

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ганжи Віти Вікторівни
«ВПЛИВ НЕЙРОПРОТЕКТОРНИХ ТА УШКОДЖУЮЧИХ ФАКТОРІВ
НА КУЛЬТИВОВАНІ НЕЙРОНИ ГІПОКАМПУ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ БЕТА-АМІЛОЇДУ»,
що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

1. Актуальність обраної теми.

Хвороба Альцгеймера (ХА) – найпоширеніша нейродегенеративна патологія, рівень захворюваності якої неухильно зростає у всьому світі. За прогнозами фахівців, число людей із ХА до 2050 року збільшиться до 100 млн. осіб. З клінічної точки зору, ХА – це поступове зниження когнітивних здібностей, а також соціальних навиків. Когнітивна дисфункція пов'язана зі зниженням до 80 % синтезу ацетилхоліну в холінергічних нейронах та послабленням їхнього впливу на неокортекс та гіпокамп – структури мозку, що відповідають за процеси уваги, навчання, пам'яті. Накопичення токсичного β -амілоїдного пептиду (А β) та іонів Zn, Cu і Fe, утворення внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків з гіперфосфорильованного тау-білку переважно в неокортексі та гіпокампі поряд з нейродегенерацією складають молекулярну та нейроморфологічну основу ХА.

На даний час терапія пацієнтів із ХА, спрямована на нормалізацію рівня нейротрансмітерів, має лише симптоматичний характер. Застосування антиамілоїдної терапії моноклональними антитілами, спрямованої на елімінацію амілоїдних бляшок та олігомерів А β , показала позитивні результати лише в експериментальних дослідженнях. Антизапальна терапія щодо пригнічення нейрозапалення як одного з чинників розвитку амілоїдогенезу є перспективною, проте наразі недостатнє її втілення в клінічну практику. Отже, триває пошук нових підходів щодо лікування даного захворювання, що базується на фундаментальних знаннях про механізми амілоїдозу та їх екзогенну регуляцію.

У відповідності з цим, дисертаційна робота Ганжи Віти Вікторівни «Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на культивовані нейрони гіпокампу щурів при дії бета-амілоїду» представляється важливою та своєчасною.

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

Дисертаційна робота виконана згідно наукових досліджень відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України (номер державної реєстрації 0118U007344, 0116U004470 та 0120U001281).

Нижче, згідно вимог МОН України та на підставі вивчення дисертаційної роботи, автореферату і наукових праць здобувача, опублікованих за темою дисертації, зупинюся на науково-теоретичних та практичних аспектах роботи, які, на мій погляд, мають суттєве значення та науково-практичну новизну.

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Сформульовані Ганжою В. В. наукові положення та висновки дисертаційної роботи обґрунтовані достатньою кількістю експериментальних досліджень, проведених у первинній дисоційованій культурі нейронів гіпокампу та клітинних моделей гіперкальціємії та ХА із застосуванням сучасних методів мікроскопії, та підтверджуються всією сукупністю результатів досліджень, обговорених із залученням зарубіжних джерел.

Перелічене вище дозволяє оцінити одержані результати наукового дослідження, основні наукові положення, висновки як обґрунтовані.

4. Достовірність наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.

Сформульовані Ганжою В. В. основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених задач методів нейрофізіологічного дослідження життєздатності нейронів культури гіпокампу за умов дії ушкоджуючих та нейропротекторних факторів. Отримані дані опрацьовані статистично за допомогою методів варіаційної статистики та дисперсійного аналізу ANOVA.

Дослідження проводилися з дотриманням принципів біоетики, що підтверджується протоколом засідання комітету з біомедицинської етики Інституту фізіології імені О. О. Богомольця (№ 14 від 06.02.2014 року).

5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених досліджень та одержаних результатів.

Дисертантом на основі скрупульозного нейрофізіологічного та математичного аналізу досліджена внутрішньоклітинна концентрація іонів Ca^{2+} в культурі нейронів гіпокампу мозку щурів за умов дії β -амілоїду $\text{A}\beta_{42}$. Встановлено істотне підвищення базального Ca^{2+} , що

негативно впливає на функціональні властивості нейронів гіпокампу. З'ясовано молекулярні механізми порушення Ca^{2+} гомеостазу в клітинах гіпокампу.

Виявлено нейропротекторні властивості циклоспорину А і мемантину при амілоїдозі як важливих екзогенних факторів пригнічення кальцієвих механізмів розвитку апоптозу та некрозу нейронів гіпокампу при дії $\text{A}\beta_{42}$.

Вперше виявлено вплив наночастинок діоксиду церію на підвищення життєздатності нейронів гіпокампу за умов клітинної моделі ХА.

6. Практичне значення отриманих результатів.

Практичне значення роботи полягає в патогенетичному обґрунтуванні застосування нових ефективних методів корекції порушень Ca^{2+} гомеостазу в клітинах гіпокампу при ХА, а також застосування новітніх нанотехнологій для підвищення життєздатності нейронів при їх пошкодженні за умов амілоїдогенезу.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях та авторефераті.

Дисертант є автором 18 наукових праць. З них 5 статей у фахових виданнях України, 13 тез доповідей на наукових конференціях та з'їздах.

Наукові положення та висновки досить повно відображені в наукових роботах та авторефераті. Всі розділи автореферату виражають сутність дисертаційної роботи, де в стислій формі викладено результати досліджень, основні положення та висновки. Автореферат дисертації оформлений згідно вимог МОН України.

Матеріали дисертаційної роботи В. В Ганжи пройшли апробацію на наукових конференціях та з'їздах України та за кордоном.

8. Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота побудована за загальноприйнятою схемою згідно вимог МОН України. Роботу викладено на 143 сторінках. Дисертація включає анотацію, список наукових праць, вступ та розділи: огляд літератури, матеріали та методи; результати досліджень, в які входять 2 розділи та 14 підрозділів, а також обговорення результатів власних досліджень, висновки, список використаної літератури (220 джерел).

В розділі «Огляд літератури», який складається із 7 підрозділів, викладено історію відкриття амілоїдних білків, наведено результати сучасних досліджень щодо структури і властивостей різних форм β -амілоїдних пептидів, зосереджено увагу на те, що мономери $\text{A}\beta$ можуть агрегувати в олігомери, протофібрили та амілоїдні фібрили. Представлено су-

часну гіпотезу нейродегенерації при ХА внаслідок токсичної дії олігомера А β та його структурного взаємозв'язку з металами Cu, Zn, Fe в тканинах мозку. Зроблено акцент на виключній ролі попередника А β PP та γ -секретази в амілоїдогенному шляху утворення β -амілоїду в гіпокампі та судинах мозку при ХА.

Відзначено, що А β швидко зв'язується з клітинними мембранами та призводить до збільшення внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що пов'язано з процесами пошкодження та загибелі клітин. В той же час, як відзначає дисертант, механізми зростання Ca^{2+} в клітинах мозку недостатньо вивчені. В «Огляді літератури» також наведені літературні дані про те, що токсичні олігомери А β_{40} викликає пошкодження мітохондрій та порушення гомеостазу іонів Ca^{2+} , а підвищення цитозольного Ca^{2+} , у свою чергу, викликає надлишкове накопичення А β та гіперфосфорилування тау-білка та веде до загибелі нейронів.

Узагальнюючи дані літератури, автор дійшла висновку, що блокатори мітохондріальної пори та антиоксидантна дія нанодисперсного діоксиду церію можуть суттєво зменшувати загибель нейронів мозку при токсичній дії А β .

Таким чином, в «Огляді літератури» наданий глибокий аналіз літературних джерел, що дає підставу казати про наукову обізнаність дисертанта в області проблеми, яка вивчається.

Розділ «Матеріал і методи дослідження» написаний кваліфіковано. Детально викладені методики приготування первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу та відтворення клітинних моделей ХА та гіперкальціємії, визначення життєздатності культивованих клітин при дії пошкоджуючих (гіперкальціємія, амілоїдогенна патологія) та при впливі захисних факторів (циклоспорин А, мемантин, нанокристалічний діоксид церію). У роботі застосовані високотехнологічні методи оцінки функціонального стану нейронів за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа з програмним забезпеченням, а також флюориметричної мікроскопії. Використані моделі та методи дослідження є адекватними щодо вирішення поставлених автором задач дослідження.

Серед найважливіших результатів, отриманих автором, які мають принципове значення для розроблювальної проблеми і дозволять дати кваліфікаційну характеристику роботи, необхідно зазначити наступне.

У роботі представлені переконливі докази про вплив надлишкової концентрації олігомерів А β_{42} на гомеостаз внутрішньоклітинного Ca^{2+} в культурі клітин гіпокампу внаслідок збільшення виходу іонів Ca^{2+} в цитоплазму та поповнення депо Ca^{2+} в ендоплазматич-

ному ретикулумі. Такі зміни цитозольного Ca^{2+} токсичні для клітин гіпокампу, призводять до апоптозу та некрозу, що автором доведено за допомогою методу конфокальної мікроскопії та підтверджено ілюстративним матеріалом. На підставі отриманих результативних досліджень із застосуванням клітинного моделювання гіперкальціємії та з урахуванням літературних даних, автор припускає, що одним з механізмів нейротоксичної дії олігомерів $\text{A}\beta_{42}$ є посилене вивільнення іонів Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму в цитоплазму нейронів.

Заслужують на увагу серії експериментів з вивчення нейропротекторних ефектів блокатору мітохондріальної пори циклоспорину А, агоністу глутаматних рецепторів NMDA мемантину і наночастинок діоксиду церію. Слід зазначити, що такий методичний підхід до регуляції Ca^{2+} гомеостазу на клітинній моделі ХА автором глибоко обґрунтований сучасними літературними даними, які наведені в розділах «Огляд літератури» та «Обговорення результатів дослідження». В результаті проведених досліджень автором доведено, що циклоспорин А внаслідок блокування каналів неспецифічного проникнення на мітохондріальній мембрані, підвищує життєдіяльність нейронів гіпокампу при токсичній дії олігомерів $\text{A}\beta_{42}$. Це дуже важливий висновок, який розширює фармакологічний спектр циклоспорину А та відкриває перспективу для його застосування під час лікування хворих на ХА.

Необхідно зазначити цікаві дані, отримані дисертантом, щодо нейропротекторної дії мемантину – селективного блокатору NMDA глутаматних рецепторів в умовах токсичної дії олігомерів β -амілоїдних пептидів. Автором встановлено, що мемантин запобігає розвитку апоптозу та некрозу нейронів гіпокампу за умов клітинного моделювання ХА. В роботі встановлено, що нейропротекторний ефект мемантину зумовлений не лише інгібуванням NMDA глутаматних рецепторів, але й завдяки зменшенню перерозподілу внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} , що забезпечує захист нейронів від перевантаження іонами Ca^{2+} . Це вкрай важливий висновок, який обґрунтований складними дослідженнями базального рівня Ca^{2+} , перехідних процесів іонів Ca^{2+} , викликаних деполяризацією мембрани при стимуляції клітин електричним полем, активацією потенціал-чутливих каналів Ca^{2+} аплікацією деполяризуючого розчину KCl і вивільненням Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму. На підставі отриманих даних автор стверджує, що мемантин пригнічує потенціал-залежні канали L-типу. Отримані дані важливі для розуміння тонких механізмів регуляції Ca^{2+} гомеостазу в умовах амілоїдогенної патології.

Необхідно відзначити експериментальні постановки з визначення нейропротекторних ефектів наночастинок діоксиду церію, що є перспективним для втілення нанотехнологій для антиоксидантного захисту клітин мозку при ХА.

У розділі «Обговорення результатів досліджень» дисертант на високому професійному рівні проводить аналіз отриманих в роботі результатів досліджень, порівнює з даними літератури, формулює основні положення, які відображені у 7 висновках і дають відповіді на поставлені в роботі питання.

Таким чином, отримані в дисертаційній роботі результати досліджень базуються на унікальному фактичному матеріалі та мають глибоку доказову основу.

9. Запитання, зауваження та рекомендації з боку опонента.

Принципових зауважень до дисертації та автореферату немає. Проте, у мене є зауваження щодо назви роботи. На мій погляд, логічно було б у назві роботи на перше місце поставити вивчення впливу ушкоджуючих, а потім нейропротекторних факторів. Це відповідало б і поставленим задачам дослідження, і викладеному в дисертації змісту роботи.

Запитання до роботи та побажання носять дискусійний характер, але не впливають на її загальну позитивну оцінку.

1. У Вашій роботі доведено позитивні впливи циклоспорину А і мемантину на збереження життєдіяльності нейронів гіпокампу за умов клітинної моделі ХА. Як Ви вважаєте, при сумісному їх застосуванні буде проявлятися сумарний або потенціюючий ефект нейропротекторної дії цих препаратів?

2. Чому Ваша увага була зосереджена на дослідженнях антиоксидантних властивостей саме діоксиду церію при амілоїдозі, а не інших антиоксидантних речовин?

3. На мій погляд, цікавим було б проведення досліджень з визначення пролонгованих ефектів циклоспорину А та мемантину.

4. Бажаним для верифікації клітинної моделі ХА було б визначення в культурі клітин гіпокампу токсичного олігомеру $A\beta_{40}$.

Висновок

Дисертаційна робота В. В. Ганжи «Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на культивовані нейрони гіпокампу щурів при дії бета-амілоїду» є актуальним і фундаментальним дослідженням в галузі електрофізіології та клітинної біології. У ході виконання роботи отримані вагомі наукові результати щодо ролі порушення внутрішньоклі-

тинного гомеостазу іонів Ca^{2+} в процесах розвитку амілоїдогенної патології при клітинно-му моделюванні ХА та його корекції блокаторами мітохондріальної пори циклоспорином А та агоністом глутаматних NMDA рецепторів мемантином, а також доведена роль наночастинок діоксиду церію в антиоксидантному захисту гіпокампу за цих умов. За актуальністю проблеми, методичними підходами, рівнем наукової новизни, практичною цінністю отриманих результатів дисертація В. В. Ганжи «Вплив нейропротекторних та ушкоджуючих факторів на культивовані нейрони гіпокампу щурів при дії бета-амілоїду» є завершеною працею, яка 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 постановах 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:

Зав. лабораторією нейрофізіології,
імунології та біохімії ДУ «Інститут
неврології, психіатрії та наркології
НАМН України», д-р біол. наук, проф.



Берченко О. Г.

