

Відгук

на дисертацію Литвиненко Олени Семенівни

«Нейропротективна активність модуляторів системи глутатіону в умовах моделювання церебральної ішемії», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми:

Поширеність ішемічного інсульту, високий відсоток інвалідизації та смертності пацієнтів після порушення мозкового кровообігу зумовлюють високу медико-соціальну значимість проблеми і необхідність подальшого вивчення патогенезу і пошуку нових підходів до діагностики та лікування цього захворювання. Ефективність медичної реабілітації пацієнтів після ішемічного інсульту залежить від правильної організації терапевтичного процесу, основними принципами якого є максимально швидкий початок терапії, спрямованої на відновлення кровообігу в ураженій ділянці головного мозку і захист його від гіпоксії та ішемії. Лікування хворих після ГПМК передбачає застосування цілого комплексу різних медичних методів, в тому числі медикаментозної терапії, на всіх етапах реабілітаційного процесу, починаючи з гострого періоду захворювання, коли багато в чому визначається реабілітаційний потенціал пацієнта. Оскільки процес відновлення після інсульту є багатокомпонентним, медикаментозна терапія складається з базисної, реперфузійної і нейропротекції а також вторинної профілактики і лікування постінсультних станів, поряд з нейрореабілітаційними заходами. Нейропротекторна терапія є одним з найбільш привабливих і перспективних напрямків в лікуванні хворих з ГПМК, основним завданням якої є підвищення стійкості церебральних нейронів до гострої ішемії. Безперечна важливість даного стратегічного напрямку пов'язана з тим, що формування більшої частини церебрального інфаркту закінчується через 3-6 годин від початку гострого порушення мозкового кровообігу. У зоні ішемії спостерігаються первинний оксидантний стрес і посилення процесів перекисного окислення ліпідів, відзначається порушення енергоутворюючих процесів при неповному надходженні кисню в нейрони головного мозку, що призводить до утворення вільних радикалів і ексайтотоксичного ефекту. Все вищевикладене підкреслює особливу актуальність подальшого дослідження молекулярно-біохімічних аспектів церебральної ішемії, а також активний пошук нових лікарських препаратів з

нейропротекторною дією для комплексного лікування наслідків гострого порушення мозкового кровообігу.

Тому дослідження нейропротективних властивостей селенази, глутоксима та глутаредоксіна для лікування церебральної ішемії проведені Оленою Семенівною, вважаю надактуальним.

Мета дисертаційної роботи полягає в дослідженні молекулярно-біохімічних механізмів впливу глутоксиму, селенази і глутаредоксіну на АФК/GSH-залежні ланки ішемічної нейродеструкції/ендогенної нейропротекції та обґрунтуванні їх застосування як нейропротективних засобів на основі експериментально встановлених механізмів впливу на біохімічні та функціональні порушення головного мозку в якості ефективного засобу із зазначеною дією в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

- Визначити середньоефективну дозу селенази, глутоксима і глутаредоксіна на моделі церебральної ішемії.
- Вивчити вплив селенази, глутоксима і глутаредоксіна в експериментально обґрунтованих дозах на летальність і неврологічний дефіцит у гострому періоді модельованого ПМК.
- Дослідити дію селенази, глутоксима, глутаредоксіна на рівень маркерів оксидативного і нітрозативного стресу (супероксиддисмутази, каталази, АФГ, КФГ, стабільних метаболітів оксиду азоту, нітротирозину) і активність показників тіол-дисульфідній системи (глутатіону відновленого, глутатіону окисненого, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази) при експериментальному ГПМК.
- Вивчити дію селенази, глутоксима і глутаредоксіна на функціональну активність мітохондрій (ступінь відкриття мітохондріальної пори і мембранний потенціал), енергетичний обмін (АТФ, АДФ, АМФ, ЕЗ, ЕП, ІФ, ТКД, лактат, піруват, малат) головного мозку тварин з ГПМК.
- Визначити роль селенази, глутоксима і глутаредоксіна в механізмах ендогенної нейропротекції за впливом на синтез HSP₇₀, експресію мРНК HSP₇₀, мРНК HIF-1 α і HIF-3 α в тканинах головного мозку експериментальних тварин.
- Дослідити нейропротективну дію селенази, глутоксима і глутаредоксіна *in vitro* при додаванні токсичних доз глутамату, CDNB, DNIC по впливу на показники NR-2 пептиду, АФГ, КФГ, СОД, глутатіону відновленого.

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

Дисертаційна робота Литвиненко Олени Семенівни 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-1 α -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

Ступень обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків

Проведений аналіз літературних джерел обґрунтовує перспективність вивчення нейропротективної активності селенази і глутоксиму в умовах ГПМК, а також експериментальне обґрунтування подальшого вивчення глутаредоксину-1 з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією.

При виконанні дисертаційного дослідження дисертантка використала сучасні методи дослідження, а саме біохімічні, імуноферментні, молекулярно-генетичні, фармакологічні, методи математичної статистики та системного аналізу. Дисертаційна робота Олени Семенівни виконана на сучасному технологічному та аналітичному обладнанні з використанням уніфікованих методів дослідження.

Висновки, які наведені в 3, 4 розділі та загальні висновки ґрунтуються на результатах експериментальних досліджень. Наукова новизна та практична значущість, що сформульовані в дисертації, базуються на фактичному експериментальному матеріалі.

Результати отримані пошукачем, в ході експериментальних досліджень обговорювалися на вітчизняних наукових конференціях та з'їздах.

Наукова новизна отриманих результатів

В результаті проведених досліджень Оленою Семенівною було встановлено, що нейропротективна активність селенази, глутоксиму і глутаредоксину в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку спрямована на активацію глутатіон - залежних ланок ендогенної нейропротекції.

Дисертанткою встановлено, що досліджувані модулятори системи глутатіону - селеназа, глутоксим і глутаредоксін підвищують експресію мРНК HSP₇₀, HIF-1 α і HIF-3 α та підвищують вміст ендогенного

нейропротектора – білка теплового шоку HSP₇₀. в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку.

Розширено дані про вплив глутаредоксіна і глутоксима на енергетичний обмін і функціональну активність мітохондрій головного мозку в умовах ішемії.

Встановлено, що селеназа, глутоксим і глутаредоксін гальмують реакції оксидативного та нітрозуючого стресу на тлі нормалізації глутатіонової системи в головному мозку експериментальних тварин.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 126977 «Спосіб зменшення ексайтотоксичності в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровообігу».

Практичне значення одержаних результатів

Практична значущість визначається тим, що розроблено спосіб підвищення ефективності лікування церебральної ішемії селеназою, глутоксимом та глутаредоксіном, в якості засобів первинної нейропротекції.

Результати досліджень впроваджені в навчальну та наукову роботу кафедр фармакології Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської медичної академії, Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, Буковинського державного медичного університету, Харківського національного медичного університету, Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, Національного фармацевтичного університету МОЗ України.

Повнота викладення матеріалів дисертації

Результати дисертаційної роботи достатньо висвітлені у наукових публікаціях. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових робіт, у тому числі 7 статей у фахових журналах України, 3 з яких реферуються міжнародними наукометричними базами даних PИHЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, Ulrich's Periodical Directory, 9 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України.

В наукових виданнях повно представлені основні положення дисертаційної роботи.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертаційної роботи та відображає обсяг, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

Рекомендації щодо використання отриманих результатів

Результати досліджень отриманих у рамках виконання дисертаційної роботи можуть бути використані в науковій, навчальній та лікувальній роботі науково-дослідних установ, медичних вищих навчальних закладів і лікарень.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація викладена на 220 сторінках друкованого тексту та складається з анотацій, списку друкованих праць, основної частини, яка включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, 2 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 26 рисунками, 20 таблицями. Список використаних джерел містить 305 найменувань, з них – 135 кирилицею та 170 латиницею.

У вступі дисертанткою доведена актуальність дослідження, вказано зв'язок з науковими програмами та темами, мета та задачі дослідження, дана характеристика об'єкта, предмета, методів дослідження, показано особистий внесок здобувача та результати апробації.

У першому розділі «Огляд літератури» дисертанткою узагальнені та проаналізовані сучасні дані наукової літератури щодо рівня захворюваності церебральним інсультом та наслідки гострого порушення мозкового кровообігу. Оленою Семенівною викладена сучасна стратегія лікування церебральних інсультів, а також обґрунтовано перспективу застосування модуляторів системи глутатіону після перенесеної церебральної катастрофи в якості нейропротекторних засобів.

У другому розділі «Матеріали та методи дослідження» дисертанткою обґрунтовано загальну методологію, запропоновано план, описано характеристики об'єктів та методів дослідження, наведено характеристику матеріалів та обладнання, які використовувалися в ході виконання експериментальної частини дисертаційної роботи.

Третій розділ «Нейропротективні властивості селенази, глутоксима і глутаредоксіна при моделюванні нейродеструкції в дослідах *in vitro*», присвячений аналізу дії модуляторів системи глутатіону *in vitro* при додаванні нейротоксичних доз глутамату, 1-хлор-2,4 дінитробензолу, а також дінитрозольного комплексу заліза з цистеїном. Пошукачем встановлено, що всі досліджувані препарати мають виражену нейропротективну дію після моделювання *in vitro* глутаматної ексайтотоксичності, нітрозативного стресу і депривації системного рівня глутатіону, яка спрямована на зниження оксидативної нейродеструкції і підвищення ендогенної нейропротекції. Дисертанткою з'ясовано, що попереднє внесення в суспензію нейронів селенази, глутоксима і глутаредоксіна (10^{-5} М) з подальшим моделюванням нейродеструкції *in vitro* призводило до зниження маркерів ушкодження нейронів – NR2 пептиду на 18–68,5%); АФГ сп. на 8,7 – 43,6%; КФГ сп. на 6,7 – 41,5% і підвищення СОД на 7,6 – 59%; глутатіону відновленого на 7,9 – 154%. В ході дослідження Оленою Семенівною встановлено прямий зв'язок

між зростанням внутрішньоклітинного рівня HSP70 і розвитком антиоксидантної відповіді в умовах нейродеструкції *in vitro*. У ході порівняльного аналізу був визначений лідер по силі нейропротективної дії – глутаредоксін, який проявив себе як найбільш ефективний з ряду досліджуваних препаратів за такими показниками як відновлений глутатіон, глутатіонредуктаза, нітротирозин, HSP70, NR-2 пептид і перевершував значення референс-препаратів мексидола і тіотриазоліну за перерахованими вище та АФГ, КФГ і глутатіонпероксидаза.

Четвертий розділ «Нейропротективна дія модуляторів системи глутатіону в умовах перев'язки загальної сонної артерії» присвячений дії селенази, глутоксиму та глутаредоксіну дослідженням *in vivo*. Дисертанткою встановлено, що курсове застосування селенази, глутоксиму та глутаредоксіну в експериментально обґрунтованих дозах тваринам з ГПМК призводить до зниження летальності на 37,1, 46,7 і на 38,4%, а також до зменшення неврологічних порушень до 4,56 бала (селеназа), до 4,03 бала (глутоксिम), до 4,27 бала (глутаредоксін) за шкалою Р. McGraw на 4-ту добу експерименту. Оленою Семенівною встановлено, що призначення тваринам з ГПМК селенази, глутоксима і глутаредоксіна призводить до нормалізації тіолового редокс-статусу нейрона – про що свідчить підвищення рівня глутатіону відновленого в 2,67 – 4,8 рази, та зниження глутатіону окисненого на 32,9 – 49,5 %, підвищення рівня глутатіонпероксидази в 1,82 – 2,37 разів, глутатіонредуктази в 1,73 – 4,19 разів та глутатіонтрансферази на 14 – 116%. Нормалізація тіол-дісульфідної рівноваги під впливом модуляторів ТДС призводить до підвищення стабільності білкових молекул, зокрема білків-шаперонів HSP70. З'ясовано, що курсова терапія селеназою, глутоксимом і глутаредоксіном впродовж 4 діб призводить до підвищення концентрації HSP₇₀ на 26,6 – 41,27%. Проведені ПЛР аналізу демонструють підвищення експресії мРНК гену *HSP70* в 3,6 – 4,2 разів, мРНК гену *HIF-1α* в 15 – 37 разів і мРНК гену *HIF-3α* в 2,7 – 9 разів при терапії модуляторами системи глутатіону в гострому періоді ішемії. Селеназа, глутоксिम і глутаредоксін покращують енергетичний обмін головного мозку тварин з ГПМК за рахунок активації аеробної продукції енергії, підвищують рівень АТФ (81,3 – 210%), малату (52,6 – 147,4%), енергетичний потенціал (26,2 – 43,6%), індекс фосфорилування (89,8 – 98,5%), знижують рівень лактату (37,0 – 40,7%) і покращують функціональну активність мітохондрій (зниження швидкості відкриття пори в 2,04 – 2,14 разів) і підвищення заряду мембрани мітохондрій(в 2,65 – 3,48 разів). Призначення тваринам впродовж 4 діб модуляторів системи глутатіону гальмує інтенсивність реакцій оксидативного і нітрозативного стресу – про що свідчить значне зниження

маркерів окисної деструкції білків і нітротирозину на тлі підвищення активності антиоксидантних ферментів СОД і каталази.

П'ятий розділ «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» присвячений аналізу отриманих результатів. На підставі проведених досліджень було виявлено, що препарати селенази, глутоксим і глутаредоксін надають самостійну помірну нейропротективну дію і можуть бути використані з метою потенціювання дії базової нейропротективної терапії. В дисертаційній роботі встановлено, що реалізація нейропротективних ефектів досліджуваних препаратів пов'язана з їх позитивним впливом на глутатіонову ланку ТДС і, як наслідок, – підвищення активності компонентів ендогенної нейропротекції HSP70. Можливими механізмами яких є скоординована зміна експресії генів антиоксидантних ферментів (СОД), генів глутатіон-залежних ферментів (ГР, ГПО, Г-S-T) і ферментів, які контролюють внутрішньоклітинний рівень глутатіону (γ -глутамілцистеїнсинтетази, глутатіонсинтетази, γ -глутамілтрансферази), а також генів HSP70. Отримані в ході дослідження дані визначають значення ТДС, як важливої мішені фармакологічної корекції станів, що супроводжуються глутаматною ексайтотоксичністю, депривацією системного рівня глутатіону, гіперпродукцією АФА, АФК і можуть служити теоретичним обґрунтуванням для розробки нових підходів до терапії ішемічного інсульту і експериментальним доказом клінічного застосування селенази, глутоксима і глутаредоксина.

Зауваження:

1. Для більш об'єктивної оцінки стану глутатінової ланки тіол-дисульфідної системи головного мозку можна розширити обсяг методик за рахунок визначення рівня загального глутатіону і співвідношення відновленого глутатіону до його окисненої форми.
2. Для визначення тонких ланок механізмів регуляції GSH-залежної ендогенної нейропротекції модуляторами глутатінової системи необхідно використовувати специфічні інгібітори ланок цієї системи - бутіонін сульфоксим (BSO) - інгібітор гамма глутамілцистеїн синтази в дослідах *in vivo*.
3. Для визначення впливу модуляторів глутатінової системи на енергетичний обмін додатково можна було визначити заряд внутрішньої мембрани мітохондрій.

Ці зауваження, не є принциповими, не впливають на загальну оцінку рецензованої роботи та дисертації в цілому і не зменшують її високу практичну і наукову значимість.

У рамках дискусії хотілось би отримати відповіді на наступні запитання:

1. Відомо, що глутатіон регулює р38-залежний шлях апоптозу. Чи надають досліджувані Вами модулятори глутатіону антиапоптичну дію і є залежність цієї активності від їх структури?
2. Глутатіон в нормі регулює Red / Oxi - систему мітохондрій і запобігає утворенню АФК в «паразитарних реакціях при ішемії. Пояснить позитивну метаболітотропну дію досліджуваних Вами модуляторів глутатіону через призму мітопротекції. Чи є залежність цієї дії в залежності від первинної мішені кожного окремого препарату?
3. Ви зі Своїм науковим керівником вперше висунули теорію про регулюючий вплив модуляторів глутатіону на HSP₇₀ - залежні механізми ендогенної нейропротекції. Пояснить, наскільки стійкі ці механізми нейропротекції до ішемії, враховуючи лімітованість системи глутатіону.

Висновки

Дисертаційна робота Литвиненко Олени Семенівни «Нейропротективна активність модуляторів системи глутатіону в умовах моделювання церебральної ішемії» є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовані і обґрунтовані наукові положення сукупність, яких можна кваліфікувати, як нове розв'язування важливого наукового завдання-терапії гострих порушень мозкового кровообігу. За актуальністю, новизною отриманих даних, використаними методами досліджень, дисертація є закінченим науковим дослідженням та відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року (зі змінами), а її автор Литвиненко Олена Семенівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент:

Доцент кафедри фармакології і клінічної фармакології

Державного закладу

«Дніпропетровська медична академія
Міністерства охорони здоров'я України»,

д.мед.н.



Учений секретар,
д.мед.н. Онуф Н.М.