

Отзыв официального оппонента

официального оппонента - доктора медицинских наук, академика Российской Академии Наук, заслуженного деятеля науки Российской Федерации, профессора Яхно Николая Николаевича на диссертацию Филимонова Дмитрия Алексеевича на тему «Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клинико-экспериментальное исследование и анализ генетических корреляций», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.11 – нервные болезни

Актуальность избранной темы

Не вызывает сомнений, что проблема высокой смертности и инвалидизации вследствие инсульта имеет большое медико-социальное значение. Несмотря на достаточный объем ресурсов, затраченных на совершенствование методов профилактики и лечения инсульта и очевидные успехи в этом направлении, мировая тенденция эпидемиологических показателей остается негативной. В настоящее время инсульт не является патологией, характерной преимущественно для пожилого возраста. В 2019 году 63% всех случаев инсульта в мире произошли у людей моложе 70 лет. Остается актуальной проблема более глубокой идентификации факторов риска инсульта. В частности, исследование INTERSTROKE показало, что 90% всех случаев инсульта ассоциированы с 10 модифицируемыми факторами риска, а с другой стороны – до 80% всех случаев инсульта происходят у людей с низким или умеренным кардиоваскулярным риском. Фрагментарны также сведения о факторах, влияющих на функциональный исход инсульта.

Состояние проблемы усугубляется тем, что два наиболее эффективных метода предотвращения неблагоприятного исхода инсульта – системный тромболизис и механическая тромбоэкстракция – из-за объективных организационных, технических сложностей, узкого временного интервала

терапии и спектра противопоказаний оказываются доступными для ограниченного числа пациентов. Определенные надежды возлагаются на нейропротекцию, однако, в реальной клинической практике применяется лишь малая часть нейропротекторов, показавших свою потенциальную эффективность в экспериментальных исследованиях. Поиск новых факторов, влияющих на исход инсульта, и разработка новых нейропротекторных стратегий представляют собой две стороны проблемы, требующей комплексного решения.

В данном контексте весьма актуальной является рассматриваемая диссертационная работа, в которой автор не только провёл комплексное изучение роли метаболических процессов, контролируемых тиреоидными гормонами, в развитии тяжелого течения и неблагоприятного исхода инсульта, но и представил экспериментальные данные, подтверждающие перспективность использования аналогов тиреоидных гормонов с целью нейропротекции при ишемическом инсульте.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность научных положений, выдвигаемых на защиту, достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций обусловлена дизайном исследования, в котором интегрированы клинический, экспериментальный этапы, а также мета-анализ генетических ассоциаций для доказательства основной научной гипотезы и выполнения поставленных цели и задач. Тщательно проведенный обзор современных публикаций с акцентом на молекулярные эффекты тиреоидных гормонов в условиях острой ишемии головного мозга обеспечил корректные постановку задач и выбор соответствующих методов для их решения. Важно, что автор использовал современные статистические методы, соответствующие таковым при проведении крупномасштабных клинических исследований в области цереброваскулярной патологии. В частности, применение автором таких методов, как тест Кохрена-Мантеля-Хензеля

(SMN-тест), мультивариантная регрессия с векторным моделированием, в сочетании с хорошо спланированным дизайном клинического исследования позволили исключить влияние вмешивающихся факторов. Использованы международные и валидированные в Российской Федерации оценочные шкалы. При выборе конечных точек исследования автором учтены рекомендации Европейской Организации по борьбе с инсультом по дизайну клинических исследований. При анализе генетических данных использованы современные методы, применяемые в исследованиях в области генома человека - такие как обобщенная менделевская рандомизация, линейное моделирование для дифференциально экспрессируемых генов, функциональное аннотирование генов с использованием данных генетических консорциумов. Исследование с применением менделевской рандомизации выполнены с соблюдением необходимых требований по отбору инструментальных переменных. Сам же метод отличается высокой достоверностью результатов. Выводы и практические рекомендации сформулированы четко и вытекают из полученных результатов.

К настоящему времени в литературе опубликованы результаты ряда исследований, в которых изучалось влияние тиреоидного профиля на тяжесть и функциональные исходы инсульта, однако были получены противоречивые результаты. В этих исследованиях в качестве предиктора тяжести и исхода инсульта в большинстве случаев был выбран уровень тиреотропного гормона (ТТГ), реже – уровни тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3). Тщательный анализ литературных данных и детальное изучение статистических характеристик в исследуемой группе пациентов позволили автору диссертационной работы выделить уровень свободного Т3, как независимого фактора, влияющего на тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта.

Впервые убедительно продемонстрировано нейропротекторное действие изначально высоких уровней (в верхнем квартиле) Т3 в отношении тяжести инсульта и его функционального исхода, что имеет высокую

научную значимость. Доказано, что повышение уровня свободного Т3 в сыворотке в первые 24 часа с момента развития ишемического инсульта ассоциировано с увеличением суммы баллов по Скандинавской шкале на 3 балла. Также увеличение уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л ассоциировано с повышением шансов наступления благоприятного исхода инсульта (менее 3 баллов по модифицированной шкале Рэнкина) на 46%.

Впервые показано разнонаправленное действие Т3 и Т4, как в отношении тяжести неврологического дефицита в острейшем периоде, так и в отношении отдаленных исходов инсульта. Полученные на клиническом этапе диссертационного исследования данные не только предоставляют объяснение диссоциаций в ранее проведенных работах, но и впервые позволили из спектра тиреоидных гормонов выделить трийодтиронин как наиболее перспективную мишень для воздействия с целью улучшения исходов инсульта.

Также важное научное значение представляют полученные автором фундаментальные данные о влиянии метаболитов тиреоидных гормонов (тиронаминов) на процессы, происходящие в условиях экспериментальной очаговой ишемии головного мозга. Предполагается, что многие нейротропные эффекты тиреоидных гормонов реализуются через их «неклассические» формы, такие как тиронамины. В отличие от более изученного тиронамина Т1АМ, автором было акцентировано внимание на нейропротекторные эффекты дейодированного тиронамина Т0АМ. В ходе экспериментального исследования на лабораторных животных автором убедительно продемонстрирована способность тиронамина Т0АМ улучшать функциональное восстановление на модели острого ишемического инсульта, показано положительное влияние Т0АМ как на двигательные, так и на поведенческие и когнитивные нарушения. Впервые доказана способность тиронамина Т0АМ препятствовать накоплению ТБК-активных продуктов и снижению уровня супероксиддисмутазы в ишемизированном полушарии, что

свидетельствует о выраженной антиоксидантной активности данного класса соединений.

Одним из современных методов исследований в области неврологической патологии являются мульти-омиксные аналитические технологии, интегрирующие данные генома, протеома и транскриптома, полученные в ходе секвенирования генома большого количества индивидуумов и представленные в базах данных генетических консорциумов. Эти методы хорошо зарекомендовали себя в поиске новых факторов, влияющих на течение болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза. Автор диссертационной работы, применив генетические аналитические технологии, впервые представил данные о влиянии тиреоидных гормонов на функциональный исход ишемического инсульта. Путем анализа суммарных генетических данных об ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов с уровнем свободного Т3 и риском неблагоприятного исхода инсульта, автором и показано, что генетически детерминированное повышение свободного Т3 на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением риска неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта на 18%. Кроме того, доказана связь гипотиреоза с повышением активности белков системы клеточного апоптоза, таких как апоптоз-индуцирующий фактор-1 и BCL-ассоциированный агонист клеточной смерти. При анализе влияния экспрессии генов в ткани головного мозга на функциональный исход инсульта впервые был определен ряд приоритетных тиреоид-контролируемых генов, влияющих на его исход (гены ANH1, ADRA2A, PYGO). Доказано, что увеличение экспрессии данных генов под влиянием тиреоидных гормонов ассоциировано с уменьшением риска более тяжелого функционального исхода ишемического инсульта. Анализ геной онтологии свидетельствует, что идентифицированные гены связаны с процессами стимуляции нейрогенеза и подавления апоптоза. Впервые описана способность тирокенна индуцировать процессы некроза –

нового механизма тромбообразования, что предоставляет научное объяснение ранее выявленных ассоциаций между гипертиреозом и повышенным риском тромбозов.

Как ясно из вышеизложенного, диссертационное исследование Д.А.Филимонова выполнено на высоком научно-методологическом уровне с применением современных клинических, лабораторных, экспериментальных, аналитических и статистических методов. Объем выборки в клинической части исследования научно аргументирован. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений.

Научные положения, выводы и практические рекомендации полностью обоснованы и вытекают из полученных результатов.

Основные положения диссертации представлены в виде докладов на отечественных и международных конференциях. Так, результаты диссертационного исследования были неоднократно представлены на конгрессах Европейской и Всемирной организаций по борьбе с инсультом (2016, 2020, 2021, 2022 гг.), Всемирном конгрессе неврологов (2017 г.), Всемирном конгрессе по контраверсиям в неврологии (2017, 2022 г.). По материалам диссертации опубликовано 35 печатных работ, включая публикации в рецензируемых иностранных изданиях, а также 11 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Донецкой Народной Республики и Российской Федерации.

Ценность диссертационной работы для науки и практической медицины

В многоэтапном диссертационном исследовании, которое представлено клинической частью, экспериментальным моделированием инсульта и изучением биологической активности тиронаминов, менделевской рандомизацией идентифицированы новые метаболические факторы, влияющие на риск развития, тяжесть и исходы острого нарушения мозгового кровообращения, связанные с системой тиреоидного гомеостаза. Установлено, что из всех доступных маркеров тиреоидной системы

трийодтиронин имеет наибольшее клиническое значение как независимый предиктор, влияющий на тяжесть неврологического дефицита и исход ишемического инсульта. Выполненный в диссертационном исследовании анализ с применением различных методов статистического моделирования доказывает, что высокий уровень трийодтиронина в первые 24 часа с момента развития ишемического инсульта независимо ассоциирован с более благоприятным течением и функциональным исходом. Результаты подтверждаются мета-анализом генетических ассоциаций (менделевская рандомизация), выполненным в крупных когортах пациентов. Полученные данные существенно расширяют представления о роли тиреоидной системы в процессах, происходящих при острой ишемии головного мозга. Следует отдельно отметить результаты диссертационного исследования, позволяющие выделить трийодтиронин как высоко перспективную мишень для разработки новых нейропротекторных стратегий. В работе продемонстрировано более благоприятное течение ишемического инсульта у пациентов с изначально высоким уровнем трийодтиронина, что дает основание для проведения исследования эффективности использования аналогов трийодтиронина с целью улучшения исходов инсульта.

Диссертационная работа Филимонова Д.А. во многом заполняет существующие пробелы в понимании дифференцированного действия тиреоидных гормонов в условиях ишемии головного мозга. В ходе экспериментальной части исследования доказано, что нейропротекторные механизмы трийодтиронина обусловлены биологическим действием его метаболита – тиронамина. Введение синтетических аналогов тиронаминов лабораторным животным в экспериментальной модели ишемического инсульта приводило к лучшему функциональному восстановлению. Доказана способность синтетических аналогов тиронаминов уменьшать выраженность оксидативного стресса в ишемизированной ткани головного мозга. Мета-анализ генетических ассоциаций позволил определить, что на уровне модуляции клеточных сигнальных путей влияние тиреоидных

гормонов на исход инсульта реализуется через подавление проапоптогенных факторов, в частности, индуцирующего апоптоз митохондриального фактора I и активацию антиапоптогенных сигнальных путей (BCL-2, MAPK2). Доказано, что на функциональный исход ишемического инсульта влияет экспрессия в головном мозге ряда генов, контролируемых тиреоидными гормонами. Анализ генной онтологии свидетельствует, что идентифицированные гены связаны с процессами стимуляции нейрогенеза и подавления апоптоза.

Таким образом, в диссертационном исследовании приведены научно аргументированные доказательства того, что тиреоидная система достоверно влияет на тяжесть и исходы ишемического инсульта, а трийодтиронин и его метаболит тиронамин вероятно являются перспективными нейропротекторами. Полученные научные данные могут составить основу для создания новых эффективных нейропротекторных методов.

Практическая значимость полученных результатов исследования

Представленный в диссертационной работе Д.А. Филимонова алгоритм позволяет с высокой точностью определить группы риска неблагоприятного исхода ишемического инсульта. Метод легко реализуем в клинической практике, так как он отличается простотой и требует всего лишь два доступных биомаркера – содержание в сыворотке свободного трийодтиронина и тироксина.

Автором исследования акцентировано внимание на риски неблагоприятных исходов инсульта у пациентов с высоким уровнем тироксина, а в аналитическом этапе диссертационного исследования представлены генетические механизмы реализации данной связи. Полученные результаты могут быть использованы при выборе схемы заместительной терапии L-тироксинем у пациентов с ишемическим инсультом.

Полученные данные обосновывают важность нового – нейроэндокринологического направления в изучении патогенеза острых нарушений мозгового кровообращения и разработке персонализированной терапии.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа представлена в традиционной форме, написана в соответствии с ГОСТ 7.0.11-2011. Диссертация изложена на 314 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, указатель литературы, приложения. Библиографический указатель включает 445 источников литературы, из них 36 – отечественных. Большинство использованных источников опубликованы в течение последних 3-х лет; источники, опубликованные в более ранний период посвящены узкоспециализированной проблеме (тироминам). Работа проиллюстрирована 46 таблицами и 52 рисунками.

Глава 1 посвящена обзору молекулярных нейротропных эффектов тиреоидных гормонов. Классифицированы геномные и негеномные механизмы действия тиреоидных гормонов, направленные на регуляцию работы митохондрий, нейро- и ангиогенез, аксональный транспорт, поддержание цитоскелета, влияние на ионные каналы, активацию и экспрессию специфических белков. Эффекты тиреоидных гормонов в центральной нервной системе систематизированы автором по определенным кластерам: влияние на метаболизм в нейронах и глии, модуляцию апоптоза, нейропластичность и ангиогенез, воздействие на гемостаз, включая локальный и системный иммунный ответ. Приведен анализ соответствия нейропротекторных эффектов тиреоидных гормонов современным направлениям развития нейропротекторных стратегий. Систематизированы сведения о возможности применения нового метода исследований – менделевской рандомизации в контексте цереброваскулярной патологии.

Использованные в обзоре литературы данные и их систематический анализ позволили провести планирование диссертационного исследования и выбор задач и основной цели. Выбранный автором акцент на роли новых неклассических метаболитов тиреоидных гормонов способствовал постановке уникальной задачи – созданию нового синтетического аналога эндогенного тиронамина для доказательства нейропротекторных свойств данного класса соединений.

В главе 2 подробно описаны материалы и методы клинического этапа исследования, экспериментального этапа и методы, используемые при мета-анализе генетических данных. Обращает на себя внимание применение современных статистических методов. Представлены рисунки, демонстрирующие технологию синтеза и характеристики разработанного совместно с Институтом физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко (г. Донецк) нового структурно-модифицированного аналога эндогенного метаболита тиреоидных гормонов (тиронамина). Используются такие наукоемкие технологии, как ЯМР-спектроскопия и программные комплексы оптимизации молекулярной геометрии.

В работе использованы современные шкалы, валидированные в Российской Федерации. Экспериментальное исследование на животных спланировано с учетом рекомендаций консорциума STAIR по изучению нейропротекторных соединений, а также нормативных этических актов Донецкой Народной Республики и Российской Федерации.

Подробно описаны используемые статистические методы, научно аргументирован их выбор.

В главе 3 «Клинико-неврологические характеристики острого периода ишемического инсульта у исследуемого контингента пациентов» автор анализирует демографические показатели и факторы риска инсульта в зависимости от его подтипа. Особый акцент в данной главе поставлен на клинических и лабораторных характеристиках инсульта в зависимости от тиреоидного профиля. Автор проводит анализ различий в анализируемых

показателях в зависимости от различных классификационных подходов по отношению к тиреоидным маркерам: в качестве классифицирующих переменных были использованы уровни ТТГ, уровни Т3 согласно референтному диапазону, уровни Т3 согласно квартилям распределения. Подобный подход обуславливает уникальность исследования, так как он позволил автору идентифицировать принадлежность уровня Т3 к определенному квартилю как фактор, наиболее влияющий на исследуемые показатели. Автор подчеркивает, что существующие лабораторные нормы уровня свободного Т3 не являются актуальными для пациентов с ишемическим инсультом, так как даже незначительное снижение Т3 в пределах нормального диапазона ассоциировано с более неблагоприятным течением инсульта.

Основные положения клинического этапа диссертационного исследования изложены в 4-й главе «Влияние тиреоидных гормонов на характеристики, тяжесть и функциональный исход ишемического инсульта. Результаты клинической части исследования». Впервые автором подробно описаны клинические, неврологические, нейровизуализационные и лабораторные характеристики ишемического инсульта в зависимости от квартилей уровня свободного Т3. При помощи дисперсионного и регрессионного анализа убедительно продемонстрировано более легкое течение инсульта в острейшем периоде у пациентов с изначально высоким уровнем свободного Т3. Доказано влияние уровня Т3 на когнитивные нарушения, оцененные по шкале MMSE. Особую ценность имеет анализ влияния уровня Т3 на функциональные исходы инсульта, выполненный с учетом рекомендаций Европейской организации по борьбе с инсультом. Так, согласно данным рекомендациям автором была выбрана порядковая конечная точка (вся шкала Рэнкина), что позволило доказать положительное влияние уровня трийодтиронина на шансы более лучшего функционального исхода инсульта даже в пределах неблагоприятного диапазона (3-6 баллов по шкале Рэнкина).

Изложенные в этой главе данные позволили автору разработать алгоритм прогнозирования неблагоприятного функционального исхода ишемического инсульта. Подробно описаны статистические характеристики алгоритма, приведены доказательства его преимущества по сравнению с другими предикторами. Вся статистическая информация представлена на наглядных графиках.

Глава 5 «Биологические и нейропротекторные эффекты синтетического аналога тиронамина в экспериментальной модели ишемического инсульта» посвящена очень интересному с точки зрения фундаментальной нейронауки этапу диссертационного исследования - изучению нейропротекторных свойств метаболитов тиреоидных гормонов. Следует отметить, что при фундаментальном характере описанного в данной главе исследования, его результаты имеют и очень важное практическое значение, так как открывают перспективы создания новых нейропротекторных препаратов на основе структурно-модифицированных аналогов тиронамина. Автором подробно описаны гипотермические эффекты разработанной субстанции, ее влияние на неврологические и поведенческие функции у лабораторных животных в модели ишемического инсульта. Убедительно доказаны более легкие исходы экспериментальной ишемии на седьмые сутки в группе животных, получавших тиронамин. Внимание уделено сравнительному анализу маркеров активности оксидативного стресса в ишемизированном и интактном полушариях головного мозга на фоне введения тиронамина и в контроле.

В 6 главе «Мета-анализ генетических корреляций между тиреоидным статусом, риском и функциональным исходом цереброваскулярных заболеваний» изложены инновационные данные о результатах аналитического исследования в области генома, транскриптома и протеома, доказывающего связь тиреоидного гомеостаза с функциональным исходом инсульта. В ходе исследования были использованы первичные генетические данные из различных международных генетических консорциумов, такие как

сеть GISCOME, MEGASTROKE, проект Genotype-Expression (GTEx), база данных Gene Expression Omnibus (GEO), проект MetaBrain. Согласно полученным данным, генетически прогнозируемое повышение уровня свободного трийодтиронина на 1 пмоль/л ассоциировано со снижением риска неблагоприятного исхода ишемического инсульта на 18%. Данный этап диссертационной работы является инновационным исследованием, направленным на использование менделевской рандомизации в оценке влияния фенотипов, ассоциированных с тиреоидным статусом, на благоприятный функциональный исход ишемического инсульта.

Исследование промежуточных фенотипов методом менделевской рандомизации позволило автору обнаружить влияние экспрессии гена, кодирующего тиреоидные рецепторы бета, на уровень ряда белков плазмы, ассоциированных с регуляцией апоптоза, в частности, с протеинами BCL-2 и MAPK. BCL-2 является одним из главных белков системы клеточного сигналирования системы BCL и обладает выраженным антиапоптогенным действием. Полученные автором данные хорошо согласуются с результатами экспериментальных исследований.

Использование современных аналитических технологий в области генома человека, таких как обобщенная менделевская рандомизация, исследование локусов количественных признаков и GWAS-исследования, позволило автору провести анализ влияния экспрессии большого количества генов на функциональный исход ишемического инсульта, и идентифицировать наиболее приоритетные гены, контролируемые тиреоидными гормонами. Автором подробно описаны молекулярные механизмы и сигнальные пути, управляемые данными генами, использованы технологии функционального аннотирования генов. Установлено, что трийодтиронин является положительным регулятором экспрессии большого числа генов, стимулирующих нейрогенез и выживаемость нейронов.

Изложенные в этой главе данные существенно расширяют научные представления о молекулярных механизмах нейропротекторных эффектов тиреоидных гормонов.

В главе, посвященной Обсуждению результатов исследования, содержится анализ полученных данных с их систематизацией и сопоставлением с данными литературы.

Автореферат изложен с отражением научной новизны, основных результатов и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций. Его содержание соответствует основным положениям диссертации.

Принципиальных замечаний к работе нет. Есть практический вопрос - используя полученные клинико-экспериментальные данные, возможно ли уже на данном этапе разработать методику применения аналогов трийодтиронина в острейшем периоде ишемического инсульта и в стадиях его последствий с целью улучшения функциональных исходов?


Заключение

Диссертационное исследование Филимонова Дмитрия Алексеевича является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований представлено решение важной научной проблемы, заключающейся в поиске новых метаболических факторов, влияющих на тяжесть и исход ишемического инсульта, а также в идентификации новых молекулярных мишеней для разработки методов терапии, направленных на улучшение исходов нарушений мозгового кровообращения. Полученные результаты имеют важное значение для неврологической науки и практического здравоохранения. В работе использованы инновационные и наукоемкие подходы и методы. По актуальности темы, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Филимонова Дмитрия Алексеевича «Влияние тиреоидного гомеостаза на течение и исход острой цереброваскулярной патологии: клинико-экспериментальное исследование и


ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), а также п.2.1. «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Совета Министров Донецкой Народной Республики от 27.02.2015 г. №2-13, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор Филимонов Дмитрий Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.11 – нервные болезни.

Отзыв направляется в диссертационный совет Д 01.026.06 на базе ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького».

Официальный оппонент,
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН, Заслуженный деятель
науки РФ, профессор кафедры нервных
болезней и нейрохирургии
Института клинической медицины им. Н.В Склифосовского
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет)


Н. Н. Яхно

Даю согласие на сбор, хранение и
обработку персональных данных


Н. Н. Яхно

Подпись доктора медицинских наук, профессора, академика РАН, профессора кафедры нервных болезней и нейрохирургии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Яхно Н.Н. заверяю.

Ученый секретарь ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России,
Заслуженный врач РФ,
профессор, доктор медицинских наук,

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
8(499)248-53-83; expedition@sechenov.ru




О.Н. Воскресенская