и практики результатов работы

Основные положения работы имеют важное научное и практическое значение. Полученные в ходе работы данные об экспрессии генов в подкорковых структурах головного мозга в условиях экспериментальной модели приблизили к пониманию сложных молекулярных механизмов ишемически-реперфузионного повреждения. Было показано, что большое количество генов, увеличивших свою экспрессию, были связаны с процессами воспаления, иммунного ответа, апоптоза и регуляцией транскрипции, в то время как гены, снизившие свою экспрессию были ассоциированы с процессами нейросигнализации. В свою очередь, семакс продемонстрировал диаметрально противоположный эффект на экспрессию данных генов, что

ценно в понимании нейропротективного действия данного пептидного соединения. Полученные Алиной Евгеньевной Денисовой данные могут быть использованы в науке и практике для дальнейшего углубленного изучения сложных патологических изменений в головном мозге вследствие ишемического инсульта, а также для поиска новых терапевтических мишеней. Полученные сведения об изменении паттернов генной экспрессии под влиянием новых коротких глипролиновых пептидов экспрессии генов *Chrm1*, *Cplx2*, *Gria3* и *Gabra5*, контролирующих процессы передачи нервных импульсов, имеют значение для определения направлений клинической валидации этих регуляторных пептидов при последующих этапах трансляционных исследований, в частности, с целью расширения и уточнения показаний для будущего использования регуляторных пептидов глипролинового ряда в практике здравоохранения.

Результаты проведенного исследования, в особенности – установленные паттерны экспрессии генов до и после введения регуляторных пептидов могут быть также рекомендованы для использования в работе образовательных медико-биологических учреждений и научно-исследовательских лабораторий.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану, написана академическим стилем и изложена на 179 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, а также из заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Библиографический указатель содержит 226 источников, в том числе 209 ссылок на иностранные публикации и 17 ссылок на работы, напечатанные в российских журналах. Диссертационная работа содержит 10 таблиц и иллюстрирована 19 рисунками.

Во введении Денисовой Алиной Евгеньевной определена цель научного исследования – изучение влияния пептидных соединений глипролинового ряда Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакс), Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu на экспрессию генов, участвующих в процессах воспаления и нейросигнализации, и на размер ишемического повреждения в условиях преходящей фокальной ишемии мозга у крыс. Для реализации поставленной цели четко сформулированы 4 последовательные задачи исследования. Также во введении обоснована актуальность выбранной темы, показана научная новизна и практическая значимость, приведены 4 положения, выносимые на защиту и представлена информация об апробации результатов работы и внедрении.

В главе 1 (обзор литературы) детально описаны патофизиологические и генетические аспекты ишемически-реперфузионного повреждения, дан подробный обзор существующих

экспериментальных моделей острой ишемии головного мозга у лабораторных животных, подробно освещены современные молекулярно-генетические методы, а также представлены данные о соединениях глипролинового ряда. Литературный обзор, произведенный автором работы, дает многогранное представление об изучаемой проблеме и обосновывает необходимость выполнения диссертационного исследования.

В главе 2 (материалы и методы) дана общая характеристика лабораторных животных и их количество, подробно описана методика моделирования эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии у крыс, даны характеристики используемых в работе режимов магнитно-резонансной томографии, описаны методы гистологического исследования. В работе использованы современные молекулярно-генетические методы, подробно описана методика проведения секвенирования РНК, методика ПЦР с обратной транскрипцией с заранее подобранными праймерами. Описаны методы статистической обработки полученных данных.

В главе 3 проведен анализ результатов исследования и их обсуждение.

В результате секвенирования РНК получены уникальные данные об экспрессии генов: идентифицировано большое количество генов (>17000), часть из которых показали достоверные изменения экспрессии; идентифицировано значительное количество функциональных категорий белков и сигнальных путей в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга. Также показано влияние семакса на ответ транскриптома и выявлено, что семакс демонстрирует компенсаторный эффект на экспрессию множества генов, измененных в условиях ишемически-реперфузионного повреждения. Продemonстрировано, что пептид семакс в ранние часы от развития ишемически-реперфузионного повреждения не вызывает достоверных изменений экспрессии. Изучено влияние глипролинов (Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu) на экспрессию некоторых заранее выбранных генов, участвующих в нейротрансмиссии и воспалении.

Таким образом, автором проведен достаточный объем исследований для достижения поставленной цели и задач. Выводы и практические рекомендации отражают ответы на вопросы, обозначенные в задачах исследования и вытекают из собственных исследований автора. Диссертация написана с соблюдением правил ГОСТа Р 7.0.11-2011 к рукописям и содержит все необходимые разделы.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Материалы диссертационного исследования представлены в 11 печатных работах, в том числе в 7 статьях в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для

соискателей ученой степени кандидата медицинских наук. 3 статьи в журналах, индексируемых Web of Science и/или Scopus. Результаты диссертационной работы многократно доложены на международных и российских конференциях.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен согласно рекомендациям ВАК, в полной мере отражает основные положения, полученные результаты, выводы и практические рекомендации диссертационного исследования. Автореферат соответствует содержанию диссертации и раскрывает научную новизну.

Замечания

К изложенному материалу имеются вопросы:

1. Глипролиновые фрагменты высвобождаются и в процессе протеолиза белков в ходе естественного клеточного метаболизма. Могут ли они изменять профиль экспрессии генов и почему относительно небольшая доза коротких пептидов способна оказать выраженный биологический эффект?

2. Какие механизмы могут лежать в основе воздействия регуляторных пептидов глипролинового ряда на изменение экспрессии столь значительного количества генов?

3. Имеются ли сведения об изменении характера экспрессии генов при воздействии гликопролинов в иммунных клетках и если имеются, то есть ли сходные эффекты – по экспрессии сходных кластеров генов в клетках нервной системы у мышей (по данным диссертационного исследования) и в клетках иммунной системы (по литературным данным)?

2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное исследование Денисовой Алины Евгеньевны на тему «Действие пептидных препаратов на экспрессию генов в условиях экспериментальной модели преходящей ишемии мозга у крыс» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи по выяснению молекулярных механизмов реакций клеток организма на применяющийся в клинической практике пептидный препарат семакс и другие перспективные глипролины – регуляторных пептидов нового поколения (Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu), устойчивых к биodeградации. Предложенное решения – определение профиля ответа транскриптома клеток головного мозга в экспериментальной модели ишемического инсульта – имеет важное значение для понимания патологических процессов, регулируемых пептидными лекарственными препаратами при ишемии-реперфузии, обосновывают целесообразность и направления клинической валидации изменений сигнальных путей,

модифицируемых регуляторными пептидами при широком круге критических состояний, развивающихся вследствие ишемии-реперфузии.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Денисова Алина Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук (03.00.15 – Генетика;
14.00.35 – Аллергология и иммунология),
профессор, заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник
лаборатории молекулярных механизмов
критических состояний
НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского
ФГБНУ ФНКЦ РР



Писарев Владимир Митрофанович

5.09.2025 г.

Подпись д.м.н., профессора Писарева Владимира Митрофановича «заверяю»

Зам. директора – руководитель НИИ общей реаниматологии ФНКЦ РР
Кузовлев Артем Николаевич



5.09.2025 г.

Адрес организации Российская Федерация, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2
+7 (495) 641-30-06,
fnkcrr@fnkcrr.ru