

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, главного научного сотрудника лаборатории нейроморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» Худоеркова Рудольфа Михайловича на диссертацию Голоборщевой Валерии Владимировны «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышцах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 - патологическая физиология

Актуальность темы выполненного исследования

Диссертационное исследование Голоборщевой Валерии Владимировны «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышцах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина» посвящено изучению развития паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина МФТП, у мышечей с генетическим нокаутом α -синуклеина. Актуальность выбранной темы не вызывает сомнения и определяется ростом нейродегенеративных заболеваний в развитых странах мира, в частности, – болезни Паркинсона (БП), которая встречается с частотой 1-2 случая на 1000 человек. Закономерности развития болезни Паркинсона остаются до конца не изученными. Считается, что в основе развития заболевания лежат конформационные изменения белка α -синуклеина, образование его токсических олигомеров и фибриллярных структур. Особый интерес для понимания его роли в развитии болезни Паркинсона представляет генетическое моделирование нарушений α -синуклеина *in vivo* и получение мышечей с различными нокаутами этого белка. На основании выше изложенного соискателем была сформулирована цель настоящей работы – изучить патогенетические механизмы МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма у животных с генетическим нокаутом альфа-синуклеина. В связи с чем работу проводили на двух линиях нокаутных мышечей: линия Δ Flox-KO – с минимизацией неспецифических эффектов модификаций локуса альфа-синуклеина и хорошо известная линия Abel-KO, которая имеет дополнительные промоторные последовательности в локусе α -синуклеина.

Решение обозначенной проблемы может открыть перспективы в использовании адекватных нокаутных моделей для изучения патогенетических механизмов БП, а также для исследования молекулярных мишеней при разработке патогенетической терапии БП и других синуклеинопатий.

Научная новизна полученных результатов

Впервые при моделировании паркинсонического синдрома путем системного введения животным токсина МФТП была изучена роль дефицита альфа-синуклеина при избирательном поражении ДА-ергических нейронов, входящих в состав черной субстанции и вентрального поля покрышки головного мозга мышей, нокаутных по гену альфа-синуклеина.

Были получены новые данные, характеризующие МФТП-индуцированный паркинсонизм, на модельных системах генетического нокаута, которые воспроизводят как недостаточность альфа-синуклеина, так и всех трех членов семейства синуклеинов.

Впервые было установлено влияние модификаций, привнесенных в геном экспериментальных моделей *in vivo* и происходящих в локусе альфа-синуклеина, на экспрессию гена мультимерина 1, расположенного в непосредственной близости с альфа-синуклеином.

Были выявлены особенности патогенеза паркинсонического синдрома, индуцированного МФТП, у линии мышей Abel-КО и Δ Flox-КО с избирательной инактивацией гена альфа-синуклеина и у линии мышей abg-КО с инактивацией всех трех членов семейства синуклеинов – бессинуклеиновый нокаут. Установлено, что при генетической инактивации альфа-синуклеина снижается общее число ДА-ергических нейронов в черной субстанции и вентральном поле покрышки головного мозга, а введение этим животным МФТП не влияет на число ДА-ергических нейронов в исследуемых образованиях мозга, но приводит к манифестации поведенческих реакций и биохимических показателей. У животных с инактивацией всех трех членов семейства синуклеинов (abg-КО) при введении им МФТП развиваются типичные патоморфологические и нейрохимические проявления паркинсонического синдрома, что предполагает наличие функционального замещения у двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов.

Полученные в настоящем исследовании результаты указывают на важную роль альфа-синуклеина и других членов семейства синуклеинов в таких процессах как оборот дофамина в пресинаптических окончаниях, выживаемость дофаминергических нейронов и проявление ранних признаков паркинсонизма, что в сочетании с данными литературы позволяет рассматривать белки этого семейства в качестве перспективных молекулярных мишеней для разработки терапии, направленной на оптимизацию функции синапсов дофаминергических нейронов, а использованные в работе генетически «бесследовых» нокаутных линий Δ Flox-КО и abg-КО позволяет рассматривать их как перспективные модельные системы для исследования механизмов нейродегенеративных процессов при синуклеинопатиях.

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

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций работы не вызывает сомнений и подтверждается достаточным объёмом полученного фактического материала. Исследование проводилось по грамотно составленному плану работы, сформулированные задачи полностью соответствуют цели работы и для её достижения использовались современные методы: типирование потомков от общих гетерозиготных производителей с последующим формированием экспериментальных и контрольных когорт животных, что выполнялось методом конвенционной ПЦР, уровни экспрессии мРНК гена мультимерина-1 оценивали методом количественной ОТ-ПЦР, дофаминергические нейроны черной субстанции и вентрального поля покрышки среднего мозга анализировали с использованием современных наборов и техник иммуногистохимического исследования, уровень дофамина и его метаболитов в стриатуме определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а локомоторную активность животных с МФТП-токсической моделью паркинсонизма оценивали *in vivo* с помощью базовых моторных тестов (вертикальный шест и перевёрнутая сетка) и на установке «CatWalk».

Полученные данные обрабатывали статистически, используя программные пакеты Statistica 12.0 и GraphPad Prism 8, что подтверждает обоснованность и достоверность сформулированных выводов.

Полученные результаты и сделанные выводы вносят существенный вклад в понимание патогенетических закономерностей МФТП-индуцированного паркинсонизма и роли в этом процессе белков-синуклеинов. Практические рекомендации, представленные в диссертации, являются объективным следствием изложенных результатов проведённой работы и могут найти применение в дальнейших научных исследованиях.

Структура и содержание диссертации

Работа построена по традиционному принципу и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы и список литературы, содержащий 185 источников – 19 отечественных и 166 иностранных. Материалы диссертации изложены на 142 страницах машинописного текста, иллюстрированы 3 таблицами, 1 схемой и 37 рисунками.

Обзор литературы состоит из 5 разделов, в которых рассматриваются общие сведения о болезни Паркинсона и той роли, которая отводится

α -синуклеину в развитии патогенеза этого заболевания, а также моделирование паркинсонического синдрома на животных. В целом анализ литературы представляет несомненный интерес. В разделе «Материалы и методы исследования» представлены современные адекватные методы генетического получения нокаутных мышей, методы оценки локомоторной активности животных, биохимические и иммуногистохимические методы и методы морфометрической оценки дофаминергических нейронов. Статистическая обработка данных проведена современными методами.

В целом, выполнен большой объем исследований на современном методическом уровне, что позволило В.В. Голоборщевой адекватно отразить полученные данные в главе «Результаты исследования» и решить сформулированные задачи.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Основные результаты диссертационной работы В.В. Голоборщевой представлены в виде 13 печатных работ, в том числе 7 статей в изданиях, соответствующих перечню ВАК (из них 2 статьи в рецензируемых иностранных журналах Q1 и Q2), и 6 сообщений в сборниках докладов российских и международных научных конференций.

Текст автореферата полностью отражает вынесенные на защиту положения и соответствует содержанию диссертации, а тема исследования – специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Замечания к диссертационному исследованию

При общей положительной оценке представленной работы считаем необходимым высказать и ряд замечаний.

Обзор литературы производит хорошее впечатление как по объему и качеству представленного материала, так и стилю его изложения и говорит о том, что автор глубоко вошел в исследуемую проблему. И на этом фоне выглядит странным, что соискатель, обладая таким большим багажом знаний, не использовал их для обсуждения своих очень интересных результатов. В диссертации даже нет главы Осуждение результатов исследования. А обсудить есть что, например. В главе Результаты исследования, раздел 3.4.3. «Морфометрический анализ дофаминергических нейронов чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП)» говорится о том, что дофаминергические нейроны вентральной области покрышки у альфа-синуклеин нокаутных линий животных устойчивы к воздействию МФТП. Однако, соискатель этот вопрос не обсуждает и не даёт на него ответ: почему количество дофаминергических нейронов в ВОП после введения МФТП достоверно увеличилось у линии Δ Floх-KO?

Далее, в главе Материал и методы ничего не говорится о том:

проводилось ли у линии мышей, нокаутных по гену альфа-синуклеина, определение альфа-синуклеина методом иммуноблоттинга. Если нет, то почему это не обсуждается?

В разделе 3.5.2 «Исследование нейрохимического дофаминового статуса в стриатуме у мышей, моделирующих дисфункцию всех трёх членов семейства синуклеинов» выглядит несколько странно фраза «нейрохимический дофаминовый статус». Вместо этого словосочетания следует использовать определение «биогенные амины».

Анатомическое образование головного мозга «ventral tegmental area», именуемое в работе «вентральная область покрышки», – в русскоязычной анатомической номенклатуре значится как «вентральное поле покрышки», поэтому правильной было бы использовать это наименование.

В пунктах 4 и 5 «Выводов» не указаны анатомические образования головного мозга в которых проводился количественный анализ дофамина и его метаболитов. При этом уместно было бы использовать формулировку «нигростриатные образования головного мозга», чтобы объединить зону интереса всех исследований.

Вместе с тем, следует отметить, что указанные замечания касаются малой, не самой значительной части диссертации. Они не носят принципиальный характер и не влияют на положительную оценку представленной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационное исследование Голоборщевой Валерии Владимировны «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышцах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новые сведения актуальной научной проблемы, которые могут помочь в расширении и углублении представлений о патогенетическом механизме МФТП-индуцированного паркинсонизма и роли белков семейства синуклеинов в нём. А использованные в работе «бесследовые» линии нокаутных животных могут стать перспективным материалом для исследования механизмов нейродегенеративных процессов при БП и других синуклеинопатиях, а также для поиска потенциальных подходов к патогенетической терапии этих нейродегенеративных расстройств. Результаты диссертационной работы имеют существенное значение для биомедицинской науки.

По актуальности, новизне, теоретической и научно-практической значимости результатов и объёму проведенных исследований работа соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Голоборщева Валерия Владимировна, заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

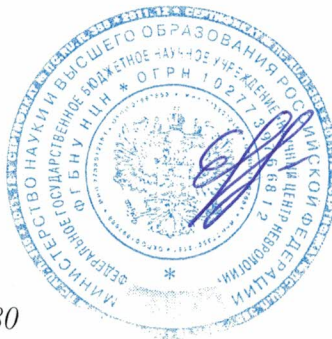
Официальный оппонент:
доктор медицинских наук,
г.н.с. лаборатории нейроморфологии
ФГБНУ «Научный центр неврологии»



Р.М. Худоевков

Подпись д.м.н. Р.М. Худоевкова удостоверяю.

Учёный секретарь ФГБНУ
«Научный центр неврологии»
кандидат медицинских наук



А.Н. Евдокименко

17.11.2021

ФГБНУ Научный центр неврологии
125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80
тел. +7 (495) 374-77-76
Официальный сайт: www.neurology.ru
Адрес электронной почты: center@neurology.ru