

УТВЕРЖДАЮ

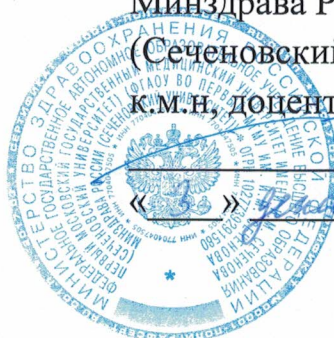
Проректор по научно-  
исследовательской работе ФГАОУ ВО  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России

(Сеченовский Университет)

к.м.н., доцент

Д.В. Бутнару

2021 г.



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) на диссертационную работу 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 исследования, ее связь с планами медицинских отраслей науки и народного хозяйства.**

Паркинсонический синдром – неврологический симптомокомплекс мультифакториальной природы, вызванный нарушением функций экстрапирамидных структур головного мозга. Выявление нарушений на ранних стадиях развития затруднено, что приводит к низкой выявляемости заболевания на начальных стадиях. Сложность также представляет дифференциальная диагностика с другими экстрапирамидными патологиями, отягощенными «паркинсоноподобным» набором симптомов.

Избирательное поражение дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции и истощение запасов дофамина (ДА) в полосатом теле головного мозга являются ключевыми компонентами патогенеза болезни

Паркинсона, представляющей собой наиболее распространенную форму паркинсонического синдрома. Установлено, что альфа-синуклеин ( $\alpha$ -Syn) связан с синаптической передачей ДА-ергических нейронов, так как он взаимодействует с синаптическими везикулами, участвует в аксональном транспорте и регуляции функциональной активности митохондрий. В клетке  $\alpha$ -Syn находится в динамическом равновесии между свободной и мембраносвязанной формами. При патологии конформационные изменения  $\alpha$ -Syn приводят к образованию различных олигомерных форм белка, которые отличаются размерами, формой и проявлением токсических свойств. Олигомеры способны образовывать фибриллярные структуры, которые при агрегации в нейронах формируют нерастворимые белковые включения – тельца Леви. Более того, получены многочисленные экспериментальные доказательства того, что нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), специфически поражающий нигростриатные ДА-ергические нейроны, вызывает повышение экспрессии и посттрансляционные модификации эндогенного  $\alpha$ -Syn, а в некоторых случаях, ведет к его агрегации в цитоплазме ДА-ергических нейронов с образованием патогистологических включений. Тем не менее, остаётся неясным, является ли формирование нерастворимых внутриклеточных агрегатов  $\alpha$ -Syn побочной реакцией при нейродегенеративном процессе, проявлением нейропротекции или повреждающим клетку фактором в целом, и вовлечён ли эндогенный альфа-синуклеин в механизмы токсического действия МФТП на ДА-ергические нейроны чёрной субстанции головного мозга.

Для практических целей перспективны исследования, направленные на выявление  $\alpha$ -Syn в качестве биомаркера патофизиологических каскадов при МФТП-токсическом паркинсонизме, что необходимо для совершенствования патоморфологической диагностики болезни Паркинсона, в том числе прижизненной и на ранних стадиях заболевания. Достижению указанных целей посвящена настоящая диссертация. Результаты исследования Голоборщевой В.В. способствуют раскрытию роли  $\alpha$ -Syn и других членов семейства синуклеинов в специфическом поражении ДА-ергических нейронов нигростриатной системы при экспериментальном паркинсонизме.

**Новизна исследования, полученных в нем результатов, выводов и рекомендации, сформулированные в диссертации.**

Работа выполнена на высоком методологическом уровне с применением современных нокаутных моделей животных. Голоборщева В.В. использовала для МФТП-моделирования паркинсонизма современные ранее не изученные линии генетического нокаута, воспроизводящие дефицит  $\alpha$ -Syn. Такой подход позволил получить новые данные о поведенческих, биохимических и

патоморфологических характеристиках МФТП-индуцированного паркинсонизма у новой «бесследовой» линии  $\alpha$ -Syn дефицитных животных. Также стало возможным изучение роли дефицита  $\alpha$ -Syn в селективном поражении ДА-ергических нейронов компактной части чёрной субстанции и вентральной области покрышки, дифференцированно поражаемых у больных с болезнью Паркинсона. Автор установила, что генетическая инактивация  $\alpha$ -Syn приводит к изменению общего числа ДА-ергических нейронов в чёрной субстанции и вентральной области покрышки, а также оказывает нейропротекторный эффект при субхроническом введении нейротоксина МФТП. Также автор обнаружила, что при делеции всех членов семейства синуклеинов в условиях токсического паркинсонизма развиваются нарушения, аналогичные изменениям, выявленным у животных с немодифицированным геномом. Автором получены приоритетные данные о влиянии привнесённых в геном модификаций в локусе  $\alpha$ -Syn на экспрессию соседнего гена мультимерина-1. Показано, что генетический вариант «бесследовой»  $\alpha$ -Syn нокаутной линии не оказывает влияния на уровни экспрессии мультимерина-1 в нервной ткани головного мозга, в то время как у особей другой широко используемой во многих лабораториях мира нокаутной модели уровни экспрессии этого гена увеличены в 35 раз.

Результаты и выводы работы вносят значимый вклад в понимание патогенеза МФТП-токсического паркинсонизма и роли белков семейства синуклеинов в нём.

### **Обоснованность использованных методов, а также полученных результатов и положений диссертации.**

В соответствии с поставленной в работе целью и задачами автором проведена комплексная оценка патогенетических механизмов МФТП-токсического экспериментального паркинсонизма у двух линий мышей с избирательной инактивацией гена  $\alpha$ -Syn и бессинуклеиновых животных. Заключение были выполнены на основании анализа результатов, полученных в ряде локомоторных тестов: вертикальный шест, перевёрнутая сетка, многофункциональная установка «CatWalk XT», исследования уровня моноаминов: серотонина, дофамина и его метаболитов, сравнительного гистологического анализа популяции ДА-ергических нейронов чёрной субстанции и вентральной области покрышки, а также изучения влияния привнесённых регуляторных последовательностей в модифицированный локус  $\alpha$ -Syn на уровни экспрессии соседнего гена мультимерина-1 методом ОТ-ПЦР.

Результаты исследования сопоставлены с международными и отечественными данными для эффективной и достоверной оценки

патогенетических механизмов МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма у животных с генетическим нокаутом  $\alpha$ -Syn. Выводы, теоретические положения и практические рекомендации диссертации Голоборщевой В.В. доложены и обсуждены на российских и международных конференциях и опубликованы в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах.

### **Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении и углублении представлений о патогенетическом механизме МФТП-индуцированного паркинсонизма и роли белков семейства синуклеинов в нём. Результаты исследования показывают, что  $\alpha$ -Syn и другие члены семейства синуклеинов влияют на численность популяции нейронов в чёрной субстанции и вентральной области покрышки головного мозга, а также играют важную роль в дофаминовой нейротрансмиссии в пресинаптических окончаниях ДА-ергических нейронов. Также установлено, что белки-синуклеины вовлечены в процессы выживаемости ДА-ергических нейронов и манифестацию ранних признаков паркинсонизма в условиях МФТП-нейротоксичности.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.**

Полученные результаты и выводы в сочетании с уже имеющимися в настоящее время научными данными позволяют рассматривать белки семейства синуклеинов в качестве перспективных молекулярных мишеней таргетной терапии, направленной на оптимизацию функции синапсов ДА-ергических нейронов. В рамках научно-практической значимости также открываются новые возможности использования генетически «бесследовых» нокаутных линий с моно- или тройной делецией генов-синуклеинов для исследования механизмов нейродегенеративных процессов при болезни Паркинсона и других синуклеинопатиях.

### **Оценка структуры, языка и стиля диссертации.**

Диссертация построена по традиционному плану. Работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий работы на русском и иностранном языках. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и содержит 37 рисунков, 3 таблицы и 1 схему.

### **Замечания.**

Диссертационная работа Голоборщевой В.В. в целом заслуживает положительной оценки, однако имеются вопросы и замечания:

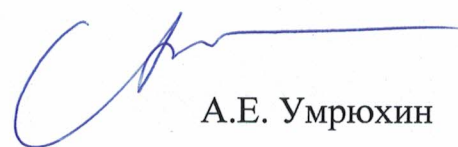
1. В тексте указаны расхождения между гистологическими и поведенческими изменениями у альфа-синуклеиновых мутантов на фоне введения токсина, что, однако, не отражено в выводах. При этом такое несоответствие представляет собой важный феномен, как и факт снижения числа дофаминергических нейронов и уровня дофамина у интактных альфа-синуклеиновых мышей без каких-либо поведенческих последствий этого отклонения.
2. Результаты серий опытов по изучению введения токсина у различных генетических линий мышей требуют статистической обработки двухфакторным дисперсионным анализом с принятием введения токсина/физиологического раствора в качестве одного фактора и генетического варианта – второго фактора. В работе автор применила однофакторный дисперсионный анализ. Применение адекватного метода статистической обработки повысит точность и информативность анализа и позволит уточнить совершаемые на их основе выводы.
3. Могут ли результаты экспериментов с размером выборки  $n=6$  быть статистически проанализированы с помощью параметрического метода ANOVA? Например, результаты сравнительного анализа уровней экспрессии гена *Mmrn-1* у мышей двух линий с генетическим нокаутом альфа-синуклеина, представленные на рис. 16, стр. 78.

### **Заключение**

Диссертационное исследование Голоборщевой Валерии Владимировны по теме «Особенности МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышах с генетическим нокаутом альфа-синуклеина», представленное на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи раскрытия роли альфа-синуклеина в патогенетических механизмах МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма с использованием линий нокаутных животных. Диссертация соответствует пунктам 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 ее автор, Голоборщева Валерия Владимировна, заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Отзыв обсужден на научно-методической конференции сотрудников кафедры нормальной физиологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского и сотрудников кафедры патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 5 от 1.12.2021.

Председатель заседания  
заведующий кафедрой нормальной физиологии  
Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский Университет)  
доктор медицинских наук, доцент

  
А.Е. Умрюхин



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, дом 8, стр.2 Тел.: +7(499) 248-05-53, e-mail: rektorat@sechenov.ru, сайт: <https://www.sechenov.ru>