

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Шаповал Натальи Сергеевны «Оценка влияния коэнзима Q₁₀ на эндотелиальные компоненты гематоэнцефалического барьера в эксперименте», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.6.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы диссертационной работы

Церебральный эндотелий играет ключевую роль в функционировании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и нарушение его нормального функционирования, в том числе, нарушение функций митохондрий в клетках, наблюдается при ишемических поражениях мозга и других нейродегенеративных заболеваниях, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона.

Коэнзим Q₁₀ является компонентом внутренней мембраны митохондрий и участвует в процессах обмена энергии, окислительно-восстановительных процессах, в реакции окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий клеток. Создан лекарственный препарат коэнзим Q₁₀ для приема внутрь. Однако при приеме внутрь коэнзим Q₁₀ обладает низкой биодоступностью. Известно, что коэнзим Q₁₀ оказывает нейропротекторное действие и способен проникать через ГЭБ, но не механизм этого процесса не определен. Поэтому исследования механизмов действия лекарственной формы коэнзима Q₁₀ для внутривенного введения представляют большой научный интерес. Внедрение такой лекарственной формы может значительно повысить эффективность препарата.

В соответствии с этим, актуальность диссертационного исследования Шаповал Н.С., посвященного изучению влияния окисленной и восстановленной форм коэнзима Q₁₀ (убихинона и убихинола) на клетки церебрального эндотелия нейроваскулярной единицы в условиях *in vitro* и на структуры гиппокампа, миндалина и коры головного мозга крыс в экспериментах *in vivo*, не вызывает сомнений.

Научная новизна

В рамках диссертационного исследования впервые установлено *in vitro* на клетках модели ГЭБ, что коэнзим Q_{10} участвует в процессах регуляции проницаемости, причем разные концентрации оказывают разнонаправленное действие. Впервые показана способность восстановленной формы $CoQ_{10}H_2$ снижать количество Rac-1- иммунопозитивных клеток, что ведет к снижению АФК-индуцированной проницаемости ГЭБ и укреплению барьерных функций ГЭБ.

В исследованиях *in vivo* впервые исследовано действие $CoQ_{10}H_2$ 1% раствора для внутривенного введения в дозе 30 мг/кг на крысах. Установлено, что препарат вызывает увеличение количества иммунопозитивных клеток CD31 в коре и миндалинах, увеличение иммунопозитивных клеток Pgp в коре и гиппокампе и снижение в миндалинах, а также увеличение иммунопозитивных клеток CLDN5 в коре и снижение в гиппокампе и миндалинах. При этом снижается интенсивность апоптоза в энторинальной коре, гиппокампе и миндалинах головного мозга крыс без модели патологических нарушений.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Автором получены новые результаты о влиянии коэнзима Q_{10} в двух формах на клетки церебральных эндотелиоцитов ГЭБ, расширяющие представления о механизмах действия препарата, в том числе его способности изменять проницаемость ГЭБ.

Полученные данные о действии 1% водного раствора солюбилизированной субстанции $CoQ_{10}H_2$ для внутривенного введения на проницаемость и эндотелиальные компоненты ГЭБ должны быть использованы в доклинических и клинических исследованиях препарата.

Степень обоснованности и достоверности положений, выносимых на защиту

В диссертационной работе Шаповал Н.С. использованы современные экспериментальные методы исследования. Все серии экспериментальных исследований логично спланированы, выполнены на достаточном количестве экспериментов, что позволило автору получить достоверные результаты и достигнуть поставленной цели и выполнения задач. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью адекватных методов математической статистики, общепринятых в медико-биологических исследованиях, в связи с чем достоверность полученных результатов и сделанных на этом основании выводов не вызывает сомнений.

Оценка содержания работы и ее завершенности

Диссертация Шаповал Н.С. изложена на 118 страницах машинописного текста, включающих введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, список литературы из 144 источников, иллюстрирована 2 таблицами и 20 рисунками.

Во введении сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и научно-практическая значимость работы, а также представлены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы содержит описание современных данных о роли коэнзима Q_{10} в метаболизме клетки, действии коэнзима Q_{10} на митохондрии церебральных эндотелиоцитов, нейропротекторной активности коэнзима Q_{10} .

Во второй главе «Материалы и методы» описаны методы исследования. Подробно изложены методики получения клеточных культур и формирования модели ГЭБ *in vitro*, методы иммуногистохимического анализа и фармакокинетические методы (высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с электрохимическим детектированием), характеризующиеся адекватной полнотой и высокой информативностью.

В главе «Результаты исследования и их обсуждение» представлены данные исследований *in vitro* и *in vivo*.

В экспериментах *in vitro* на модели ГЭБ показано, что трансэндотелиальное электрическое сопротивление (ТЭС) является показателем целостности ГЭБ и, что изменения ТЭС отражают изменения проницаемости ГЭБ при действии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂. Установлено, что CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂, снижая количество Rac-1-иммунопозитивных клеток, способствуют снижению АФК-индуцированной проницаемости ГЭБ.

В экспериментах *in vivo* обнаружено, что CoQ₁₀H₂ при внутривенном введении в дозе 30 мг/кг включается в локальные окислительно-восстановительные процессы. CoQ₁₀H₂ быстро и эффективно повышает антиоксидантный резерв головного мозга, что подтверждается, данными о том, что редокс-статус CoQ₁₀ в мозге оставался на одном уровне, а редокс-статус в мозге и плазме крови свидетельствовали о частичном окислении CoQ₁₀H₂ при поступлении из крови в головной мозг до уровня их эндогенного тканевого редокс-баланса.

Установленные эффекты CoQ₁₀H₂ в течение 24 ч в энторинальной коре и 2 ч в миндалине свидетельствует об активации процессов неоангиогенеза, ассоциированных с барьерогенезом, поскольку CD31 рассматривается как прогностический маркер ангиогенеза. И поскольку CLDN5 относится к маркерам проницаемости эндотелиальных клеток, показано, что в энторинальной коре через 96 ч CoQ₁₀H₂ запускает процессы неоангиогенеза, ассоциированные с барьерогенезом и продолжаются до 192 ч, но при этом в гиппокампе и миндалине головного мозга спустя 192 ч после введения CoQ₁₀H₂ можно прогнозировать снижение структурной целостности ГЭБ. Низкая биодоступность CoQ₁₀H₂ частично связана с его взаимодействием с Р-гликопротеином, участвующим в выведении препарата из клетки. CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг снижает апоптоз в коре головного мозга, гиппокампе и миндалине.

Подведены общие итоги исследования, проведен глубокий анализ полученных данных и их сопоставление с данными литературы.

Диссертация содержит 5 выносимых на защиту положений, которые полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы. В диссертации приведено 5 выводов, соответствующих задачам. Выводы обоснованы, подтверждаются полученными результатами. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций автора обеспечивается количественной стороной полученного экспериментального материала и качеством его обработки.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

По результатам диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, все 5 в индексируемых базах Web of Science, Scopus, и 2 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Критических замечаний по работе нет. Возникли следующие дискуссионные вопросы:

Желательно пояснить характер действия растворителя на экспрессию белка Rac-1 и объяснить специфичность такого действия растворителя.


Для изучения каких свойств коэнзима Q10 и на каких патологических моделях в дальнейшем потенциально применимы полученные результаты диссертационного исследования?

Заключение

Диссертационная работа Шаповал Натальи Сергеевны «Оценка влияния коэнзима Q10 на эндотелиальные компоненты гематоэнцефалического барьера в эксперименте» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная для фармакологии и клинической фармакологии научная задача – определение механизма действия коэнзима Q10 на проницаемость ГЭБ.

По актуальности темы, научной новизне, методологии и научно-практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановления Правительства №426 от 20.03.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Шаповал Н.С. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.6.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН


 29.08.22

Шимановский Николай Львович

Подпись Шимановского Н.Л. заверяю:

Ученый секретарь
К.м.н., доцент кафедры кожных болезней и косметологии ФДПО ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»

Демина Ольга Михайловна


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Почтовый адрес: 119021, г. Москва, Большая Пироговская ул., д. 9а, тел. +7 (499) 766-41-57, сайт: rsmu.ru/index.php e-mail: rsmu@rsmu.ru