

ВІДГУК

на дисертацію Білої Юлії Володимирівни «Фармакологічна модуляція HSP70-опосередкованих механізмів нейропротекції в умовах церебральної ішемії», подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми дисертації

У світі інсульт посідає друге місце серед усіх причин смерті та інвалідності. Згідно з прогнозами, до 2030 року захворюваність на інсульт зросте на 25%, що зумовлено «старінням» населення планети та зростанням поширеності в популяції таких факторів ризику мозкових інсультів як артеріальна гіпертензія, хвороби серця, цукровий діабет, гіподинамія, ожиріння, паління та інші. Україна займає одне з перших місць в Європі за показниками цереброваскулярної захворюваності та смертності від інсульту. Кожен наступний інсульт погіршує якість життя і ускладнює перебіг наявних в анамнезі супутніх захворювань.

Результатом ішемічного пошкодження є оксидативний стрес, який провокує накопичення активних форм кисню, зниження активності антиоксидантних систем, розвиток енергодефіциту і гибель клітин головного мозку, як наслідок, виникають стійкі когнітивно-мнестичні порушення з боку ЦНС. Незважаючи на певні успіхи, що були досягнуті в лікуванні мозкових інсультів, і великий арсенал засобів (тромболітики, антикоагулянти, первинні та вторинні нейропротектори, ноотропи та ін.), препарати не завжди надають очікуваний нейропротективний ефект у гострому періоді церебральній ішемії. Тому на сьогодні найбільш перспективним напрямком лікування ГПМК є стратегія ендогенної нейропротекції, яка призводить до підвищення стійкості нервових клітин до пошкодження різноманітної етіології за рахунок активації власних адаптаційних механізмів.

Серед молекулярних факторів ендогенної нейропротекції особливий інтерес викликають білки теплового шоку з молекулярною масою 70 кілоДальтон. Отримані багаточисельні докази цито- і нейропротективної дії HSP₇₀. Існують дані про регулюючу дію HSP₇₀ на явище мітохондріальної дисфункції, що розвивається при ішемічному пошкодженні головного мозку внаслідок біохімічних змін в мозковій тканині. Окрім цього, HSP₇₀ приймають участь в підтримці роботи антиоксидантної тіол-дисульфідної системи і підвищують стійкість нейронів в умовах гіпоксії.

Таким чином, розробка нових підходів до нейропротекції шляхом пошуку засобів – позитивних модуляторів HSP₇₀ є важливим завданням сучасної фармакології. Отже, обрана Білою Юлією Володимирівною тема конкретного дисертаційного дослідження без сумнівів є високоактуальною і важливою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP70/HIF-1α-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020). Дисертант є співвиконавцем зазначеної науково-дослідної роботи.

Ступінь обґрунтованості положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність

Дослідження впливу тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 на молекулярні HSP 70 – опосередковані механізми формування ланок нейродеструкції та ендогенної нейропротекції в умовах церебральної ішемії

було проведено у декілька етапів. На першому етапі було відтворено модель «глутаматної ексайтотоксичності» шляхом внесення токсичних доз глутамату (100 мкМоль) в нейрональну суспензію і досліджено нейропротективну дію досліджуваних препаратів в умовах *in vitro*. Другим етапом було вивчення взаємозв'язку між рівнем білку HSP₇₀, розвитком нитрозативного стресу і ступенем неврологічного дефіциту у експериментальних тварин з ГПМК. На третьому етапі на моделі гострого порушення мозкового кровообігу було встановлено середньоефективну дозу фактору теплового шоку-1 (HSF-1). На четвертому етапі на моделі гострого порушення мозкового кровообігу було досліджено вплив тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 на основні ланки ендогенної нейропротекції, розвиток оксидативного і нитрозативного стресів, стан тіол-дисульфідної системи, рівень енергодефіциту. На п'ятому етапі було досліджено вплив тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 на рівень неврологічного дефіциту та летальність тварин з експериментальною гострою церебральною ішемією.

Результати проведених досліджень є обґрунтуванням використання тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 в терапії гострого порушення мозкового кровообігу шляхом встановлення їх впливу на молекулярні HSP 70 – опосередковані механізми формування ланок нейродеструкції та ендогенної нейропротекції в умовах церебральної ішемії.

У роботі дисертантом було проаналізовано та зреферовано 245 літературних джерел, з них 124 – кирилицею, 121 – латиницею. Достатня кількість використаних, головним чином, сучасних наукових джерел, глибина їх аналізу та вміле їх використання при написанні дисертації свідчать про хорошу орієнтованість автора у проблемах, вирішенню яких присвячена робота.

У дослідженні було використано достатню мінімально припустиму кількість лабораторних тварин відповідно до застосовуваних методів статистичної обробки отриманих результатів (40 білих нелінійних мишей та 250 щурів лінії Вістар).

Переконливі результати з адекватним використанням методів статистичної обробки зумовили високу статистичну значущість результатів дослідження, на основі яких дисертант обґрунтував положення, висновки та практичні рекомендації.

Методи, які було використано для проведення дослідження, є сучасними, загальноприйнятими у рамках поставлених завдань, у достатній мірі відображають високий рівень досліджень.

Все це однозначно свідчить, що висунуті дисертантом наукові положення і висновки досить обґрунтовані, достовірні, впливають з проаналізованого фактичного матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертаційна робота Білої Ю.В. являє собою дослідження, в якому вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено застосування тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 в терапії гострого порушення мозкового кровообігу шляхом встановлення їх впливу на молекулярні HSP 70 – опосередковані механізми формування ланок нейродеструкції та ендогенної нейропротекції в умовах церебральної ішемії.

У дослідженні вперше встановлено, що нейропротективна дія тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну спрямована на підвищення в ішемізованому головному мозку концентрації ендогенного нейропротектора – білку теплового шоку 70 кДа (HSP70), який призводить до підсилення компенсаторно-приспосувальних механізмів стійкості нейронів до ішемії.

Вперше встановлено, що введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну в дослідях *in vitro* підвищує концентрацію HSP70, а в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку підвищує експресію мРНК HSP70, Hif-1 α і Hif-3 α і концентрацію білку HSP70.

Встановлено, що курсове введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну нормалізує енергетичний метаболізм ішемізованого головного мозку за рахунок позитивної модуляції HSP70/HIF-1 α -залежних механізмів

активації і регуляції малат-аспартатного човникового механізму.

Встановлено, що тамоксифен, мелатонін, HSF-1 і глутамін обмежують деструктивний вплив оксидативного і нітрозативного стресу в ішемізованому головному мозку за рахунок HSP70/GSH – залежних механізмів активації антиоксидантної системи.

Вперше встановлено, що курсове введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну підвищує щільність нейронів сенсомоторної зони кори, гальмує нейроапоптоз, підвищує вміст РНК в нейронах сенсомоторної зони кори і, як наслідок, зменшує прояви неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель №128150 «Спосіб фармакологічної модуляції ендогенної нейропротекції в експерименті».

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів

На підставі проведених досліджень експериментально обґрунтована фармакологічна модуляція експресії HSP₇₀ як перспективний напрямок нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням для застосування тамоксифену, мелатоніну і глутаміну в комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів первинної (спрямованої на зменшення глутаматної ексайтотоксичності) і вторинної (спрямованої на зниження нейроапоптозу, нормалізацію енергетичного метаболізму) нейропротекції.

Експериментальні дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень HSF-1 з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією.

Експериментально встановлені механізми дії модюляторів HSP70 можуть сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, які надають спрямований вплив на ключові ланки-мішені

механізмів ендогенної нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Результати досліджень впроваджені в навчальну та наукову роботу кафедр фармакології Запорізького державного медичного університету, Державного закладу "Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України", Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, Буковинського державного медичного університету, Харківського національного медичного університету, Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Говорячи про повноту викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих наукових працях, необхідно відзначити, що автором за результатами досліджень опубліковано 17 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових журналах, 3 з яких реферуються міжнародними науково-метричними базами даних PИHЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, Ulrich's Periodical Directory, 10 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України. Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що наукові положення, висновки та практичні рекомендації, які представлено у дисертації, відображено в опублікованих працях.

Рекомендації щодо використання результатів та висновків

Дані досліджень, отримані у рамках виконання дисертаційної роботи Білої Ю.В., можуть бути використані у науковій, навчальній та лікувальній роботах науково-дослідних установ і медичних ЗВО та інших медичних закладах.

Обсяг і структура дисертації

Оцінюючи зміст дисертації, слід зазначити, що робота написана науково-літературною мовою, виклад основних результатів дослідження

компактний та конкретний. Робота побудована у традиційному стилі та складається з анотацій, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», трьох розділів результатів власних досліджень, розділу «Аналіз та узагальнення результатів», висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 22 таблицями, 13 рисунками, які логічно доповнюють основний зміст дисертації.

Анотація до дисертації оформлена українською та англійською мовами, відповідає за змістом дисертації та автореферату.

У вступі дисертантом стисло наведено інформацію щодо вибору теми дослідження, засвідчено зв'язок роботи з науково-дослідною роботою кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету, сформульовано мету і 6 підпорядкованих їй завдань дослідження, об'єкт та предмет дослідження, наведено узагальнену інформацію щодо методів дослідження. У вступі дисертантом відображено відомості про наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, дані про особистий внесок, апробацію результатів дисертації, кількість публікацій за темою дисертації, а також про обсяг та структуру дисертації.

Огляд літератури докладний і структурований, має 3 підрозділи. У першому підрозділі дисертант наводить дані щодо основних клітинно-молекулярно-біохімічних механізмів постішемичної нейродеструкції. У цьому підрозділі автором висвітлено сучасні відомості щодо причин і механізмів розвитку пошкодження тканин головного мозку в умовах гострого порушення мозкового кровообігу. Другий підрозділ присвячено висвітленню сучасної стратегії нейропротекції ішемічного інсульту. У підрозділі наведено основні напрямки патогенетичної терапії ішемічного інсульту, описані механізми дії препаратів основних груп нейропротекторів із зазначенням рівня доказовості ефективності їх клінічного застосування. Третій підрозділ присвячений ролі білків теплового шоку HSP₇₀ в механізмах ендогенної нейропротекції. У підрозділі описані основні функції HSP₇₀, як інтермедіату ендогенної нейропротекції і наведене описання перспективних модуляторів

HSP₇₀. В огляді дисертантом підкреслено наявність обмеженої кількості літературних даних і доклінічних досліджень впливу тамоксифену, мелатоніну і глутаміну на експресію білку теплового шоку HSP₇₀, а механізми нейропротективної дії HSF-1 в умовах церебральної ішемії дотепер не вивчались.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» наведено характеристику лабораторних тварин, опис умов їх утримання, розподіл тварин по групах відповідно до експериментального дослідження, зазначено дані щодо досліджуваних препаратів, сполук, реактивів та приладів, які було використано у дослідженні. Розділ містить характеристику застосовуваних патофізіологічних методів дослідження, а саме: опис відтвореної експериментальної моделі гострої церебральної ішемії у щурів, моделі «глутаматної ексайтотоксичності» в суспензії нейронів; фармакологічних, біохімічних, морфометричних, імуноферментних, молекулярно-генетичних, методів математичної статистики і системного аналізу. Всі використані методи дослідження є сучасними, загальноприйнятими, відповідають меті та завданням дослідження.

У розділі 3 дисертантом досліджений взаємозв'язок між ступенем неврологічного дефіциту і рівнем HSP₇₀ в корі і гіпокампі тварин з ГПМК. Встановлено, що зона гіпокампу є більш чутливою до ішемічного пошкодження, про що свідчить стрімке підвищення концентрації нітротирозину і зменшення рівня HSP₇₀ в групах з середнім і тяжким ступенем неврологічних порушень. Юлією Володимирівною був встановлений тісний взаємозв'язок між депресією тіол-дисульфідної системи (глутатіон відновлений), рівнем експресії HSP₇₀ і формуванням неврологічного дефіциту на 4 добу гострої церебральної ішемії в корі і гіпокампі головного мозку тварин з ГПМК. Також встановлений тісний взаємозв'язок між виразністю нітрозативного стресу (нітротирозин), рівнем HSP₇₀ і формуванням неврологічного дефіциту на 4 добу гострої церебральної ішемії в корі і гіпокампі головного мозку. Таким чином,

встановлено, що білки теплового шоку HSP₇₀ є невід'ємними учасниками механізмів ендогенної нейропротекції, оскільки на тлі їх дефіциту спостерігається інтенсифікація процесів нейродеструкції і розвиток незворотних неврологічних порушень

У розділі 4 дисертантом представлені результати дослідження впливу модуляторів експресії HSP70 на процеси нейродеструкції в умовах *in vitro* на моделі глутаматної ексайтотоксичності, відтвореною шляхом додавання до нейрональної суспензії нейротоксичних доз глутамату (100 мкМоль). Показано, що досліджувані препарати за даних умов підвищують концентрацію білку HSP70 і зменшують прояви оксидативного і нітрозативного стресів, про що свідчить зниження рівнів маркерів білкового пошкодження – АФК і КФГ, а також зменшення концентрації маркеру нітрозативного стресу – ніротирозину. В умовах глутаматної ексайтотоксичності досліджувані препарати підтримують активність антиоксидантних систем, про що свідчить підвищення активності супероксиддисмутази, глутатіонредуктази і глутатіонтрансферази, а також збільшення концентрації глутатіону відновленого. Дисертанткою встановлений тісний взаємозв'язок між змінами рівнів HSP70 і глутатіону відновленого. У ході порівняльного аналізу, встановлений лідер по силі нейропротективної дії – фактор теплового шоку HSF-1, який перевищував інші препарати за здатністю підвищувати рівень HSP₇₀, рівень глутатіону відновленого, активність глутатіонредуктази і глутатіонтрансферази.

У розділі 5 дисертантом наведено результати нейропротективної дії модуляторів експресії HSP₇₀ *in vivo* на моделі гострого порушення мозкового кровообігу по типу ішемічного інсульту, відтвореного шляхом двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій у щурів. Встановлено, що досліджувані препарати достовірно на 4 добу експерименту достовірно підвищують рівень білку HSP₇₀ в цитозольній фракції гомогенату мозку в 1,5-11,3 рази і в мітохондріальній фракції в 1,1-2,6 рази. Шляхом ПЛР аналізу продемонстрована здатність препаратів підвищувати експресію мРНК Hsp₇₀,

мРНК Hif-1 α і мРНК Hif-3 α , що підтверджує активацію механізмів ендогенної нейропротекції в умовах ГПМК. Наслідком модуляції системи HSP₇₀ є гальмування розвитку оксидативного і нітрозативного стресу. Так, тамоксифен, мелатонін, глутамін і HSF-1 знижували рівень АФГ (22,5%-32,5%), КФГ (28,7%-35,3%) і нітротирозину (60%-69,9%) на фоні достовірного підвищення активності супероксиддисмутази (на 41,8%-84,7%). Курсове призначення модуляторів HSP₇₀ врівноважувало роботу тіол-дисульфідної системи, про що свідчить збільшення рівню глутатіону відновленого в 3,2-4,1 рази, активності глутатіонредуктази в 2,3-3,4 рази, глутатіонтрансферази в 1,3-1,6 рази, на тлі зниження глутатіону окисленого в 1,6-2,3 рази. Підтвердженням активації HSP₇₀/Hif-1-залежних ланок нейропротекції є встановлене дисертантом відновлення енергетичного метаболізму. Так, досліджувані препарати підвищують рівень АТФ (на 50,4%-101,8%), малату (на 50%-133,3%;), активність НАД-МДГ мх (в 1,7-2,7 рази), знижують рівень лактату (на 27,1%-50,2%), зменшують швидкість відкриття мітохондріальної пори (в 1,5-2,5 рази) і підвищують заряд мембрани (в 1,9-3,5 рази). Курсове призначення модуляторів HSP₇₀ призводить до збільшення щільності (на 22,5%-63,9%) і площі тіл нейронів (на 5,6%-32,8%), підвищення вмісту РНК в нейронах (на 34,3%-91,7%), зменшення щільності апоптично змінених нейронів (в 1,6-2,7 рази). Дисертантом встановлено, що на фоні призначення HSF-1, мелатоніну, тамоксифену, глутаміну на 4 добу експерименту знижувалась летальність тварин на 50,8, 46,4, 41,2 і 32,5%, а також зменшувались прояви неврологічних порушень на 16,2-41,4%.

У розділі 6 дисертантом проаналізовані отримані результати дисертант досить кваліфіковано інтерпретує та узагальнює отримані результати, надаючи обґрунтування для застосування тамоксифену, мелатоніну і глутаміну в комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів первинної (спрямованої на зменшення глутаматної ексайтотоксичності) і вторинної (спрямованої на зниження нейроапоптозу,

нормалізацію енергетичного метаболізму) нейропротекції. Дисертант відзначає доцільність подальших досліджень HSF-1 з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією. Окрім того, експериментально встановлені механізми дії модуляторів HSP70 можуть сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, які надають спрямований вплив на ключові ланки-мішені механізмів ендогенної нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Висновки дисертації логічно пов'язані з результатами дослідження і повністю відповідають меті та завданням дослідження.

Список використаних джерел наведено в алфавітному порядку цитування, бібліографічні посилання оформлено у відповідності до діючих загальних положень та правил складання.

У додатках дисертантом наведено перелік публікацій за темою дисертаційного дослідження із зазначенням особистого внеску, перелік науково-практичних конференцій, на яких було оприлюднено основні матеріали та положення дисертаційної роботи, а також надано акти впровадження отриманих даних у науковий, педагогічний та виробничий процеси.

Автореферат відповідає за змістом матеріалу дисертації, лаконічно та інформативно відображає результати досліджень, оформлений згідно діючих вимог ДАК МОН України.

Зауваження

1. Не проведено розрахунок виживання тварин за методом Каплана-Мейєра з розрахунком кумулятивного критерію виживання всередині групи.
2. Для більш об'єктивної оцінки впливу HSP₇₀ на ланки ендогенної нейропротекції було б більш доцільно в досліджах *in vitro* використовувати інгібітори експресії HSP₇₀.

3. В огляді літератури дисертант недостатньо уваги приділив білкам теплового шоку з молекулярною масою 27, 60 і 90 кДА.

Ці зауваження і побажання не є принциповими, не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи та загальну позитивну оцінку дисертації, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

У рамках дискусії хотілося б отримати відповіді на такі питання:

1. Виходячи з відкритих Вами особливостей фармакодинаміки модуляторів HSP₇₀, до якої групи нейропротекторів їх можна віднести? На якому етапі комплексної терапії ГПМК їх можна використовувати?
2. Вами отримані данні про участь HSP₇₀ в регуляції деяких ланок ендогенної нейропротекції. Яке загальнобіологічне значення ендогенної цито- і нейропротекції? Які ще можна відзначити ланки-мішені фармакологічної регуляції цього захисного механізму?
3. Вами і іншими дослідниками відзначений антиапоптичний ефект HSP₇₀. Які гіпотетичні механізми антиапоптичної дії модуляторів HSP₇₀ ви можете припустити?

Висновок

Дисертація Білої Юлії Володимирівни «Фармакологічна модуляція HSP70-опосередкованих механізмів нейропротекції в умовах церебральної ішемії», є самостійною, завершеною науковою працею автора, в якій сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання. За актуальністю, об'ємом проведеного дослідження, теоретичним і практичним значенням, науковою новизною одержаних результатів дисертація відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого

постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (у редакції від 06.09.2016 р.), а Біла Юлія Володимирівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент

Професор кафедри загальної та клінічної фармації,
Державного закладу
«Дніпропетровська медична академія
Міністерства охорони здоров'я України»
доктор медичних наук, доцент



О.О. Нефьодов

