

Отзыв

на диссертационную работу
СУКИАСЯН ЛИЛИТ МАГАКОВНЫ

«НЕЙРОНАЛЬНЫЕ И ВАСКУЛЯРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФРУКТОЗО- ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ И ПРОТЕКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ СРЕДСТВАМИ С АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.09 - «Физиология человека и животных»

В последние годы на роль нейропротекторов претендует огромное количество лекарственных средств из различных фармакологических групп. Среди них особое место занимают антихолинэстеразные средства – ферменты класса гидролаз или ингибиторы ацетилхолинэстеразы (ИХЭ), поскольку их применение согласуется с концепцией нейроваскулярной единицы как матрицы функциональной активности центральной нервной системы, суть которой состоит в том, что мозговая перфузия поддерживается на адекватном уровне не только и не столько за счет сосудистого фактора, сколько вследствие поляризационной активности нейрональных сетей, модулируемой холинергической системой. Это означает, что восстановление нарушенных функций можно вызвать не только вазоактивными средствами, но и препаратами, поддерживающими функциональную активность нейронов (например, ИХЭ).

ИХЭ - одна из наиболее перспективных групп лекарственных препаратов в неврологической практике, уменьшающих активность холинэстеразы и приводящих к повышению содержания ацетилхолина в синапсах. Это облегчает проведение возбуждения в периферической нервной системе, в межнейрональных соединениях ЦНС и, в целом, активизирует холинергическую систему организма. Под последней понимают комплекс нейрональных структур, включающий в себя центральные и периферические холинергические нейроны, рецепторный аппарат пре- и постсинаптических мембран, ферменты (АХЭ) и универсальный медиатор – ацетилхолин. Необходимость качественного понимания важности и значимости холинергической системы организма человека

продиктована ее широким распространением, выраженной уязвимостью и главенствующей ролью в компенсаторно-восстановительных процессах при патологии нервной системы.

Ацетилхолин - основной нейромедиатор холинергической системы, относящийся к четвертичным аммонийным основаниям, осуществляющий передачу нервного возбуждения в ЦНС, вегетативных ганглиях, окончаниях парасимпатических и двигательных нервов. Ацетилхолин образуется в терминальной части холинергических нейронов из ацетилкоэнзима А и холина при участии холинацетилтрансферазы. После высвобождения в синаптическую щель ацетилхолин быстро гидролизуется ферментом ацетилхолинэстеразой на холин и ацетат.

Холинергические рецепторы (холинорецепторы) - комплексные белковые структуры, локализованные на постсинаптических мембранах, как в периферической, так и в ЦНС. По типу чувствительности к мускарину и никотину выделяют соответственно М-холинорецепторы (мускариночувствительные) и N-холинорецепторы (никотиночувствительные). Ингибиторы холинэстеразы (ИХЭ) способны усиливать холинергические эффекты как в никотиновых, так и в мускариновых рецепторах.

N-холинорецептор является гетероолигомерным комплексом, состоящим из четырех разных белковых субъединиц, названных соответственно их молекулярной массе (в кДа): α (40), β (50), γ (60), δ (65). В постсинаптические мембраны встраивается функциональный пентамер со стехиометрией $\alpha 2\beta\gamma\delta$. В открытом состоянии рецептор может пропускать ионы Na^+ , K^+ и, в меньшей мере, двухвалентные катионы. Длительное воздействие ацетилхолина или других агонистов рецептора приводит к снижению его чувствительности и к увеличению времени пребывания ионного канала в закрытом состоянии (десенситизация). Этот феномен лежит в основе возникновения холинергических кризов при передозировке ИХЭ.

Пресинаптические М-холинорецепторы локализируются на симпатических сосудосуживающих нервах. Их активация сопровождается снижением выброса норадреналина в ответ на нервные импульсы. Введение эфиров холина приводит к расширению сосудов. Точек приложения у этих веществ несколько: холинорецепторы тормозных синапсов на пресинаптических симпатических окончаниях и холинорецепторы на сосудах, расположенные вне синапсов. Сосудорасширяющее действие ацетилхолина

возможно только при неповрежденном эндотелии. Активация М-холинорецепторов эндотелия приводит к выделению из него NO (эндотелиального фактора расслабления сосудов). Диффундируя от эндотелия к гладким мышцам, NO вызывает расширение сосудов.

В настоящее время установлено, что по мере старения организма происходит угасание активности холинергической системы ЦНС (снижение «холинергического профиля»), приводящее к формированию когнитивных нарушений и всей гаммы проявлений старения. Одной из главных причин данного феномена считается прогрессирующее с возрастом повышение активности холинэстераз.

АХЭ - фермент, катализирующий гидролиз ацетилхолина до холина и остатка уксусной кислоты. Гидролиз ацетилхолина в синаптической щели занимает меньше 1 мс и обуславливает переход клетки-мишени в состояние покоя. Почти все фармакологические эффекты ингибиторов АХЭ обусловлены подавлением активности именно этого фермента и, как следствие, накоплением эндогенного ацетилхолина в холинергических синапсах и окружающих тканях. ИХЭ являются некоторые природные и синтетические соединения: фосфорорганические соединения (ФОС), эфиры N-алкилкарбаминовых кислот (карбаматы), четвертичные аммониевые основания, гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота. ИХЭ относятся к непрямым холиномиметикам, хотя в высоких дозах многие из них способны непосредственно взаимодействовать с холинорецепторами. В терапевтических дозах они, в отличие от холиномиметиков прямого действия, усиливают возбуждение всех типов периферических холинорецепторов, а проходящие гематоэнцефалический барьер, также холинорецепторов ЦНС.

По механизму инактивации фермента антихолинэстеразные средства делятся на три группы: Ингибиторы анионного центра - к ним относятся простые аммониевые четвертичные соли, взаимодействующие с анионным центром (холиновым) и по конкурентному механизму блокирующие доступ ацетилхолина. Ингибирование фермента только по анионному центру быстро обратимо, поэтому время действия таких препаратов короткое. Ингибиторы одновременно анионного и эстеразного центров - к ним относятся относительно сильные ингибиторы АХЭ - карбаматы: физостигмин, галантамин, нейромидин (третичные), прозерин, пиридостигмин, неостигмин (четвертичные). Помимо четвертичного атома азота карбаматы содержат карбамоильную эфирную связь. Эти соединения аналогично ацетилхолину гидролизуются. Продолжительность действия карбаматов 3-4 ч. Ингибиторы эстеразного

центра - включают ФОС - ингибиторы АХЭ фосфакол, армин (а также ФОС - инсектициды и боевые отравляющие вещества), которые образуют ковалентную связь с кислородом гидроксила серина, при этом образуется фосфорилированный фермент. Гидролиз этой связи и высвобождение исходного фермента происходит несколько часов. Поэтому ФОС являются наиболее мощными малообратимыми ингибиторами АХЭ. Третичные амины (физостигмин, галантамин, нейромидин) легче проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что обеспечивает их центральные эффекты. Хорошо всасываются при применении внутрь.

Клиническая феноменология ИХЭ складывается из М-холиномиметического и N-холиномиметического действия: глазное яблоко - сужение зрачков (миоз); сердце - брадикардия и замедление атриовентрикулярной проводимости; центральные эффекты ИХЭ - возбуждение, которое при повышении дозы может смениться угнетением ЦНС вплоть до потери сознания и угнетения дыхания и некоторые другие явления. В неврологической практике ИХЭ широко применяются при невритах, нейропатиях, миастенических синдромах, при органических поражениях ЦНС (в частности, при цереброваскулярной патологии). Ключевой областью клинического применения ИХЭ являются деменции, поскольку ведущим нейрхимическим механизмом их развития (болезнь Альцгеймера, смешанные нейродегенеративно-сосудистые формы) является значительное снижение уровня ацетилхолина в коре и подкорковых структурах вследствие дегенерации холинергических нейронов. Выраженность холинергических нарушений коррелирует со степенью деменции и гибелью нейронов. В связи с этим в настоящее время фармакотерапия ИХЭ считается обоснованным патогенетическим воздействием при БА и сосудистой деменции.

Увеличение концентрации ацетилхолина в мозге способствует росту нейронов и увеличению числа синапсов, т.е. оказывает выраженный нейропластический эффект. Таким образом, холинергическая система играет ключевую роль в структурно-функциональной организации нейрональных ансамблей, поэтому в условиях патологии повреждается в первую очередь, что вызывает развитие феномена функционального разобщения. В связи с этим использование холинергических препаратов, особенно ИХЭ, является одним из важных стратегических направлений в оптимизации комбинированной терапии больных с цереброваскулярной патологией, поскольку в настоящее время не существует лекарственного средства, применение которого в качестве монотерапии могло бы обеспечить все

необходимые при заболеваниях ЦНС эффекты, особенно модуляцию когнитивных и поведенческих нарушений.

Не буду подробно останавливаться на проделанной работе, поскольку её содержание отражено как в диссертационной работе, так и в автореферате. Специально отмечу, что как диссертант, так и руководитель работы оказались на высоте, выбрав исследование всех тех показателей, которые достаточно полно характеризуют все те изменения, которые характерны вышеперечисленным эффектам, вызываемым ингибиторами АХЭ, а именно: определение активности АХЭ в плазме крови, в энторинальной коре и *nucleus basalis magnocellularis* крыс в норме и под воздействием галантамина и фитосбора «Диабефит»; определение активности малондиальдегида, супероксиддисмутазы, монооксида азота, эндотелина-1 в плазме крови у крыс при фруктозой индуцированном нарушении метаболизма и в условиях терапии фитосбором «Диабефит». Были изучены также эффекты фитосбора «Диабефит» на некоторые показатели крови, сердечно-сосудистой и дыхательной систем (уровень глюкозы, артериальное давление, частота сердечных сокращений, частота дыхательного ритма) в условиях длительного потребления высокой концентрацией фруктозы у крыс; проведена оценка состояния микроциркуляторного русла коры мозга в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции «Диабефитом», галантамином и диабетомом; проведено *in vivo* экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов медиальной префронтальной коры (mPFC) при высокочастотной стимуляции NBM, в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции «Диабефитом», галантамином и диабетомом, а также *in vivo* экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов латеральной энторинальной коры при ВЧС NBM, в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции фитосбором «Диабефит» и галантамином. Весь комплекс исследований соответствует тому объему исследований, которые были необходимы для выявления действия профицита АХ при ингибировании АХЭ.

По работе имеются некоторые замечания. Было бы лучше не так подробно сосредотачиваться на патологических изменениях вызываемых фруктозой (это, по сути, модель), а на интимных механизмах протекторного действия применяемых препаратов и, самое главное, провести необходимые исследования по содержанию биоактивных веществ в применяемых сборах с применением методов газ-хроматографии и масс-спектрального

анализа. В массе своей GC-MS и HPLC анализ считается обязательным для всех работ, связанных с исследованием растительного сырья. Это позволило бы работе быть не только описательной, но и выявить кардинальный компонент терапевтического воздействия. Множество активных веществ несомненно работают в ансамбле, однако использование отдельных компонент в качестве положительного контроля способствовало бы пониманию их действия и оптимизация рецептуры растительного сбора. А также имеется замечание относительно различных путей введения одного и того же препарата, что затрудняет понимание действия тех или иных доз.

В заключение хочу подчеркнуть, что проделана большеобъемная и интересная работа, а личные дискуссии с автором дали возможность высоко оценить научно-организационную подготовленность автора, как специалиста в области физиологии и считаю, что работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор несомненно достоин присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - «Физиология человека и животных».

Зав. лаб. пурификации, сертификации и стандартизации физиологически активных веществ Института физиологии им. Л.Орбели НАН РА, к.б.н.,

А. В. Восканян

Подпись А.В.Восканяна заверяю, ученый секретарь Института физиологии им. Л.Орбели НАН РА, к.б.н.,



К.А.Небогова

20. 03. 2023 г.