

Відгук
офіційного опонента на дисертацію Литвиненко Олени Семенівни
«Нейропротективна активність модуляторів системи глутатіону в
умовах моделювання церебральної ішемії», представлену на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми

Незважаючи на значні досягнення в сучасній ангіоневрології, проблема гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) продовжує зберігати надзвичайну медичну і соціальну значущість. Інсульти є другою за значимістю причиною смертності та провідною причиною інвалідності серед жителів України, створюючи серйозне навантаження для системи охорони здоров'я, економіки і всього суспільства.

Аналіз літератури останніх 5 - 7 років свідчить про позитивні ефекти застосування нейропротекторів на догоспітальному та госпітальному етапі терапії ішемічного інсульту. Але на жаль, базові ноотропні і нейрометаболітні препарати не завжди надають очікуваний нейропротективний ефект в гострому періоді церебральній ішемії. У зв'язку з цим, надзвичайно актуально застосовувати науково обгрунтований підхід для раціонального вибору лікарських засобів, призначених оптимізувати стандартну терапію.

Тому дослідження молекулярно-біохімічних уражень головного мозку при ГПМК та розробка нових підходів до таргетної нейропротекції, найбільш перспективними мішенями якої вважаються підвищення механізмів ендогенної нейропротекції та нейропластичності визначає актуальність цього дослідження з можливістю використання отриманих результатів в клінічній практиці. В механізмах ендогенної нейропротекції значну роль грає тіол-дисульфідна система. Глутатіон, який є основним компонентом антиоксидантного захисту нейрона і підвищує його стійкість в умовах

гіпоксії, також виступає, як резерв цистеїну в клітині, робить регулюючий вплив на синтез та стабільність білків теплового шоку, бере участь у реалізації механізмів програмованої клітинної загибелі. Збільшення системного рівня глутатіону за допомогою застосування модуляторів синтезу глутатіону є сучасною стратегією поповнення дефіциту глутатіону при окислювальному стресі, імунодефіциті або передозуванні ксенобіотиків.

Наявність досить активної тіольної антиоксидантної системи забезпечує стійкість нейрона до оксидативного і нітрозативного стресу, а також бере участь у механізмах регуляції ендогенної нейропротекції. Таким чином, пошук і розробка методів лікарської корекції антиоксидантного статусу при церебральній ішемії на основі модуляції системи глутатіону є важливим і перспективним завданням сучасної фармакології. Вище наведена інформація теоретично обґрунтовує перспективність вивчення сучасних препаратів: біс(гама-L-глутаміл)-L-цистеїніл-біс-гліцин динатрієвої солі (глутоксим), селеніту натрію (селеназа) і глутаредоксину в якості нейропротективних засобів.

Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково - дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно - біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP₇₀/HIF-1 α -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020 рр).

Ступень обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій сформульованих у дисертації

Робота ґрунтується на аналізі експериментальних досліджень присвячених вивченню нейропротективній активності селеніту натрію, біс(гама-L-глутаміл)-L-цистеїніл-біс-гліцин динатрієвої солі та

глутаредоксину-1, які були проведені на 242 статевозрілих самцях монгольських піщанок (*Meriones unguiculatus*), 70 білих статевозрілих нелінійних щурах – самцях, 40 чотирьохтижневих білих щурятах. В роботі використані адекватні поставленим завданням методи досліджень.

Достовірність отриманих результатів обумовлена однорідністю вибірки об'єктів експерименту, використанням уніфікованих, стандартизованих, сучасних методів кількісного аналізу, узгодженістю з результатами опублікованих раніше досліджень, теоретичним обґрунтуванням отриманих експериментальних даних. Основні положення та висновки дисертації аргументовані та обґрунтовані представленими матеріалами.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше встановлено, що нейропротективна активність селенази, глутоксиму і глутаредоксину в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку спрямована на активацію глутатіон - залежних ланок ендогенної нейропротекції.

Вперше встановлено, що досліджувані модулятори системи глутатіону - селеназа, глутоксим і глутаредоксін підвищують експресію мРНК HSP₇₀, NIF-1 α і NIF-3 α в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку.

Вперше показано, що курсове введення селенази, глутоксима і глутаредоксина тваринам з гострою ішемією головного мозку підвищують вміст ендогенного нейропротектора- білка теплового шоку HSP₇₀.

Розширено дані про вплив глутаредоксина і глутоксима на енергетичний обмін і функціональну активність мітохондрій головного мозку в умовах ішемії.

Встановлено, що селеназа, глутоксим і глутаредоксін гальмують реакції оксидативного та нітрозуючого стресу на тлі нормалізації глутатіонової системи в головному мозку експериментальних тварин.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 126977 «Спосіб зменшення ексайтотоксичності в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровообігу».

Практичне значення одержаних результатів

На підставі проведених досліджень експериментально доведена можливість доцільності застосування селенази, глутоксима і особливо, глутаредоксіна в комплексній нейропротекції гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів фармакокорекції порушень глутатіон-залежних ланок ендогенної нейропротекції.

Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням для застосування селенази, глутоксима в комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів первинної нейропротекції.

Експериментальні дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень глутаредоксіну з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією.

Експериментально встановлені механізми дії модуляторів системи глутатіону можуть сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, які надають спрямований вплив на ключові ланки механізмів ендогенної нейропротекції.

Повнота викладення матеріалів дисертації

За результатами досліджень опубліковано 17 наукових робіт, у тому числі 7 статей у фахових журналах України, 3 з яких реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, Ulrich`s Periodical Directory, 9 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України.

Характеристика змісту дисертації

Дисертація побудована традиційно і викладена на 220 сторінках друкованого тексту та складається з анотацій, списку друкованих праць, основної частини, яка включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, 2 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел та додатків. Робота

проілюстрована 26 рисунками, 20 таблицями. Список використаних джерел містить 305 найменувань, з них – 135 кирилицею та 170 латиницею.

У вступі до дисертації автором розкрита актуальність дослідження, що вивчається, дана характеристика об'єкта, предмета, методів дослідження, висвітлена мета та завдання дослідження.

Обсяг і структура дисертації

Мета дослідження сформульована конкретно и передбачає вивчення молекулярно-біохімічних механізмів впливу селенази, глутоксиму та глутаредоксину на глутатіон – залежні ланки ендогенної нейропротекції в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровообігу. Для досягнення поставленої мети автором на підставі проведеного літературного огляду з аналізом невирішених питань сформульовані конкретні завдання. Наведені наукова новизна, практична значущість роботи, впровадження результатів дослідження, особистий внесок автора, апробація результатів дослідження та публікації.

В огляді літератури акцентовано увагу на зустрічальності ішемічного інсульту і тяжкість наслідків патобіохімічних реакцій ішемічного каскаду. Описані сучасні схеми лікування гострої церебральної ішемії її переваги і недоліки. Визначені перспективні мішені фармакологічної корекції зазначених станів.

Підкреслена перспективність впливу модуляторів системи глутатіону на механізми ендогенної нейропротекції і нейропластичності, в якості мішені фармакологічного впливу при гострому порушенні мозкового кровообігу.

У розділі II описані матеріали та методи дослідження, дана характеристика предмету та об'єкту дослідження. Надана характеристика тварин залучених до експериментальних досліджень та характеристика лікарських засобів використаних в роботі. Надана структура експериментального дослідження, описані експериментальні моделі, фармакологічні, біохімічні, імунологічні, молекулярно-генетичні та статистичні методи дослідження. Таким чином, обрані експериментальні

моделі та методи дослідження є адекватними для всебічного розкриття мети та завдань, а загальна кількість об'єктів дослідження дозволяє зробити повноцінний статистичний аналіз отриманих результатів.

У розділі III наведено власні експериментальні дані, а саме дослідження нейропротекторної активності селеніту натрію, біс(гама-L-глутаміл)-L-цистеїніл-біс-гліцин динатрієвої солі і глутаредоксину-1 в досліджах *in vitro*.

Була проаналізована дія досліджуваних препаратів при моделюванні нейродеструкції в трьох моделях при додаванні нейротоксичних доз глутамату, 1-хлор-2,4-динітробензолу, а також дінітрозольного комплексу заліза з цистеїном.

Встановлено, що попереднє внесення в суспензію нейронів селенази, глутоксима і глутаредоксина ($10^{-3}M$) з подальшим моделюванням нейродеструкції *in vitro* призводило до зниження маркерів ушкодження нейронів - NR2, АФГ, КФГ і підвищення СОД, глутатіону відновленого. У ході порівняльного аналізу було визначено лідер по силі нейропротективної дії - глутаредоксін, який проявив себе як найбільш ефективний в ряду досліджуваних препаратів за такими показниками, як відновлений глутатіон, глутатіонредуктаза, нітротирозин, HSP₇₀, NR-2 пептид і перевершував значення референс- препаратів мексидола і тіотриазоліну за перерахованими вище та АФГ, КФГ і глутатіонпероксидаза.

На підставі отриманих даних *in vitro* дисертантом були визначені тісні позитивні кореляційні залежності між вмістом відновленого глутатіону і HSP₇₀ білка, а також тісні негативні кореляційні залежності між маркерами нейродеструкції і HSP₇₀. Встановлено прямий зв'язок між зростанням внутрішньоклітинного рівня HSP₇₀ і розвитком антиоксидантної відповіді в умовах нейродеструкції *in vitro*.

Дослідженнями встановлено, що реалізація нейропротективних ефектів препаратів пов'язана з їх позитивним впливом на глутатіонову ланку ТДС і як наслідок підвищення активності компонентів ендогенної нейропротекції –

HSP₇₀. Можливими механізмами, яких є скоординована зміна експресії генів антиоксидантних ферментів, генів глутатіон-залежних ферментів і ферментів, які контролюють внутрішньоклітинний рівень глутатіону, а також генів HSP₇₀.

У розділі IV наведені власні експериментальні дані, щодо нейропротективної активності досліджуваних препаратів при гострому порушенні мозкового кровообігу у монгольських піщанок.

Дисертантом були представлені результати досліджень при моделюванні гострого порушення мозкового кровообігу, яке призводить до порушення тіол-дисульфідної рівноваги, зниження активності антиоксидантних ферментів, розвитку оксидативного та нітрозативного стресу, стійкого енергодефіциту та мітохондріальної дисфункції, що в кінцевому підсумку веде до тяжких неврологічних порушень та загибелі експериментальних тварин.

Дисертантом показано, що курсова терапія селеназою, глутоксимом і глутаредоксіном призводить до зменшення проявів оксидативного та нітрозативного стресу про, що свідчить зниження маркерів нейродеструкції (АФГ, КФГ, нітротирозину) на тлі зростання маркерів нейропротекції (HSP₇₀, HIF, ГР, ГПО, Г-S-T, СОД, каталази).

Важливою ланкою механізму дії досліджуваних нейропротекторів є їх участь в нормалізації тіол-дисульфідної рівноваги.

Також встановлено, що курсове застосування досліджуваних нейропротекторів призводить до зниження ступеня енергодефіциту, за рахунок інтенсифікації аеробних шляхів окиснення глюкози, що призводить до зниження лактат-ацидозу. На підставі отриманих даних зроблені висновки, щодо зниження летальності та неврологічного дефіциту у експериментальних тварин при курсової терапії модуляторами ТДС.

У розділі V дисертантом були узагальнені отримані результати. На підставі проведених досліджень було встановлено, що селеназа, глутоксим, і особливо глутаредоксін, проявляють значний нейропротективний ефект при

ГПМК, який спрямований на обмеження глутаматної ексайтотоксичності, поліпшення енергетичного метаболізму головного мозку, гальмування оксидативного стресу, нормалізацію глутатіонової ланки ТДС і підвищення концентрації HSP₇₀ і NIF, що в підсумку призводить до зниження летальності та зменшення неврологічного дефіциту. Механізм нейропротективної дії модуляторів системи глутатіону пов'язаний з активацією глутатіон-залежних ланок ендогенної нейропротекції, а саме – із підвищенням експресії HSP₇₀ і NIF, що призводить до посилення адаптаційних механізмів (експресія антиоксидантних ферментів, активація компенсаторних енергетичних шунтів), які підвищують резистентність нейронів до ішемії. Зроблені висновки, що отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для застосування селенази, глутоксима і, особливо, глутаредоксіна в комплексній терапії мозкових інсультів в якості засобів первинної нейропротекції.

Зауваження:

1. У розділі «Матеріали і методи» відсутній підрозділ, який схематично або текстово відображав би дизайн дослідження.
2. Не проведено статистичний аналіз важливих показників нейропротективної ефективності: поведінки, летальності, неврологічного статусу тварин різних експериментальних груп за методом Каплана-Мейєра з розрахунком кумулятивного критерію виживання.
3. У дослідженні не вивчалось співвідношення рівня окисленого глутатіону до відновленого глутатіону.

Ці зауваження, не є принциповими, не впливають на загальну оцінку рецензованої роботи та дисертації в цілому і не зменшують її високу практичну і наукову значимість.

У рамках дискусії хотілось би отримати відповіді на наступні запитання:

1. Виходячи з загальноприйнятої концепції нейропротекції та базуючись на власних результатах дослідження, на якому етапі

нейропротективної терпії Ви плануєте використовувати модулятори глутатіонової системи - на первинному або вторинному?

2. Вами отримані переконливі дані про підвищення продукції АТФ в ішемізованому головному мозку під дією модуляторів глутатіонової системи. Який механізм цієї дії, з урахуванням того, що ці препарати не є субстратами окислення, інтермедіатами циклу Кребса або цитозольно-мітохондріальних компенсаторних шунтів продукції енергії?

3. У дослідах *in vitro* Ви отримали дані, що модулятори системи глутатіону достовірно зменшують глутаматну ексайтотоксичність, знижуючи гіперзбудливість NMDA рецепторів нейронів. Це конкурентний або неконкурентний антагонізм? Які риси фармакологічного характеру посилюють цей ефект?

Висновки

Дисертаційна робота Литвиненко О.С. «Нейропротективна активність модуляторів системи глутатіону в умовах моделювання церебральної ішемії» є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовані і обґрунтовані наукові положення сукупність, яких можна кваліфікувати, як нове розв'язування важливого наукового завдання-терапії гострих порушень мозкового кровообігу. За актуальністю, новизною отриманих даних, використаними методами досліджень, дисертація є закінченим науковим дослідженням та відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року (зі змінами), а її автор Литвиненко Олена Семенівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

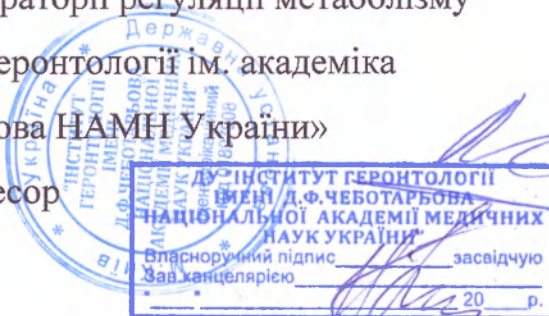
Офіційний опонент:

Завідувач лабораторії регуляції метаболізму

ДУ «Інститут геронтології ім. академіка

Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

д.мед.н., професор



О.К. Кульчицький