

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Княрян Вардуи Арутюновны по теме
**«Механизмы нейродегенерации и нейропротекции в спинном мозге
при экспериментальной болезни Паркинсона»**,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.00.04 – «Биохимия»

Актуальность темы. Болезнь Паркинсона (БП) относится к числу наиболее социально значимых заболеваний в связи с прогрессивным увеличением численности больных и их неизбежной инвалидизацией. За последние годы принципиально изменились представления о БП, которая на сегодняшний день определяется как мультисистемное и мультинейромедиаторное заболевание и проявляется разнообразными моторными и немоторными симптомами. Применяющаяся на сегодняшний день заместительная дофаминергическая терапия лишь частично компенсирует нарастающие моторные нарушения, практически не влияя на аксиальные симптомы заболевания, такие как постуральные расстройства, нарушения походки, падения, а также на вегетативные, сенсорные, эмоционально-аффективные расстройства. Более того, не одно из направлений терапевтического или хирургического лечения БП не способно повлиять на ход нейродегенеративного процесса. В связи с этим расширение представлений об экстранигральных изменениях, способных объяснить развитие тех или иных симптомов представляется чрезвычайно важным. Нейродегенеративные изменения в спинном мозге, несомненно, играют значение в развитии целого ряда симптомов. Определение ключевых биохимических и молекулярных изменений развивающихся в условиях БП в спинном мозге, имеющих однонаправленный характер с изменениями в головном мозге имеет важнейшее значение для понимания глобального характера заболевания, и, что наиболее важно, создают предпосылки для разработки терапевтических мишеней, способных оказать нейропротекторный эффект.

Цели и задачи исследования.

Целью исследования явилось изучение биохимических и молекулярных механизмов нейродегенерации спинного мозга и выявлении в его структурах патологических изменений, характерных для БП, с использованием *in vivo* и *in vitro* нейротоксических экспериментальных моделей БП, а также аутопсийного материала спинного мозга больных БП.

Для решения поставленной цели определено ряд задач:

1. Экспериментальное *in vivo* моделирование БП у мышей линии C57BL/6N с использованием митохондриального нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП); доказательная оценка МФТП-индуцированной нейродегенерации в нигростриатуме.
2. Доказательство прямого нейротоксического воздействия МФТП на спинной мозг путем: а) количественного определения активного метаболита МФТП – 1-метил-4-фенилпиридина (МФП+) в условиях *in vivo* и *in vitro*; б) определения активности и экспрессии моноаминоксидазы типа Б (МАО-Б), экспрессии транспортера дофамина (ДАТ) и высокоаффинного захвата МФП+ в спинном мозге; в) идентификации поврежденных TUNEL+ нейронов и МФТП-индуцированной нейродегенерации в спинном мозге C57BL/6N мышей; г) определения ключевых молекул, участвующих в нейроапоптозе.
3. Экспериментальное моделирование БП у линейных Lewis крыс (*in vivo*) с использованием ротенона и исследование спинного мозга крыс для выявления нейродегенерации, астроглиоза и микроглиоза, экспрессии и активации кальпаина и каспазы-3 и их нейрональной локализации.
4. Сравнительное исследование аутопсийных образцов спинного мозга больных БП и неврологически здоровых лиц для выявления нейродегенерации, аксональной дегенерации, активации медиаторов воспаления, активации кальпаина, изменений уровня продуктов распада белка цитоскелета – спектрина.
5. Моделирование БП *in vitro* в культуре дифференцированных VSC 4.1 мотонейронов с использованием МФП+ и ротенона и изучение кальпаинового пути апоптоза под действием нейротоксинов по следующим показателям: а) жизнеспособность и морфологическая оценка VSC 4.1 мотонейронов; б) динамика роста внутриклеточного Ca^{2+} (вк[Ca^{2+}]); в) экспрессия и активация кальпаина и каспазы-3, образование специфических продуктов распада спектрина; г) цитопротекторный эффект синтетического ингибитора кальпаина – кальпептина.
6. Моделирование БП *in vitro* с использованием МФП+ и ротенона в культуре SH-SY5Y клеток нейробластомы дифференцированных в фенотипические дофаминергические (SH-SY5Y-DA) и холинергические (SH-SY5Y-ChAT) клетки. Изучение кальпаинового пути апоптоза SH-SY5Y-DA и SH-SY5Y-ChAT клеток под действием нейротоксинов 6 по указанным выше (5 а, б, в) показателям, а также определение а) реактивных форм

кислорода (АФК); б) медиаторов воспаления; в) изучение цитопротекторного эффекта синтетического ингибитора кальпаина – SNJ-1945.

7. Оценка нейропротекторного эффекта кальпептина в головном и спинном мозге C57BL/6N мышей в МФТП-индуцированной модели БП (in vivo) по следующим показателям: а) выживаемость дофаминергических нейронов nigростриатума по уровню иммунореактивности на тирозингидроксилазу (ТГ); б) выживаемость нейронов и мотонейронов спинного мозга; в) регуляция уровня активного кальпаина и образования кальпаин-специфических продуктов распада спектрина в головном и спинном мозге; г) модуляция нейровоспалительного ответа в спинном мозге; д) коррекция параметров шага мышей (DigiGait анализ).

Научная новизна и практическая значимость работы.

Представленная работа носит фундаментальный характер и посвящена изучению биохимических и молекулярных механизмов нейродегенерации в спинном мозге с изучением клеточных и экспериментальных моделей БП, а также аутопсийного материала больных БП. В работе на экспериментальных моделях было показано, что МФТП и ротенон оказывают аналогичный нейротоксический эффект на нейроны и аксоны спинного мозга, как и на дофаминергические нейроны nigро-стриарной системы. Установлена ключевая роль в развитии нейродегенерации кальпаин опосредованного механизма, что было доказано с использованием как экспериментальных моделей, так и, впервые в мире, аутопсийного материала спинного мозга больных БП. Впервые были определены преобладающие векторы апоптоза дофаминергических и холинергических нейронов. С учетом установленного преобладающего кальпаинового звена нейродегенерации было предложено использовать в качестве цитопротектора синтетические ингибиторы кальпаина - – кальпептин и SNJ-1945. Важнейшим итогом многоступенчатой работы стало доказательство нейропротективного эффекта кальпептина на клеточных и экспериментальных моделях с использованием МФТП, что является очень значимым практическим результатом проведенной работы.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 390 источников. Работа изложена на 209 страницах компьютерного текста, содержит 5 таблиц и 44 рисунка.

Глава “Обзор литературы” состоит из 4 частей, в которых изложены общие представления, этиология и эпидемиология болезни Паркинсона (БП), современные представления о ключевых патогенетических механизмах БП, обзор литературных данных о ключевой роли кальпаина в развитии нейродегенеративных процессов, концепция нигральной и экстранигральной патологии БП, распространение патологических процессов в спинном мозге, описаны принципы токсических моделей БП, с использованием паркинсонических нейротоксинов МФТП и ротенона.

В экспериментальной части представлено подробное описание материалов и методов исследования, детали моделирования БП (*in vitro*, *in vivo*), культивирования и дифференциации клеточных культур, методы определения нейродегенерации и нейропротекции, описание специфических антител, использованных в работе.

Глава “Результаты исследования и их обсуждение” состоит из 6 разделов. Первый раздел включает данные о повреждении нейронов спинного мозга в *in vivo* МФТП-индуцированной экспериментальной модели БП. Представлены биохимические механизмы нейротоксичности МФТП в головном и спинном мозге линейных C57BL/6N мышей. Второй раздел посвящен изучению спинного мозга в *in vivo* ротенон-индуцированной модели БП для выявления нейродегенерации, экспрессии и активации кальпаина и каспазы-3, детекции продуктов распада их субстрата спектрина, активации медиаторов нейровоспаления, астроцитоза и микроглиоза. Третий раздел посвящен сравнительному анализу аутопсийных образцов спинного мозга больных БП (*postmortem*) и неврологически здоровых лиц. Приведены данные, свидетельствующие о дегенерации нейронов и аксонов спинного мозга, активации медиаторов воспаления в спинном мозге больных БП. Результаты исследований указывают на участие кальпаина в процессах нейродегенерации спинного мозга больных БП.

В четвертом и пятом разделах исследованы механизмы апоптоза клеток на *in vitro* клеточных моделях БП, индуцированных МФТП и ротеноном, с использованием дифференцированных VSC 4.1 мотонейронов и SH-SY5Y клеток нейробластомы. Представлены данные, подтверждающие митохондриальный кальпаин-опосредованный путь гибели клеток, приведены результаты цитопротекторного действия ингибиторов кальпаина – кальпептина и SNJ-1945 в культуре VSC 4.1 мотонейронов и SH-SY5Y клеток, соответственно.

Шестой заключительный раздел посвящен изучению нейропротекторной роли кальпептина в головном и спинном мозге в *in vivo* МФТП-индуцированной модели БП.

Представлены данные об эффективном действии кальпептина на выживаемость нейронов и мотонейронов спинного мозга, а также снижении нейровоспалительного ответа. Представлен сравнительный анализ данных мониторинга параметров шага у C57BL/6N мышей и положительное регулирующее действие кальпептина.

По результатам *in vitro* и *in vivo* исследований обсуждается ключевая роль кальпаина в процессах дегенерации нейронов, мотонейронов и аксонов спинного мозга, подчеркивается нейропротекторная роль кальпептина и SNJ-1945.

Основные результаты исследований обобщены в “Заключении”. Исходя из положительного действия кальпептина и SNJ-1945 на выживаемость нейронов, предлагается проведение всесторонних исследований с использованием ингибиторов кальпаина с целью предотвращения и/или замедления распространения нейродегенеративных и нейро-воспалительных процессов в головном и спинном мозге. Представлена схема кальпаин-опосредованного пути нейродегенерации спинного мозга в *in vivo* и *in vitro* экспериментальных моделях БП, индуцированных МФТП, МФП⁺ и ротеноном. Указаны ключевые процессы, ведущие к дегенерации нейронов и аксонов спинного мозга и возможные точки приложения кальпептина и SNJ-1945. На основании полученных результатов сделано 14 выводов.

Замечания. Принципиальных замечаний к работе Княрян Вардуи Арутюновны «Механизмы нейродегенерации и нейропротекции в спинном мозге при экспериментальной болезни Паркинсона» нет.

Заключение оппонента

Диссертационная работа Княрян В.А. выполнена на современном научном уровне, полученные результаты имеют фундаментальное и практическое значение для медикобиологической науки, нейробиологии и фундаментальной нейрхимии.

Следует подчеркнуть, что работа Княрян В.А. имеет ключевое значения для практической медицины и дает надежду на использование нейропротекторных препаратов новой направленности, позволяющих воплотить мечту о превентивном лечении БП. Это позволит если не остановить нейродегенерацию и вылечить больного, то существенно замедлить скорость нейродегенерации и, таким образом, продлить период нормальной физической и социальной активности больного БП.

Полученные в работе результаты обработаны с помощью современных статистических методов, представлены в виде таблиц, графиков и рисунков и хорошо

иллюстрируют материал. Автор неоднократно докладывал результаты своей работы на конференциях и конгрессах международного уровня. По теме работы опубликовано 20 статей и 22 тезиса в ведущих мировых журналах. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Считаю, что представленная диссертационная работа удовлетворяет требованиям Высшего аттестационного комитета Республики Армения, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор - Вардуи Арутюновна Кнарян заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – «Биохимия»

Доктор медицинских наук, доцент, профессор
кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской
генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО
«Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России
117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1
Тел: +7(495)-434-84-64
E-mail: rsmu@rsmu.ru

Катунина Е. А.

Подпись, ученую степень, ученое звание Катуниной Елены Анатольевны заверяю.
Ученый секретарь ФГАОУ ВО
«РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России
Д.м.н., доцент



О.Ю. Милушкина