

## ОТЗЫВ

на диссертационную работу Кнарян Вардуи Арутюновны «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»

Развитие молекулярных биотехнологических инструментов и методов позволяет идентифицировать ключевых игроков сложных сетей молекулярных путей, вовлеченных в этиологию болезни Паркинсона (БП), предполагая, что общие механизмы лежат в основе как семейных, так и спорадических форм. Три доминантные пути, аномалии которых могут запускать нейродегенеративный процесс – (а) накопление агрегированных и неправильно свернутых белков, (б) нарушение пути убиквитинового белка и пути аутофагии, (в) митохондриальная дисфункция – являются решающими факторами развития БП, а окислительный стресс выполняет жизненно важную связь между этими событиями. Цели и задачи рецензируемой диссертации охватывают указанные процессы, что и явилось предпосылкой безусловной актуальности и научной ценности работы Кнарян Вардуи Арутюновны. Применяя митохондриальные токсины на *in vivo* животных и *in vitro* клеточных моделях БП, автор изучила молекулярные механизмы каскадных сигнальных путей митохондриальной дисфункции, ведущей к нейродегенерации nigростриатной и экстранигральная систем, тем самым в значительной степени расширив классические представления о патогенезе БП. Отдельное внимание отводится определению роли кальпаин-опосредованного пути, детекции активных форм кальпаина, а также экспрессии медиаторов нейровоспалительных процессов, как факторов, ведущих к повреждению нейронов спинного мозга. В этом ключе неоспорима научно-практическая значимость работы. Выявление взаимосвязи патологии nigростриатной системы с процессами аксональной дегенерации и нейровоспаления в спинном мозге, осложняющими патофизиологические симптомы, связанные с физиологической активностью спинного мозга, свидетельствуют о практической ценности работы. В работе доказаны кальпаин-опосредованные механизмы дегенерации в головном и в спинном мозге, открывая новые мишени для ингибиторов кальпаина при терапии БП. Определяя уровни кальпаин- и каспаза-3-специфических продуктов распада спектрина и нейрофиламентного легкого белка автор выявляет биомаркеры дегенеративных процессов в спинном мозге и цели дальнейших диагностических и терапевтических разработок.

Рационально используя передовые адекватные экспериментальные и статистические методики диссертант выявляет новые закономерности в механизмах дегенерации нейронов и аксонов спинного мозга в экспериментальных условиях (*in vivo*, *in vitro*, *postmortem*): (1) Доказана узловая роль метаболического превращения МФТП в активный токсин МФП+ (с участием MAO-B, ДАТ и высокоаффинного захвата МФП+) в спинном мозге и стриатуме мышей, что стало научной основой изучения механизмов нейродегенерации в спинном мозге в МФТП-индуцируемой модели БП как в настоящей, так и в дальнейших исследованиях в данной области. (2) Показаны повреждающие эффекты паркинсонического токсина МФТП и

ротенона на мотонейроны и аксоны спинного мозга с установлением ключевой роли  $Ca^{2+}$ -зависимой протеазы кальпаина и активации кальпаин-опосредованного механизма нейродегенерации путем протеолитического разрушения структурных белков (спектрин, нейрофиламентный легкий белок), нейроапоптоза и активации нейровоспалительного ответа. (3) *Postmortem* изучение аутопсийных образцов спинного мозга больных БП выявило преобладание поврежденных TUNEL+ нейронов и мотонейронов с признаками аксональной дегенерации, рост уровня медиаторов воспаления (Cox-2, GFAP, Iba-1, CD3), что наряду с присутствием активного кальпаина, продуктов распада спектрина и дерегуляции кальпастина дали автору основание утверждать о наличии кальпаин-опосредованного пути нейродегенерации в спинном мозге больных БП. (4) На *in vitro* клеточных моделях БП, индуцированных МФП+ и ротеноном, показан митохондриальный кальпаин-опосредованный путь апоптоза. На дифференцированных VSC 4.1 мотонейронах и SH-SY5Y клетках установлены компоненты нейроапоптоза - индуцированный нейротоксинами рост  $Ca^{2+}$ , экспрессия активных субъединиц кальпаина и каспазы-3, повышение уровня продуктов распада спектрина, смещение соотношения мембранных про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2. (5) Установлены пути апоптоза, вызванные действием МФП+ и ротенона, с преобладанием оксидативного стресса в культуре дофаминергических клеток и воспалительного стресса в культуре холинергических клеток. К тому же, активация нейровоспалительного ответа в спинном мозге C57BL/6N мышей (МФТП) и Lewis крыс (ротенон) проявляется в виде астроглиоза, микроглиоза, инфильтрации Т клеток и периферийных макрофагов, экспрессии циклооксигеназы-2, каспазы-1 и индуцибельной NO синтазы. Таким образом, новые фундаментальные достоверные данные позволили автору раскрыть биохимические и молекулярные механизмы нейродегенерации в спинном мозге.

Далее с целью выявления возможных путей нейропротекции в спинном мозге в экспериментальных условиях показано, что (1) кальпаин-опосредованный путь апоптоза и цитопротекторный эффект кальпептина и SNJ-1945 указывают на возможность применения ингибиторов кальпаина для предотвращения апоптоза в фенотипически разных популяциях нейронов (VSC 4.1 мотонейроны и SH-SY5Y клетки); (2) подавление активации медиаторов воспаления в спинном мозге кальпептином подтверждает роль кальпаина в формировании нейровоспалительного ответа в МФТП-индуцированной модели БП и указывает на дополнительную точку приложения ингибиторов кальпаина. Представлены также данные о регуляции показателей шага (параметры длины и частоты) под действием кальпептина.

Необходимо отметить, что теоретические положения многогранных задач диссертации грамотно и логично изложены автором в разделе «Литературный обзор». Особого внимания заслуживают данные о концепции нигральной и экстранигральной патологии, с учетом теории стадийности Браака, существенно изменившие критерии диагностики и терапии БП. Автор отмечает, что клиническими наблюдениями была выявлена причинно-следственная связь между дисфункцией составляющих цепей нейродегенеративных процессов при БП, однако некоторые авторы считают, что вопрос о каудально-ростральной прогрессии синуклеинопатии требует более убедительных доказательств. Теория стадийности продолжает оставаться предметом активных дебатов в научных кругах. В связи с этим, было

бы желательно услышать точку зрения диссертанта, основанную на анализе собственных результатов и приведенных автором интригующих литературных данных, о большей чувствительности к МФТП мотонейронов спинного мозга по сравнению с нигральными дофаминовыми нейронами.

Работа изложена на 209 страницах машинописного текста. Список цитируемой литературы содержит 390 источников. Экспериментальные результаты и их обсуждение, тщательно изложенные в 6 подглавах и проиллюстрированные 44 информативно-насыщенными рисунками и 5 таблицами, являются принципиально новыми и законченными. Выводы адекватны экспериментальным данным и полностью отражают результаты исследований. Содержание автореферата отражает все основные положения диссертационной работы. Материалы диссертационной работы Княрян В.А. многократно представила на международных конференциях и опубликованы в виде 20 статей и 22 тезисов.

Считаю, что диссертационная работа «Механизмы нейродегенерации и нейропротекции в спинном мозге при экспериментальной болезни Паркинсона» по своей актуальности, адекватности методических подходов, новизне и достоверности полученных данных, а также теоретической и практической значимости соответствует высоким требованиям ВАК РА и может быть представлена на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – «Биохимия», а ее автор Княрян Вардуи Арутюновна заслуживает искомой степени.

Официальный оппонент,

Зав лабораторией нейроэндокринных взаимоотношений

Института физиологии им. акад. Л.А.Орбели НАН РА,

доктор биологических наук

Чавушян-Папян В. А.

Подпись Чавушян-Папян В. А. заверяю.

Ученый секретарь

Института физиологии им. акад. Л.А. Орбели НАН РА,

кандидат медицинских наук



Еганова В. С.

22 сентября 2020 г.