

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Ганжі Віти Вікторівни

**«ВПЛИВ НЕЙРОПРОТЕКТОРНИХ ТА УШКОДЖУЮЧИХ ФАКТОРІВ НА
НЕЙРОНИ ГІПОКАМПУ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ БЕТА -АМІЛОЇДУ»,**

що подана до спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті
фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України для здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Дисертація Ганжі В. В. присвячена вивченню впливів
нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони гіпокамбу щурів
при впливі $A\beta_{1-42}$ для визначення можливого механізму дії цього агенту на
експериментальній моделі *in vitro* хвороби Альцгеймера.

Хвороба Альцгеймера натеper є однією з найпоширеніших
нейродегенеративних патологій, яка виникає у значної частки населення
Землі і при цьому на жаль, не піддається ефективному лікуванню.
Характерними ознаками цієї хвороби є наявність у структурах мозку
сенільних бляшок, які являють собою міжклітинні агрегати білка $A\beta$ -амілоїду
($A\beta$), а також внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків, що
утворюються з гіперфосфорильованого тау-білка, пов'язаного з
мікротрубочками. Розвиток цих патологічних утворень зумовлює значну
втрату нейронів у структурах головного мозку, особливо в гіпокампі.
Зокрема бета-амілоїд у надлишкових кількостях здатний проявляти в мозку
нейротоксичну дію та призводити до ряду серйозних когнітивних порушень,
які в кінцевому рахунку здатні зруйнувати особистість людини як такої.

Виявлення механізмів впливу $A\beta$ -амілоїду, який є основним
патологічним маркером при хворобі Альцгеймера являє безсумнівний інтерес

як для розуміння даного патогенезу, так і успішному пошуку фармакологічних засобів для лікування та можливого запобігання цієї патології. Виходячи з всього викладеного вище, вважаю, що дисертаційна робота Ганжі В.В. є актуальною, як з точки зору вирішуваних в ній фундаментальних питань, так і практичного застосування її результатів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідної тематики відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (номер державної реєстрації 0118U007344) та інших програм, що виконуються відділом (номер державної реєстрації 0116U004470 та 0120U001281).

Повнота викладення наукових положень та висновків в опублікованих працях

Основні положення дисертаційної роботи опубліковані в 18 друкованих працях, з них 5 статей у наукових фахових виданнях України, таких як Нейрофізіологія та Фізіологічний журнал, та 13 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових конференцій. Зміст автореферату дисертації Ганжі В.В. повністю відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

Наукова новизна результатів досліджень.

В дисертації В.В.Ганжі вперше порівняно впливи деяких нейропротекторних та ушкоджуючих факторів з різними механізмами дії на життєздатність нейронів гіпокампу. Автором показано негативний вплив наявності в середовищі білка $A\beta_{1-42}$ -амілоїду, при культивуванні нейронів тривалістю 24 години, на життєздатність нейронів культури гіпокампу.

За допомогою флуоресцентної мікроскопії встановлено, що $A\beta_{1-42}$ -амілоїд викликає підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в нейронах культури. Збільшується як вхід Ca^{2+} , так і його перерозподіл, при

збільшенні вмісту Ca^{2+} у ендоплазматичному ретикулумі. В результаті, підвищується базальний рівень Ca^{2+} , що негативно впливає на життєздатність нейронів.

За допомогою конфокальної мікроскопії автором вперше було досліджено вплив мемантину, циклоспорину А, а також наночастинок діоксиду церію на життєздатність нейронів культури гіпокампу, що культивувалися з $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїдом, з можливістю встановлення їх нейропротекторних властивостей. Досліджено захисні властивості неконкурентного низькоафінного антагоністу НМДА – рецепторів мемантину на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів при впливі $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїду. Мемантин виявляв захисний ефект при експериментальних умовах ексайтотоксичності, викликаній додаванням НМДА в середовище культивування.

Вперше встановлено, що блокування відкривання мітохондріальної пори неспецифічної проникності циклоспорином А, сприяло зменшенню кількості некротичних нейронів гіпокампу при токсичній дії $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїду.

Автором вперше виявлено, що введення наночастинок діоксиду церію (НДЦ) значно знижує кількість загиблих нейронів при дії $\text{A}\beta_{1-42}$ -амілоїду, тому використання НДЦ для біомедичних застосувань є дуже перспективним. Отримані дані можуть бути основою для розробки нових ефективних фармакологічних підходів для зниження рівня та впливу $\text{A}\beta$ -амілоїду при хворобі Альцгеймера.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи.

Дисертація виконана за допомогою адекватних сучасних методик дослідження, на достатньому матеріалі, відповідно до мети та завдань роботи. Всі наукові положення і висновки є цілком обґрунтованими, впливають зі змісту роботи та мають теоретичне і практичне значення.

Теоретичне та практичне значення роботи

Результати, одержані в роботі В. В. Ганжі на нейронах культури гіпокампу щурів, мають як теоретичне, так і практичне значення. Детальне дослідження механізмів, які лежать в основі порушень при інкубації нейронів з білком Аβ-амілоїдом, а також з низкою нейропротекторних та ушкоджуючих сполук, може значно розширити розуміння механізмів впливу Аβ-амілоїду та причин, які призводять виникнення хвороби Альцгеймера. Отримані в роботі експериментальні дані можуть бути основою для розробки нових ефективних фармакологічних підходів для корекції та лікування даної патології.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам

Дисертаційна робота Ганжі Віти Вікторівни оформлена відповідно до «Основних вимог до дисертацій та авторефератів дисертацій» МОН України. Рукопис побудований за класичною схемою і складається з анотації, переліку праць, опублікованих за матеріалами досліджень, вступу та чотирьох розділів (огляду літератури, організації та методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів), а також висновків та списку використаних джерел (218 найменувань). Роботу викладено на 144 сторінках та ілюстровано 25 рисунками та 3 таблицями.

У вступній частині Ганжою В. В. обґрунтована актуальність теми дисертації, сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, викладені наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, наведені дані про особистий внесок, публікації та апробацію результатів дисертації.

Огляд літератури присвячений висвітленню відомих аспектів патогенезу хвороби Альцгеймера. Особливу увагу сфокусовано на клітинних змінах при даній хворобі, зокрема на утворенні білка Аβ-амілоїду

і його токсичних властивостях. Розглянуто особливості функціонування кальцій регулюючих структур, зокрема мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму.

У розділі *«Матеріали та методи досліджень»* наведено опис загальних умов та організації проведення досліджень із детальним описом методики та характеристикою досліджуваних показників. Детально описано методики приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу щурів, забарвлювання нейронів гіпокампу, обробку клітин культури гіпокампу А β -амілоїдом. Дослідження проведено із використанням методів конфокальної мікроскопії з отриманням флуоресцентних зображень, вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Статистична значущість отриманих результатів підтверджена коректною статичною обробкою. Доцільність в застосуванні запропонованих методик та підходів не викликає сумнівів.

У розділі *«Результати власних досліджень»* структуровано, чітко і лаконічно висвітлено дані, отримані у перебігу проведених досліджень.

Автором встановлено, що наявність А β_{1-42} -амілоїду в середовищі культивування викликає істотне підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в нейронах гіпокампу. Збільшується як вхід Ca^{2+} та його перерозподіл, так і вміст Ca^{2+} у ендоплазматичному ретикулуму. В результаті, підвищується базальний рівень Ca^{2+} , що негативно впливає на життєздатність нейронів. Показано, що моделювання умов гіперкальціємії зумовлює зниження життєздатності нейронів гіпокампу і підвищує рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що призводить до збільшення кількості некротизованих нейронів. Отже, вірогідною є участь кальцієвого механізму в розвитку апоптозу та некрозу нейронів гіпокампу при дії А β_{1-42} .

Встановлено, що циклоспорин, будучи блокатором відкривання мітохондріальної пори, помітно зменшує негативний вплив А β -амілоїду на

життєздатність нейронів. Останнє свідчить про залучення змін у мітохондріях в розвиток цитотоксичної дії A β -амілоїду на досліджені нейрони.

Показано, що агоніст глутаматних рецепторів НМДА сприяє збільшенню кількості некротизованих клітин, що відповідає посиленню ушкодження нейронів культури гіпокампу внаслідок ексайтотоксичності. Блокатор НМДА-рецепторів мемантин, значно зменшує кількість клітин з ознаками некрозу при дії НМДА.

Автором продемонстровано, що мемантин зменшує кальцієвий сигнал як в умовах контролю так і у нейронах культивованих з A β ₁₋₄₂-амілоїдом, але з більш вираженим ступенем, також позитивно впливав на життєздатність нейронів. Кількість некротичних та апоптотичних клітин при цьому була меншою, ніж за відсутності даного блокатора.

Вперше виявлено, що наночастинки діоксиду церію (НДЦ) сприятливо впливають на життєздатність нейронів гіпокампу в умовах негативної дії A β ₁₋₄₂-амілоїду, значно зменшуючи кількість апоптотичних та некротичних нейронів. Особливо ефективним було завчасне додавання НДЦ перед введенням A β ₁₋₄₂-амілоїду в середовище культивування.

Розділ «Результати власних досліджень» добре проілюстрований, кожен підрозділ закінчується короткими висновками та містить список праць автора, у яких оприлюднені результати, що подаються у даному підрозділі.

Заклучний розділ *«Аналіз та узагальнення результатів»* написаний з використанням сучасних даних світових наукових досліджень. В ньому автор детально обговорює і узагальнює отримані результати, що дозволяє зробити аргументовані висновки. Висновки переважно є чіткими та лаконічними, відображають основні результати дослідження.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні запитання та зауваження:

1. В роботі тривалість дії А β 1–42-амілоїду на нейрони культури гіпокампу складала 24 години, хоча в методиці немає обґрунтування того, чому саме такий часовий інтервал дії амілоїду було вибрано, зважаючи ще і на той факт, що у людини хвороба Альцгеймера є довготривалим процесом.
2. Хотілося б більш точного опису критеріїв, використаних в роботі для відділення апоптичних уражень нейронів від некротичних.
3. В рамках загальної дискусії хотілося б почути думку автора стосовно того, чи однаково чутливими до токсичної дії амілоїду є різні клітини гіпокампу, адже це складна структура з різними нейронними угрупованнями.
4. При представленні експериментальних даних на графіках і в тексті автореферату бажаним було б використовувати числові значення кількості клітин, бо відсоткові відмінності і достовірність різниці сприймалася б набагато органічніше, зважаючи ще і на значні цифри самих клітин, які дослідила авторка роботи.
5. Висновок 1, в якому стверджується про «відтворення токсичної дії амілоїду», мабуть, слід було б стилістично викласти по іншому.
6. Для загальної дискусії хотілося б почути думку авторки роботи про те, наскільки дані, отримані в модельному експерименті на гіпокампі щурів можна перенести на подібні процеси у гіпокампі людини на різних стадіях розвитку хвороби Альцгеймера.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Ганжі Віти Вікторівни «Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони гіпокампу щурів при дії бета-амілоїду», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, є самостійним, оригінальним та завершеним науковим

дослідженням, в якому отримані істотні результати для розуміння впливу нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на нейрони культури гіпокампу при дії А β ₁₋₄₂-амілоїду. Дисертація за своєю актуальністю, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, обґрунтованістю основних положень та висновків повністю відповідає вимогам п.11 та п.13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 У 567 (зі змінами, внесеними в постанову Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, N 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016), які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор — Ганжа Віта Вікторівна, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 — фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри

фізіології людини і тварин

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор



Макарчук М.Ю.

Підпис проф. Макаrchука М.Ю. засвідчую:

Вчений секретар НДЧ

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

Підпис
Вчений секретар НДЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
03.09.2021р.



Караульна Н.В.

