

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Княрян Вардуи Арутюновны на тему «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»

Краткая характеристика работы

Рецензируемая работа посвящена изучению нейродегенерации спинного мозга при болезни Паркинсона (БП) и выявлению молекулярных механизмов, участвующих в этих процессах. В качестве центрального механизма рассматривается митохондриальный путь дегенерации и апоптоза нейронов спинного мозга при участии Ca^{2+} -зависимой протеазы – кальпаина, активация которого, с одной стороны, приводит к расщеплению внутриклеточных структурных белков, а с другой стороны – к активации целого ряда губительных для нейронов внутри- и внеклеточных процессов, включая астроглиоз, микроглиоз и нейровоспаление.

Состояние проблемы

Исследование спинного мозга при болезни Паркинсона (БП) не является случайным, это – научно обоснованная тема. Известно, что БП относится к категории двигательных заболеваний, при котором нарушается контроль и регуляция произвольных движений, развиваются характерные клинические симптомы (тремор, ригидность мышц, брадикинезия и постуральная неустойчивость). На самом деле, комплексная патология БП имеет гораздо более сложную картину, а лечение носит симптоматический характер. Многолетние клинические наблюдения показали, что наряду с моторными дисфункциями, которые проявляются на поздних стадиях БП, на ранних стадиях обозначаются автономные, вегетативные, сенсорные и нейропсихиатрические расстройства, вызванные повреждением экстраингральных отделов.

С биохимической точки зрения двигательные расстройства возникают вследствие нейродегенерации дофаминергических нейронов черной субстанции, снижении уровня дофамина и редукции дофаминергической нейротрансмиссии в хвостатом ядре полосатого тела – стриатуме. Гистопатологическими маркерами поврежденных дофаминергических нейронов считаются тельца и нейриты Леви, состоящие из агрегированных молекул фибриллярного белка α -синуклеина. Однако, тельца Леви обнаруживаются и в экстраингральных отделах ЦНС, что свидетельствует о распространении патогенетических процессов вне нигростриатума что, возможно, объясняет комплексный характер симптоматики БП. На этом основании была сформулирована концепция нигральной и экстраингральной патологии БП (Форно, 1974) и предложена теория стадийного развития БП (Браак 1995, 2003). Согласно теории Браака последовательное развитие немоторных и моторных симптомов происходит вследствие патологических изменений в дискретных отделах ЦНС, которые каудально распространяются в область ствола мозга и черной субстанции. Однако, этот вопрос все еще является спорным и требует доказательств.

Симптоматика БП, патологоанатомические и экспериментальные данные указывают на вовлечение спинного мозга в сложных переплетениях патологических процессов, а его роль рассматривается в контексте развития как моторных, так и немоторных вегетативных симптомов. С нейрофизиологической точки зрения, спинной мозг завершает общий интеграционный путь импульсов, которые контролируют двигательные функции,

осуществляется инициация шага и рефлекторная регуляция движения мышц. В работах др. Браака указываются также признаки нейро-аксональной дегенерации в спинном мозге больных БП. Морфологические изменения, в частности, характерная для БП синуклеопатия в спинном мозге, указывает на схожий с головным мозгом механизм деструкции нейронов.

Следует отметить, что в литературном обзоре диссертации последовательно раскрыты биохимические механизмы БП, ключевые положения нигральной и экстранигральной патологии, подробно представлены нейрофизиологические и гистопатологические данные по спинному мозгу при БП, цитируются значимые публикации касающиеся и нейробиологии спинного мозга при БП.

Спинной мозг является тем экстранигральным отделом ЦНС, изучение которого долгое время выпадало из поля зрения ученых. Основная причина заключается в том, что разработанные экспериментальные модели БП изначально были предназначены для изучения нигростриатной системы, не исключая возможности исследования экстранигральных областей головного мозга. Однако используемые в научных экспериментах модели БП не были валидированы для изучения спинного мозга. Это касается, в первую очередь, наиболее часто используемой и адекватной МФТП-индуцированной животной модели. Благодаря профессиональному подходу, в работе впервые показан метаболический путь прямого воздействия МФТП на нейроны спинного мозга, что служит научной основой и валидирует МФТП модель для изучения спинного мозга.

Цель работы

Автор поставил цель изучить биохимические и молекулярные механизмы нейродегенерации спинного мозга, выявить в его структурах патологические изменения, характерные для БП, с использованием *in vivo* и *in vitro* нейротоксических экспериментальных моделей БП и аутопсийного материала спинного мозга больных БП (*postmortem*).

Задачи, направленные на достижение поставленной цели были следующими

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) и доказательная оценка МФТП-индуцированной нейродегенерации в нигростриатной системе.
2. Доказательство прямого нейротоксического воздействия МФТП на спинной мозг путем:
 - а) количественного определения активного метаболита МФТП – 1-метил-4-фенилпиридин иона (МФП+) в головном и спинном мозге в условиях *in vivo* и *in vitro*;
 - б) определения активности и экспрессии конвертирующего фермента моноаминоксидазы типа Б (МАО-Б), экспрессии транспортера дофамина (ДАТ) и высокоаффинного захвата МФП+;
 - в) идентификации поврежденных TUNEL+ нейронов и МФТП-индуцированной нейродегенерации в спинном мозге C57BL/6N мышей;
 - г) определения ключевых молекул, участвующих в нейроапоптозе.
3. Экспериментальное *in vivo* моделирование БП у Lewis крыс с использованием митохондриального нейротоксина 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 воспалительных процессов, активации кальпаина и 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 мотонейронов под действием нейротоксинов по следующим показателям:

а) жизнеспособность и морфологическая оценка VSC 4.1 мотонейронов;

б) динамика роста (вк[Ca²⁺]);

в) экспрессия и активация кальпаина и каспазы-3, образование специфических продуктов распада спектрина;

г) цитопротекторный эффект кальпептина – синтетического ингибитора кальпаина.

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 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).

Методы, использованные для достижения поставленных задач

Диссертационная работа выполнена на экспериментальных *in vivo* (линейные C57BL/6N мыши, Lewis крысы) и *in vitro* (дифференцированные VSC 4.1 мотонейроны, SH-SY5Y клетки) моделях с применением паркинсонических нейротоксинов МФТП и ротенона. Также изучены образцы спинного мозга больных БП (postmortem). Таргетно использовались методы ВЭЖХ, спектрофлуориметрии, иммунофлуоресценции, иммуноблотинга, ПЦР, проточной цитометрии.

Результаты

В основе исследований лежит концепция митохондриальной дисфункции и оксидативного стресса, активация кальпаин-опосредованного пути апоптоза нейронов и мотонейронов, что соответствует поставленной цели. Применение современных методов и широкого спектра антител позволило успешно выполнить поставленные задачи, на основе которых сформулированы соответствующие выводы.

Полученные данные убеждают, что нейроны и мотонейроны спинного мозга, подобно дофаминергическим нейронам nigростриатума, уязвимы и подвержены нейродегенерации под действием МФТП. Автору удалось собрать, проанализировать обширный материал и выстроить логическую картину взаимосвязанных и сопряженных процессов, ведущих к нейро-аксональной дегенерации и нейровоспалительного ответа в спинном мозге, и представить доказательство ключевой роли кальпаин-опосредованного пути в указанных процессах. Повышение уровня внутриклеточного уровня кальция (Ca²⁺) как фактор активации кальпаина показан на *in vitro* клеточных моделях.

В работе существенное место отводится изучению нейропротекторной роли синтетических экзогенных ингибиторов кальпаина – кальпептина (*in vivo, in vitro*) и SNJ-1945

(*in vitro*) в спинном и головном мозге. Нейропротекторный эффект кальпептина и SNJ-1945 указывает на то, что кальпаин является таргетной молекулой, что открывает возможность применения ингибиторов кальпаина для предотвращения апоптоза в фенотипически разных популяциях нейронов при БП. Логическим завершением исследований является мониторинг параметров походки (DigiGate) в МФТП-модели и регистрация восстановления параметров длины и частоты шага под действием кальпептина.

При исследовании образцов спинного мозга больных БП (postmortem) установлена нейродегенерация и аксональная дегенерация, о чем свидетельствуют повышенный уровень поврежденных TUNEL+NeuN+ дорсальных нейронов и TUNEL+ChAT+ вентральных мотонейронов в сером веществе, распад нейрофиламентного легкого белка (68 кДа) и повышенный уровень дефосфорилированного белка нейрофиламента (deNFP) в белом веществе, повышенный уровень медиаторов нейровоспалительных процессов в виде астроглиоза (GFAP+), микроглиоза (Iba-1+), инфильтрации Т клеток (CD3+) и экспрессии Cox-2. Обнаружены активные формы кальпаина и каспазы-3 и продукты распада спектрина, уровень которых превышает таковой в норме.

Автором показано, что в культуре дифференцированных VSC 4.1 мотонейронов спинного мозга (*in vitro* модель БП) под действием МФП+ и ротенона запускается митохондриальный кальпаин-опосредованный путь апоптоза. Этот механизм включает рост $[Ca^{2+}]_i$, фрагментацию ДНК, изменение уровня про- и антиапоптотических мембранных белков Bax и Bcl-2 и повышение их соотношения (Bax: Bcl-2), экспрессию активных форм кальпаина и каспазы-3, расщепление спектрина и увеличение уровня продуктов его распада, апоптоз мотонейронов. Ингибирование кальпаина кальпептином оказывает цитопротекторный эффект на VSC 4.1 мотонейроны. В тоже время было установлено, что дифференцированные SH-SY5Y-ДА (дофаминергические) нейроны более чувствительны к действию нейротоксинов, чем SH-SY5Y-ChAT (холинергические) клетки. Последнее обстоятельство указывает на таргетное повреждение именно дофаминергических клеток в спинном мозге при БП. Апоптоз SH-SY5Y-ДА клеток обусловлен оксидативным стрессом, тогда как при апоптозе SH-SY5Y-ChAT клеток преобладает воспалительный стресс. Ингибитор кальпаина SNJ-1945 оказывает цитопротекторный эффект на SH-SY5Y-ДА и SH-SY5Y-ChAT клетки.

Безусловно, автором детально изучено повреждение спинного мозга при БП, однако, БП – является нейродегенеративной патологией прежде всего головного мозга. Основным вопросом к автору остается следующее – почему не были изучены механизмы в головном мозге. Стоит понять насколько спинномозговые изменения носят локализованный характер – то есть насколько они независимы от изменений в головном мозге. Возможны ли параллельные проявления? Какие триггеры задействованы в запуске дегенеративных изменений спинного мозга? С другой стороны, спинномозговые изменения могут быть результатом тех дегенеративных изменений, которые проявляются в головном мозге. Если дегенерация нейронов спинного мозга является биологическим продолжением или последствием изменений в головном мозге, остается вопросительным специфичность таких изменений. И, наконец, если при БП работает механизм “bottom-up”, то есть спинной мозг индуцирует изменения в головном мозге, следует выявить те триггерные молекулы, которые в данном случае приведут к дегенерации нейронов головного мозга.

Приведенные замечания и предложения носят рекомендательный характер и не умаляют значения диссертационной работы.

Таким образом, исходя из вышеуказанного, можно заключить, что по своей актуальности, научно-практическому значению, достоверности полученных результатов диссертационная работа Княрян Вардуи Арутюновны на тему «Механизмы нейродегенерации и нейропротекции в спинном мозге при экспериментальной болезни Паркинсона» представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – «Биохимия», полностью соответствует предъявляемым к докторским диссертациям

требованиям ВАК РА, что позволяет мне ходатайствовать перед ученым советом о присуждении Кнарян Вардуи Арутюновны искомой степени доктора биологических наук.

Официальный оппонент
д.б.н., профессор

Подпись К.Б. Енкояна заверяю:
Ученый секретарь, д.м.н., профессор
24.09.2020



К.Б. Енкоян

Т.Г. Авакян