

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации Всеволода Григорьевича Пинелиса на диссертацию Голоборщевой Валерии Владимировны «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышцах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 – «Патологическая физиология»

**Актуальность** диссертационной работы Голоборщевой Валерии Владимировны «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышцах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина» определяется следующими положениями:

1. Несмотря на интенсивные научные исследования, проблемы механизмов возникновения, развития, а тем более эффективной и долгосрочной патогенетической терапии паркинсонизма окончательно не решены. Болезнь Паркинсона (БП) – наиболее распространённая форма паркинсонического синдрома, которая имеет как наследственную этиологию, так и спорадическую. Ключевым фактором, приводящим к развитию БП, принято считать дегенерацию нигростриатных дофаминергических нейронов, влекущим за собою истощение нейромедиатора дофамина в полосатом теле головного мозга. Многочисленные научные исследования показали, что основным компонентом патогистологических включений дофаминергических нейронов, именуемых в литературе тельцами Леви, является белок альфа-синуклеин.

2. Современные успехи генетики способствовали не только установлению точной локализации нарушений в структуре генов, выявлению экспрессии определённых белков, но и позволили изучать процессы патогенеза генетических заболеваний на созданных мутагенных линиях различных нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона. Отсюда, создание и изучение адекватных экспериментальных моделей на животных,

которые позволят оптимизировать выявление и исследование основных каскадных механизмов, приводящих к нейродегенерации экстрапирамидной системы при паркинсонизме, остаётся актуальной задачей биомедицинской науки. Её решение откроет перспективы для определения молекулярных мишеней при разработке патогенетической терапии БП.

Таким образом, рецензируемая работа актуальна и направлена на изучение патогенетических механизмов МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма у животных с генетическим нокаутом альфа-синуклеина является актуальной.

**Научная значимость, теоретическая и прикладная ценность исследования определяется установлением следующих основных закономерностей:**

1. Установлены патогенетические особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на современной и ранее неизученной альфа-синуклеин дефицитной линии мышей  $\Delta$ Flox-KO в сравнении с широко используемой в лабораториях мира линией Abel-KO, а также на определение влияния привнесённых промоторных последовательностей в модифицированный локус альфа-синуклеина этих линий.
2. Впервые была изучена роль дефицита альфа-синуклеина в селективном поражении DA-ергических нейронов ЧС и ВОП мозга нокаутных по гену альфа-синуклеина мышей в условиях моделирования паркинсонического синдрома путём системного введения МФТП.
2. Получены данные по характеристике МФТП-индуцированного паркинсонизма на модельных системах генетического нокаута, воспроизводящих недостаточность альфа-синуклеина, или всех трёх членов семейства синуклеинов.
3. Впервые установлено влияние привнесённых в геном экспериментальных моделей *in vivo* модификаций в локусе альфа-синуклеина на экспрессию гена мультимерина-1, картированного в непосредственной близости с альфа-синуклеином.

4. Впервые была получена совершенно новая линия бессинуклеиновых мышей, воспроизводящая делецию всех трёх членов семейства синуклеинов (альфа-, бета- и гамма-синуклеинов), на которой был исследован эффект возможного функционального замещения двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов на развитие МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома.

5. Практическая значимость работы состоит в изучении валидных экспериментальных моделей недостаточности альфа-синуклеина для изучения патогенеза болезни Паркинсона и других нейродегенеративных расстройств, что позволит в будущем разработать и изучить механизмы терапии болезни Паркинсона.

6. Разработан уникальный комплексный подход с использованием современных биохимических, микроскопических, молекулярно-генетических исследований для характеристики известных и новой линии нокаутных мышей, начиная от получения нокаутных мышей, их фенотипирования, проведения моделирования МФТП-индуцированного паркинсонизма и вплоть до сравнительного морфометрического анализа дофаминергических нейронов в чёрной субстанции и вентральной области покрышки.

**Общая характеристика работы.** Работа соискателя посвящена детальному изучению МФТП-индуцированного паркинсонизма на двух экспериментальных альфа-синуклеин нокаутных моделях *in vivo*. В ходе выполнения работы получены оригинальные данные по характеристике токсического паркинсонизма на новой «бесследовой» модельной системе, воспроизводящей недостаток альфа-синуклеина, а также на т.н. бессинуклеиновых животных, моделирующих генетический нокаут всех трёх членов семейства синуклеинов. Также было проанализировано, как модификации в локусе альфа-синуклеина в двух независимых «нокаутных» линиях влияют на экспрессию прилежащего гена мультимерина 1 в нервной ткани. Использование валидных экспериментальных моделей недостаточности альфа-синуклеина остаётся актуальной методикой для изучения патогенеза

болезни Паркинсона и других нейродегенеративных расстройств. Необходимо подчеркнуть высокий методический уровень проведённых исследований, начиная от получения нокаутных мышей, их фенотипирования, проведения моделирования МФТП-индуцированного паркинсонизма и вплоть до сравнительного морфометрического анализа дофаминергических нейронов в чёрной субстанции и вентральной области покрышки.

Задачи, которые ставит перед собой автор диссертационной работы, носят прикладной биомедицинский характер: поиск адекватных моделей для исследования роли альфа-синуклеина в механизме поражения дофаминергических нейронов при БП (а в перспективе — и других альфа-синуклеинопатий), создание удобной и валидной системы для оценки ранних признаков локомоторной дисфункции у экспериментальных моделей паркинсонизма *in vivo* – все это относится к области науки, ориентированной на непосредственную помощь медикам. В многочисленных исследованиях последних лет идет активное обсуждение молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы нейродегенерации, а также механизмов, способных вызвать БП.

**Организация исследования.** Среди предпосылок к проведению продуктивного исследования важными являются: четкое обоснование цели, последовательности задач, выбор наиболее подходящих экспериментальных объектов, разработка комплекса адекватных подходов и методов, позволяющих сопоставление результатов, получаемых в разных сериях экспериментов, и создание набора адекватных инструментов.

### **Структура диссертации и качество оформления**

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, ёмкого заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 185 источников, из которых 19 написаны на русском языке и 166 – на иностранном языке. Работа аккуратно оформлена и хорошо иллюстрирована: изложена на 142 страницах машинописного текста и

содержит 37 рисунков, 3 таблицы и 1 схему.

Во введении чётко сформулированы актуальность исследования, его цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Эта часть диссертации даёт ясное представление об изучаемой проблеме и существенно облегчает восприятие дальнейшего материала.

Обзор литературы изложен на 38-ми страницах машинописного текста, органично разбит на главы, написан хорошим научным языком. Автором детально рассмотрены современные проблемы исследования патогенетических механизмов паркинсонического синдрома, роли альфа-синуклеина в нём, а также вопросы токсического моделирования этого экстрапирамидного расстройства в лабораторных условиях. Обзор литературы даёт широкое представление об актуальном состоянии научной проблемы, материал преподносится последовательно и грамотно. Можно лишь отметить большой объём литературного обзора, некоторые стилистические и грамматические ошибки.

В главе «Материалы и методы» представлены данные о нокаутных линиях животных, использованных в диссертационном исследовании, подробно описан метод МФТП-токсического моделирования паркинсонизма у этих животных, а также дальнейшие методики для выявления особенностей патогенетического механизма у альфа-синуклеин нокаутных мышей в условиях токсического паркинсонизма: анализ локомоторной функции в базовых моторных тестах («вертикальный шест», «перевёрнутая сетка») и многофункциональной установке «CatWalk XT», количественная оценка биоаминов в полосатом теле головного мозга методом ВЭЖХ, приготовление гистологических препаратов, иммуногистохимическое окрашивание срезов, морфометрический анализ DA-ергических нейронов ЧС и ВОП среднего мозга с учётом поправки Аберкромби, а также оценка уровней экспрессии мРНК гена мультимерина-1 методом количественной ОТ-ПЦР в рамках изучения влияния привнесённых регуляторных последовательностей в модифицированный локус альфа-синуклеина двух нокаутных линий мышей. Все протоколы четко и

грамотно изложены, используемые автором методы соответствуют поставленным задачам и достаточны для их решения.

Результаты диссертации логично структурированы, автор активно применяет методы прикладной статистики. В работе удачно решены вопросы визуализации результатов исследования, их графического, табличного и схематического представления.

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

**Степень достоверности результатов проведенного исследования и их апробация.** Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций работы не вызывает сомнений и подтверждается достаточным объёмом набранного материала, адекватной современной статистической обработке с выбором параметрических и непараметрических компонент.

**Статистическая обработка данных.** Результаты электрофореза агарозного геля документировали после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью системы BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США). Для анализа полученных данных ВЭЖХ использовали программное обеспечение ALEXYS (Antec Leyden, Нидерланды). Результаты теста CatWalk прошли обработку в программном обеспечении CatWalk XT10.6 (Noldus, Нидерланды). Статистическая обработка данных была выполнена в программных пакетах Statistica 12.0 и GraphPad Prism 8: в случае нормального распределения для множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализа ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc), Тьюки или Даннета, для попарных сравнений – t-критерий Стьюдента; в случае отсутствия нормальности распределения выборок для попарных сравнений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Нормальность распределения массивов данных была оценена в тесте Колмогорова-Смирнова.

Материалы диссертации представлены в 13-ти научных работах, в том

числе опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах и 6 тезисов докладов. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

**Задачи исследования.** Цель и задачи диссертационной работы достаточно полно обозначена в ее названии.

Задачи диссертации в основном связаны друг с другом их общей целью и что важно для интерпретации результатов общностью примененных методов и подходов, в особенности имевшихся в распоряжении диссертанта молекулярных инструментов. План решения каждой из задач был направлен на поиск пути обретения нового знания по целому ряду аспектов проблемы.

**Результаты исследования** свидетельствуют о большом объеме проделанной экспериментальной работы, в ходе которой было необходимо освоить много несхожих по природе объектов. Полученные новые сведения органично вписываются и тем самым пополняют современные представления о механизмах развития болезни Паркинсона. В работе выявлены особенности патогенеза МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у двух линий мышей с избирательной инактивацией гена альфа-синуклеина (Abel-KO и ΔFlox-KO), а также линии бессинуклеинового нокаута (abg-KO). Установлено, что генетическая инактивация альфа-синуклеина приводит к снижению общего числа DA-ергических нейронов в чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП). Введение нокаутным животным пронеуротоксина МФТП не влияет на число DA-ергических нейронов ЧС и ВОП, но индуцирует манифестацию поведенческих и биохимических признаков экспериментального паркинсонизма. При генетическом «выключении» всех белков-синуклеинов в условиях МФТП-нейротоксичности развиваются типичные патоморфологические и нейрохимические признаки паркинсонического синдрома, что предполагает наличие функционального замещения у двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов.

**Практическая значимость.** Поскольку линию избирательного нокаута альфа-синуклеина ΔFlox-KO, а также созданной на его основе линию abg-KO с

делецией генов  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -синуклеинов, ранее не использовали для моделирования паркинсонического синдрома, полученные данные могут быть полезны для разработки новых подходов к патогенетической диагностике и лечению паркинсонизма. В частности, открывается возможность выбора новых молекулярных мишеней таргетной терапии – семейство белков-синуклеинов.

**Степень обоснованности положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Обширный объем проведенных исследований полностью соответствует уровню диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Автором в работе использованы современные методы исследования и способы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций, которые свидетельствуют о высокой степени обоснованности всех положений и выводов диссертационного исследования, выносимых на защиту. Комплекс используемых соискателем методов исследования соответствует поставленным целям и задачам исследовательской работы, а совокупность результатов и выводов органично вытекает из проведенного диссертационного исследования. На основании экспериментальных данных сформулировано шесть выводов, в которых суммированы результаты исследований. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют цели и задачам исследования, и полностью обоснованы. Принципиальных замечаний нет.

Знакомство с материалами диссертационной работы Голоборщевой Валерии Владимировны служит поводом для ряда дискуссионных соображений и вопросов, что должно восприниматься как достоинство диссертации, как признак новизны и актуальности обнаруженных фактов. У меня имеется одно очень важное замечание: работа посвящена роли альфа-синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона, однако сам этот показатель не был определен, хотя существуют коммерческие наборы для определения этого показателя. Эти данные только обогатили бы работу.

Из отдельных замечаний можно отметить следующие:

1. К сожалению, мало внимания уделено изменениям экспрессии гена



мультимерина 1, имеющего важное значение, хотя эти изменения были довольно значительными (разы).

2. В описании «высокотехнологичной установки CatWalk» говорится о 250 параметрах (стр.89), но нет хотя бы краткого перечисления наиболее важных. Встречаются фразы типа: «Анализ двигательной функции на установке CatWalk показал, что у животных дикого типа МФТП достоверно изменяет множество параметров, описывающих походку». В действительности в главе Результаты говорится только о силе давления на платформу и расстоянии между следами (отпечатками лап). В чем состоят остальные 248 параметров и почему они не использованы, следовало отметить в главе «Методы» или в «Результаты исследования».

2. Рекламное слово «высокотехнологичная» в названии установки CatWalk стоило заменить на более подходящее по смыслу, например, на «мультипараметрическая».

3. Стр. 61. «2.3.2 Анализ нейрохимических веществ полосатого тела...». Не бывает «нейрохимических веществ». Лучше было написать: «...содержания дофамина и его метаболитов...».

5. Стоило добавить в список литературы больше отечественных работ из русскоязычных научных журналов.

Отмеченные недостатки не влияют на положительную оценку диссертационной работы. Решения, полученные в ходе исследования, носят характер новых научных результатов. Подтверждение высказанных гипотез обширным и разнообразным фактическим материалом обеспечивает достоверность результирующих выводов и практических рекомендаций.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Голоборщевой Валерии Владимировны «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышцах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, отражает актуальную проблему современной науки в исследовании патогенетических основ

паркинсонизма и является завершённой научно-квалификационной работой, в которой решена важная научно-практическая задача и получены новые оригинальные данные по характеристике МФТП-индуцированного паркинсонизма на новой «бесследовой» модельной системе, воспроизводящей недостаточность альфа-синуклеина, а также на животных, моделирующих генетический нокаут всех трёх членов семейства синуклеинов.

Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым пунктами 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в последующих редакциях Постановлений Правительства Российской Федерации), а её автор, Голоборщева Валерия Владимировна, заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 – «Патологическая физиология».

**Официальный оппонент**  
**доктор медицинских наук, профессор**  
**г.н.с. лаборатории нейробиологии и**  
**основ развития мозга**  
**ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»**  
**Минздрава России**

**В.Г. Пинелис**

Подпись профессора, д.м.н. В.Г. Пинелиса

«Удостоверяю»

Учёный секретарь ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»  
Минздрава России  
кандидат медицинских наук



**А.Г. Тимофеева**

06.12.2021 г.

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

119296, Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1

Телефон: +7499-134-30-83

Официальный сайт: <http://nczd.ru>. Адрес электронной почты: [fisenko@nczd.ru](mailto:fisenko@nczd.ru)