

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующей лабораторией психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки Ворониной Татьяны Александровны на диссертацию Тарасовой Татьяны Владимировны «Роль альфа-синуклеина в формировании популяций дофаминергических нейронов ядер среднего мозга, дифференциально поражаемых при болезни Паркинсона» (экспериментальное исследование), представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.03 – Патологическая физиология, 03.01.04 – Биохимия.

Актуальность темы выполненной работы

По частоте встречаемости среди нейродегенеративных заболеваний болезнь Паркинсона занимает одно из первых мест и наиболее распространена в развитых странах с высокой продолжительностью жизни, чем и обусловлен значительный интерес в понимании механизмов данного заболевания, и что еще более важно, способов лечения.

Изучение механизмов возникновения болезни Паркинсона выявило ключевую роль изменения конформации белка альфа-синуклеина, который является основным компонентом патогистологических включений, определяемых при postmortem исследовании тканей головного мозга больных с этим заболеванием. Альфа-синуклеин обнаруживается в пресинаптических терминалиях нейронов, и для него доказана важная роль в патогенезе не только болезни Паркинсона, но и целого ряда других нейродегенеративных заболеваний. Однако, до настоящего времени остаются малоизученными основные функции этого белка в норме и его роль в формировании популяций дофаминергических (ДА) нейронов при болезни Паркинсона.

В связи с вышеизложенным диссертация Т.В. Тарасовой, посвященное анализу роли альфа-синуклеина в нормальном развитии дофаминергических нейронов и изменения их развития при нарушении функции этого белка, а

также в выявлении связи между отклонениями, вызванными дефицитом альфа-синуклеина в периоды формирования дофаминергических нейронов и развитием нейродегенеративного процесса при паркинсонизме, является своевременным и актуальным исследованием, представляющим большой интерес для патологической физиологии и биохимии.

Поставленные цели и задачи диссертационного исследования четко сформулированы. Изучение эффекта альфа-синуклеина на формирование популяций ДА нейронов в черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) – структурах, дифференциально поражаемых при болезни Паркинсона, проведено на линиях генетически модифицированных мышей с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина. Предложенные автором методические подходы удачно сочетают классические патогистологические методы с самыми современными биохимическими, иммуногистохимическими и биотехнологическими методиками.

Достоверность и новизна результатов

Достоверность основного вывода диссертационного исследования о дифференциальном модулирующем действии альфа-синуклеина на формирование популяций дофаминергических нейронов в структурах среднего мозга обеспечена использованием двух различных моделей животных. Помимо широко используемой для изучения патогенеза альфа-синуклеинопатий линии нокаутных мышей, автором была получена новая независимая линия с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина, причем для ее создания автором был применен оригинальный подход, позволяющий обеспечить минимальные изменения генома модельных мышей.

Высокое качество экспериментального материала, тщательность анализа полученных данных и подтверждение основных выводов в независимых повторях с использованием альтернативных моделей не оставляют места для сомнений в их достоверности.

Следует отметить высокий уровень познаний автора в патологической анатомии и патологической гистологии нервной системы мышцы.

Результаты работы широко представлены на конференциях, материалы которых опубликованы и приведены в списке публикаций по теме диссертации. За исследование, представленное в диссертационной работе, Т.В. Тарасова награждена медалью им. П.М.Альбицкого от Санкт-Петербургского общества патофизиологов за лучшую научную работу 2016.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация Т.В. Тарасовой логично построена, доступно и профессионально написана и составлена по стандартному плану. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных экспериментов и их обсуждения, выводов, методических рекомендаций и списка цитируемой литературы, который включает 175 источников.

Обзор литературы изложен на 55 страницах машинописного текста, органично разбит на главы, написан хорошим научным языком. Автором в процессе работы с литературой было проанализировано достаточно большое количество публикаций по теме диссертационной работы. Следует отметить интересный научно-исторический раздел по исследованию болезни Паркинсона, в котором отражена роль российских ученых в этом направлении.

Глава «Материалы и методы» содержит исчерпывающее описание методик и методов, примененных в процессе выполнения диссертационного исследования. Подробно описаны методики приготовления аутопсийного материала исследуемых структур мозга мышцы с описанием их анатомической локализации, приведены патогистологические методики, которые включают иммуногистохимическое окрашивание срезов, биохимические методы анализа белка, включающие иммуноблотинг, молекулярно-биологические методы

для анализа генотипов используемых линий генетически модифицированных мышей и, наконец, описание методологии и методов работы непосредственно с модельными животными, которые включают инструментальный анализ двигательных функций животных.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Первая глава раздела «Результаты и их обсуждение» посвящена морфометрическому анализу ДА нейронов у мышей с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина. Автором убедительно показано модулирующее действие альфа-синуклеина на популяции развивающихся нейронов в области ЧС среднего мозга. Так, на 11-й день эмбрионального развития количество дофаминергических нейронов статистически значимо было больше у нокаутных животных, а на 13-й день эмбрионального развития их число в этой структуре было уже ниже, чем у контрольных животных дикого типа. Параллельно автором был проведен подсчет ДА нейронов в другой анатомической структуре – вентральной области покрышки (ВОП), которая у больных с болезнью Паркинсона поражается в гораздо меньшей степени. И в этой структуре альфа-синуклеин не обладал модулирующим действием на ДА нейроны. Исследование инкорпорированного бромдезоксисуридина показало, что альфа-синуклеин не влияет на пролиферативную активность предшественников ДА нейронов.

Следующая глава посвящена морфометрическому анализу роли ЧС и ВОП в период раннего постнатального синаптогенеза. На этом этапе вводится еще одна линия генетически модифицированных мышей - тройные нокауты по всем членам семейства синуклеинов (бессинуклеиновые животные). Этот эксперимент проводится для того, чтобы исключить возможное замещение функции отсутствующего альфа-синуклеина двумя другими членами семейства синуклеинов. Проведение этих исследований позволило автору сделать важный вывод о том, что исключение альфа-

синуклеина, а также всех трех членов семейства синуклеинов, не влияет на количество ДА нейронов в постнатальном периоде.

Выявление автором ранее неизвестного факта - завышенного уровня экспрессии мультимерина-1 в нервной системе мышей традиционно используемого альфа-синуклеинового нокаута Абеловича, продиктовало необходимость создания новой независимой линии конвенционного нокаута альфа-синуклеина. Описанию получения новой независимой линии конвенционного нокаута гена альфа-синуклеина методом конститутивной Cre-рекомбинации, посвящена отдельная глава диссертационного исследования.

В заключительной части работы представлены выводы и практические рекомендации, в которых отражены основные результаты диссертации и их значение для биомедицинских исследований и клинической практики.

Ценность для науки и практики результатов работы

Автором впервые при использовании морфометрического анализа показано модулирующее влияние альфа-синуклеина на популяции развивающихся ДА нейронов в области черной субстанции и вентральной области покрышки и приводятся убедительные доказательства того, что альфа-синуклеин не влияет на пролиферативную активность предшественников ДА нейронов. Впервые на линии генетически модифицированных мышей - тройных нокаутов по всем членам семейства синуклеинов показано, что в период раннего постнатального синаптогенеза исключение альфа-синуклеина, а также всех трех членов семейства синуклеинов, не влияет на количество ДА нейронов в постнатальном периоде. Высокую степень научной новизны имеют выполненные автором эксперименты по получению новой независимой линии конвенционного нокаута гена альфа-синуклеина методом конститутивной Cre-рекомбинации.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результатом работы является новая линия генетически «чистых» трансгенных мышей, с помощью которой возможно дальнейшее изучение альфа-синуклеинопатий, а так же возможно тестирование новых соединений для поиска замещения дефицита альфа-синуклеина.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Результаты исследования опубликованы в рецензируемых отечественных и иностранных журналах, основные полученные результаты неоднократно представлялись на конференциях, в том числе международных. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из которых 6 статьи в журналах из списка ВАК.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Тарасовой Т.В. полностью соответствуют основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность темы, научная новизна, практическая значимость, основные результаты и их обсуждение.

Замечания

1. В хороший обзор литературы, представленный в диссертации, было бы желательно включить больше работ отечественных авторов, которые успешно развивают это направление в России, и имеются интересные публикации по исследованию механизмов патогенеза болезни Паркинсона, особенно ранних ее стадий, моделированию которых и посвящено диссертационное исследование.
2. Автор употребляет название белка мультимерина-1. Правильное написание для названия гена Mmrn1 – для мыши, а для человека MMRN1.

Сделанные замечания имеют рекомендательный характер и не снижают ценности диссертации.

Заключение

Диссертация Тарасовой Татьяны Владимировны «Роль альфа-синуклеина в формировании популяций дофаминергических нейронов ядер среднего мозга, дифференциально поражаемых при болезни Паркинсона» (экспериментальное исследование), представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология, 03.01.04 – Биохимия является завершенной и цельной научно-квалификационной работой. Все представленные выводы обоснованы и базируются на самостоятельно полученных автором материалах и результатах, их обработке и интерпретации. Оформление работы отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Исследование Тарасовой Т.В. посвящено актуальной и важной проблеме для современного общества, проведено с использованием обширного набора различных современных методов, содержит уникальные результаты, исходя из которых автор формулирует научно-практические рекомендации. По актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным постановлением правительства РФ от 24.09.13 номер 842, а ее автор, Татьяна Владимировна Тарасова, заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.03 – Патологическая физиология, 03.01.04 – Биохимия.

зав. лабораторией психофармакологии
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова»

Доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки,

Воронина Татьяна Александровна: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8. E-mail: voroninata38@gmail.com Тел.: 84956012414

Подпись профессора Т.А. Ворониной заверяю,
Ученый секретарь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова»,

кандидат биологических наук

12 сентября 2016 г.

Т.А. Воронина



В.А. Крайнева