

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Карапетян Кристине Ваниковны
«Морфофункциональное исследование паллидонигральной проекции на модели болезни Паркинсона в условиях протекции ядами *Naja oxiana*, *Montivipera raddei* и галармином», представленную на защиту для соискания ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 «Физиология человека и животных»

Болезнь Паркинсона – одна из самых упорных нейродегенеративных патологий, к которым десятилетиями не удается найти новый терапевтический подход. Аналитики надеются, что данные, полученные от таких компаний, как Roche, Biogen и Sanofi, должны, наконец, показать, смогут ли новые классы лекарств остановить развитие паркинсонизма. Десятилетия разработки лекарств от болезни Паркинсона не дали клиницистам, что-то большее, чем леводопа, используемая для контроля моторных нарушений. К сожалению, к препаратам симптоматической терапии у большинства пациентов со временем развивается толерантность, при этом никаких кандидатов, способных остановить или обратить вспять нейродегенерацию, выявить не удалось.

Несколько клинических исследований средней стадии разработки, намеченных на ближайшее время, должны будут показать, какие новые фармакотерапевтические механизмы имеют шанс остановить прогрессирование болезни Паркинсона. Главный среди них базируется на альфа-синуклеиновой гипотезе, основанной на идее, что

- некоторые аутосомно-доминантные мутации в белке альфа-синуклеина запускают развитие одной формы болезни Паркинсона;
- в то время как другие увеличивают экспрессию альфа-синуклеина, что приводит к появлению телец Леви – отличительной черты невропатологии паркинсонизма.

Ко второй половине 2020 года два кандидата расцениваются как самые перспективные, данные которых будут готовы к интерпретации - моноклональное антитело против альфа-синуклеина PRX002 (RO7046015) и ВІІВ054, антитело с тем же механизмом действия.

Кроме этого разрабатывается: -Церебральный нейротрофический фактор дофамина; Агонист мускариновых и сигма-1 рецепторов; Ингибитор глюкозилцерамид-синтазы; и разрабатывается сразу два ингибитора богатой лейцином повторной киназы-2 (LRRK 2), DNL201 и DNL151. LRRK2 – регулятор лизосомальной функции, которая нарушается при болезни Паркинсона таким образом, что повышается образование телец Леви, соответственно, процесс нейродегенерации ускоряется.

Таким образом, представленная диссертационная работа выполнена в рамках актуальной на сегодняшний день проблемы – поиску терапевтических средств для лечения болезни Паркинсона. Распространенность болезни Паркинсона на сегодняшний день составляет 100 – 300 случаев на каждые 100 тысяч населения, а к 2030 году прогнозируется увеличение численности пациентов в два раза, что связывают с увеличением продолжительности жизни населения в большинстве развитых стран. Болезнь Паркинсона - неуклонно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, связанное с поражением преимущественно нигростриарных нейронов и нарушением функции базальных ганглиев, проявляющееся как моторными, так и немоторными симптомами. Моторные симптомы заболевания обусловлены гибелью клеток черной субстанции, области среднего мозга.

Появлению данного заболевания способствуют старение, экологические и генетические факторы, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс. Биохимическим субстратом болезни Паркинсона принято считается прогрессирующая дегенерация дофаминергических нейронов черной субстанции, приводящая к дефициту дофамина. При этом нарушается передача возбуждения от черной субстанции к стриопаллидарной системе. Причина гибели этих клеток плохо изучена, но включает накопление телец Леви в нейронах. В последнее время особое внимание уделяется изучению влияния других нейромедиаторных систем на механизмы патогенеза и формирование различных клинических проявлений данного заболевания. Появляется все больше доказательств о важной роли эксайтотоксичности в развитии и прогрессировании болезни Паркинсона. Этот патологический процесс ведет к повреждению и гибели нервных клеток под воздействием возбуждающих нейромедиаторов, в частности глутамата, способного гиперактивировать специфические постсинаптические рецепторы, и запускать апоптоз клетки.

В самое последнее время было признано серьезным просчетом признание лишь нигральной компоненты, которая, в свою очередь, связана со структурами мозга, имеющими отношение к центральной регуляции программирования движения, в частности, с базальными ганглиями, к которым относится бледный шар. Бледный шар воспринимает и распределяет кортико-стриатную информацию, таким образом осуществляя влияние выхода ядер базальных ганглиев на течение произвольных моторных задач. В дофаминергических клетках черной субстанции продемонстрировано преимущественное представительство паллидонигральной проекции. А наружный и внутренний сегменты бледного шара воспринимают дофаминергические аксонные проекции от компактной части черной субстанции. Дофамин осуществляет ключевой модуляторный эффект на нейроны бледного шара во взаимодействии с прямым ГАМКергическим торможением и глутаматергическим возбуждающим воздействием стриатума и субталамических ядер, что играет большую роль в функциональной организации базальных ганглий, как при нормальных, так и патологических условиях. Ненормальности в дофаминергической системе являются основой болезни Паркинсона.

Ряд факторов, влияющих на риск возникновения болезни Паркинсона, можно считать установленными, остальные – необходимо исследовать в будущем. Кроме того, механизмы действия части из них до сих пор не определены и также требуют дальнейшего изучения. В этой связи актуальной задачей является исследование изменений в структурах, поражаемых при болезни Паркинсона, в частности, черной субстанции и бледном шаре, с целью разработки методов профилактики и лечения данного нейродегенеративного заболевания. На данный момент нет эффективной нейропротекции болезни Паркинсона, поэтому продолжают оставаться крайне актуальными перспективы терапии этого тяжелого неизлечимого заболевания. В нейропротекции основное внимание уделяют антиоксидативным воздействиям, борьбе с эксайтотоксичностью глутамата, использованию трофических факторов, противодействию воспалению, ингибции апоптоза.

Работа Карапетян К.В. посвящена изучению морфофункционального состояния паллидонигральной проекции на ротеноновой модели болезни Паркинсона в условиях протекции ядами среднеазиатской кобры *Naja oxiana*, армянской гадюки *Montivipera raddei* и галармином.

Изучение патофизиологических механизмов заболевания основано преимущественно на большом количестве исследований, проведенных на экспериментальных моделях паркинсонизма. Аналогичные исследования нейрофизиологии базальных ядер на людях существенно ограничены в силу этических принципов. Ротенон является органическим пестицидом, способным вызвать развитие патологии болезни Паркинсона, поэтому выбор данной модели как экспериментальной считается достаточно адекватным. В качестве нейропротекторов при многих патологических состояниях организма выступают животные яды, которые представляют особый интерес в связи с их высокой избирательной специфичностью, что обуславливает длительность действия. В частности, большой интерес в плане нейропротекции представляют змеиные яды, а именно, яды семейства гадюковых *Viperidae* (в частности, армянская гадюка - *Montivipera raddei*) и семейства аспидовых *Elapidae* (среднеазиатская кобра – *Naja oxiana*). Другой потенциальный нейропротектор, действие которого изучалось в диссертационной работе - пролином обогащенный пептид, галармин, иммуномодулятор и протектор широкого действия. Отсюда, соответственно выбранная цель и задачи диссертационной работы.

Диссертация Карапетян К.В. написана в традиционной форме, изложена на 133 страницах текста, иллюстрирована 22 рисунками, содержит 1 схему. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов, заключения и довольно большого списка цитируемой литературы, включающей 250 актуальных публикаций.

Во введении автором чётко обоснованы актуальность изучения проблемы, проведено изучение обширного материала, отражающего основные современные достижения, связанные с проблематикой работы. Автор представил очень подробный анализ научной литературы по исследуемому вопросу. Диссертантом охарактеризовано состояние проблемы поиска терапевтических средств для лечения болезни Паркинсона и терапевтических средств, находящихся в стадии разработки, который нацелены на дофаминергические двигательные симптомы. В обзоре показано, что патология болезни Паркинсона не ограничивается дегенерацией дофаминергических нейронов, но также включает немоторные, такие как когнитивные нарушения, галлюцинации и другие

нарушения, вызванные дисфункцией вегетативной нервной системы, которые также играют важную роль в массиве нарушений, наблюдаемых у пациентов с болезнью Паркинсона. Следовательно, при разработке фармакотерапевтических средств основное внимание следует уделять лечению немоторных симптомов при одновременном снижении паркинсонических двигательных признаков. Диссертантом обращено внимание на противоречивость многочисленных исследований, а также необходимость корректного выбора терапии - проблема эффективного медикаментозного лечения. Таким образом, логична и с критических позиций обоснована целесообразность данного исследования.

Диссертационная работа Карапетян К.В. выполнена на высоком научно-методическом уровне, адекватном для решения поставленной цели и задач.

В электрофизиологических исследованиях под действием указанных протекторов выявлено значительное снижение частоты пре- и постстимульной активности нейронов, а также снижение завышенных возбуждающих постстимульных эффектов, что является результатом подавления эксайтотоксичности и проявления успешной протекции. Для изучения морфофункционального состояния клеточных структур головного мозга крыс был применён гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы, который является хорошо воспроизводимым и наглядным методом, дающим четкую морфологическую картину. В ходе исследования получены новые данные комплексного изучения морфофункционального состояния клеточных структур черной субстанции и бледного шара мозга крыс на ротеноновой модели БП и при применении ядов с целью нейропротекции. Были выявлены положительные изменения в клеточных структурах изучаемых областей мозга под влиянием галармина и сублетальных доз ядов среднеазиатской кобры и армянской гадюки по сравнению с развитием ротенон-индуцированной болезнью Паркинсона без медикации препаратами. Под влиянием использованных веществ в нейронах областей-мишеней не проявлялись те поражения, которые характерны для данной патологии. Морфологическая картина нейронов была получена близкой к норме. Полученные данные дали автору основание полагать, что галармин и малые дозы ядов *Naja oxiana* и *Montivipera raddei* проявляют себя как нейропротекторы. В результате проведенного исследования автором было установлено, что по сравнению с ядом *N.oxiana* и Галармином, яд *M.raddei* проявляет себя более

эффективным нейропротектором, что, возможно, связано со спецификой протеомики яда *M.raddei*, который относится к ядам смешанного типа.

Полученные данные дают основание полагать, что галармин, а также малые дозы змеиных ядов действуют в качестве нейропротекторных агентов, что предусматривает необходимость дальнейших исследований с целью выявления механизмов воздействия терапевтических доз змеиных ядов и галармина и предложения их для терапии болезни Паркинсона изолированно или комбинированно с другими медикаментами. Это определяет практическую сторону диссертационной работы Карапетян К.В.

Полученные данные в области научного исследования, а также анализ данных научной литературы позволил автору прийти к определенным выводам, обоснованным собственными результатами. Публикации автора отражают основное содержание работы. Однако по работе есть некоторые замечания:

Первое: недостатком работы можно считать тот факт, что исследования проводились только с одной дозой по каждому апробированному агенту, так:

«Все инъекции проводили в/м через день после унилатерального введения ротенона в течение 2 недель и выдерживали 4 недели;» однако «инъекции яда *M.raddei* (10% от LD50 =1,6 мг/кг, т.е. 0,16 мг/кг), инъекции яда *N.oxiana* (5% от LD50 =1 мг/кг, т.е. 0,05 мг/кг), инъекции Галармина (10 мкг на 100 г веса животного)» Поэтому возникает резонный вопрос – яд армянской гадюки лучше, как приводится в выводах, или это связано с тем, что его доза была в три раза больше? Также в исследовании отсутствует сравнение с каким-либо стандартным, уже принятым для клиники нейропротектором (препарат сравнения). И в связи с этим, как следствие, вопрос – каков был критерий того, что после инъекции ротенона развилась БП, поскольку в методической части не описан плацебо-контроль (sham control)?

Второе:

Как осуществлялась статистика и где данные о достоверности различий? Если данные получают на многих клетках, то должно быть среднее арифметическое со стандартным отклонением типа $M \pm CO$? В работе проводится сравнение кратности эффектов (например: «на модели БП она превышала норму 6.35-кратно, яд *M.raddei* снижал ее 1.8-кратно, но опять не имелось достижения нормы почти в тех же пределах – 3.55-кратно»). Здесь был бы уместен табличный материал со статистически обработанными данными.

Непринципиальные замечания: - касается не всегда адекватному использованию терминов и понятий, чего надо избегать в дальнейшем при оформлении научных трудов и статей, приведу несколько примеров:

«микроэлектрофизиологических критериев» - приставка микро уместна при описании метода, а критерии – электрофизиологические;

Яды эволюционировали не только в направлении - «парализовать и переварить», но и отпугнуть или привлечь, причинить боль или наоборот унять её и некоторые другие функции;

«Яды – секреция», яды не секреция (процесс), а секрет (субстанция): – это разные вещи;

Слово «парализация» не является адекватным термином по отношению к нервным волокнам, как к несократимым структурам;

«Спазм и релаксация мышц» – слово спазм не заменяет понятие сокращения мышцы;

Когда речь идет о разрушении белковых структур организма под действием яда *in vivo*, то обычно применяется термин протеолиз, а не гидролиз;

Написано: - «Змеиные яды безвредны; если яд попадает в организм человека через рот в жидкой или кристаллической форме и выводится неизменным, то он содержит противосвертывающие протеины» - Безвредных ядов не бывает, как написано в диссертации. Я смотрел эту статью, на которую ссылается автор – там нет такой фразы, но если бы даже она была, это был бы нонсенс, скорее даже оксюморон. Другое дело – яды в малых дозах могут быть нелетальны, не гепато- или нефротоксичны и действовать только адресно на какие-либо структуры или типы рецепторов;

И наконец, замечание по списку литературы – мало какая статья зарубежных авторов имеет цифровой индекс DOI, что очень важно при поиске статей.

Иных замечаний и возражений по диссертационной работе не имею. В заключение, остается рекомендовать автору продолжить исследования по изучению механизмов воздействия изучаемых в данной диссертационной работе терапевтических агентов с учетом вышеприведенных замечаний и пожеланий.

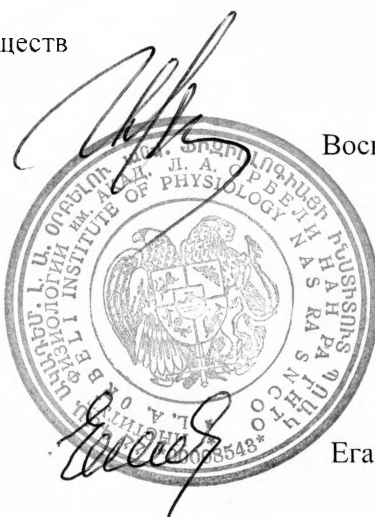
Диссертационная работа Карапетян Кристине Ваниковны «Морфофункциональное исследование паллидонигральной проекции на модели болезни Паркинсона в условиях протекции ядами *Naja oxiana*, *Montivipera raddei* и галармином», по актуальности темы, методическому уровню, большому объему полученных данных, и по нормам оформления, соответствует требованиям ВАК Республики Армения. Думаю, что автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 – «Физиология человека и животных».

Официальный оппонент,

Зав. лабораторией пурификации, сертификации
и стандартизации физиологически активных веществ

Института физиологии им.акад.Л.А.Орбели

НАН РА, канд.биол.наук



Восканян А.В.

Подпись Восканян А.В. заверяю

Ученый секретарь

Института физиологии им.акад.Л.А.Орбели

НАН РА, канд.мед.наук

Еганова В.С.

08.03.2021