

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и
перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий»
д.фарм.н., профессор



В.Л.Дорофеев
В.Л.Дорофеев

«17» марта 2025 г.
«17» марта 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий»
о научно-практической значимости диссертационной работы
Градинарь Марии Михайловны на тему:
«Нейропротекторная роль гликопротеина-R и его функционирование при
экспериментальном паркинсоническом синдроме»,
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность работы

Гликопротеин-R является трансмембранным белком, который, локализуясь во многих органах и тканях, препятствует проникновению в них различных экзогенных и эндогенных веществ. Располагаясь в гематоэнцефалическом барьере, он предотвращает попадание веществ-субстратов в ткани мозга. Субстратами данного белка-транспортера является большое количество биологически активных веществ и лекарственных препаратов. В ряде исследований было показано, что некоторые нейротоксины, используемые в эксперименте для моделирования симптомов паркинсонизма, такие как диазинон, ротенон, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин являются субстратами гликопротеина-R, а значит, их проникновение в головной мозг будет зависеть от функционирования данного транспортера.

Болезнь Паркинсона – это нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, в основе патогенеза которого лежит гибель дофаминергических нейронов nigrostriарной системы и других отделов головного мозга, что приводит к появлению тяжелых нервно-психических, сенсорных и двигательных расстройств. В настоящее время в мире насчитывается более 6 миллионов пациентов с данным заболеванием.

Функционирование гликопротеина-Р при болезни Паркинсона остается малоизученным, а имеющиеся данные носят противоречивый характер. В связи с этим в диссертационной работе была поставлена задача изучить функционирование и особенности биохимических механизмов регуляции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне экспериментального паркинсонического синдрома, а также оценить возможность индукции белка-транспортера для профилактики прогрессивного развития паркинсонизма.

Работа М.М.Градинарь представляет собой фундаментальное исследование, направленное на решение фундаментальных и практических медицинских задач, что делает работу востребованной не только для биохимического и фармакологического сообщества, но и для медицины в целом.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе М.М.Градинарь впервые комплексно оценено функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при паркинсоническом синдроме, а также изучены механизмы его регуляции. Продемонстрировано, что введение ротенона не влияет на локализацию и количество транспортера в головном мозге крыс, однако экспрессия гена *mdr1a*, кодирующего данный белок, повышается. Выявлено увеличение проникновения субстрата гликопротеина-Р – фексофенадина в головной мозг животных и установлено, что это связано со снижением уровня белков плотных межклеточных контактов и повышением вследствие этого проницаемости гематоэнцефалического барьера. Доказано, что введение рифампицина – индуктора гликопротеина-Р приводит к снижению

проникновения ротенона в головной мозг и уменьшает выраженность симптомов паркинсонизма.

Достоинством диссертационной работы является разработанная и валидированная автором методика количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс.

Полученные автором новые данные о функционировании гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при паркинсонизме отражает научную новизну полученных результатов и выводы диссертационной работы.

Степень обоснованности и достоверности результатов, научных положений, выводов и рекомендаций

Основные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации, базируются на результатах грамотно спланированного экспериментального исследования. Методически правильный подход к изучению проблемы, четкое формулирование цели и задач исследования, обширный материал экспериментальной работы достаточны для решения поставленных задач и научных обобщений.

Использование современных методик (иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, вестерн-блот, полимеразная цепная реакция в реальном времени, иммуногистохимия, спектрофотометрия), сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов, адекватная статистическая обработка данных, анализ и критическая оценка полученных результатов подтверждают достоверность исследования, обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций. Научные положения, выводы и практические рекомендации сопоставимы с результатами исследования и соответствуют поставленным целям и задачам работы.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности

Область проведенных научных исследований соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки), а именно пунктам: 2. Биохимия белков. Протеомика. Белковая инженерия. Структурная биология; 8. Структура и метаболические функции биомембран; 11. Биохимические

/метаболические/энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологии. Функциональная и клиническая метаболомика в норме и при патологии; 16. Механизмы развития нейрокогнитивного дефицита; 24. Экологическая биохимия, механизмы адаптации к окружающей среде.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты диссертационной работы М.М.Градинарь вносят существенный вклад в развитие представлений о возможных механизмах регуляции гликопротеина-Р в головном мозге при токсическом ротеноновом паркинсонизме, а также расширяют знания о его роли в защите паренхимы мозга от воздействия нейротоксинов, способствующих развитию паркинсонизма.

Выявлено, что гликопротеин-Р не играет роли в ограничении проникновения своих субстратов в головной мозг при токсическом паркинсонизме, а повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера связано со снижением уровня белков плотных межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина. Автором установлен способ защиты клеток мозга от воздействия нейротоксинов – субстратов гликопротеина-Р, заключающийся в его индукции в гематоэнцефалическом барьере. Показано, что введение классического индуктора транспортера – рифампицина (20 мг/кг в течение 14 дней) снижает выраженность симптомов паркинсонизма и уменьшает проникновение ротенона в ткани головного мозга.

Таким образом, представленная диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость.

Содержание и характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа М.М.Градинарь построена традиционно, изложена на 132 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, заключение, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, выводы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована рисунками, графиками и таблицами, что повышает ее наглядность. Список литературы

представлен 236 источниками, включая 37 источников отечественной и 199 источников зарубежной литературы.

В первой главе представлен обзор отечественной и зарубежной литературы. Изложены современные сведения о структуре, локализации и функциях гликопротеина-Р, особенности его функционирования и механизмы регуляции в гематоэнцефалическом барьере. Далее в обзоре представлены имеющиеся в литературе сведения о биохимических механизмах развития болезни Паркинсона и функционировании гликопротеина-Р при этом заболевании.

Во второй главе подробно описаны использованные для проведения исследования современные методы, такие как: иммуноферментный анализ, вестерн-блот, полимеразная цепная реакция в реальном времени, иммуногистохимия, высокоэффективная жидкостная хроматография. Используемые в работе материалы и методы соответствуют цели и поставленным задачам. Объектом исследования явились крысы вистар, которые были разделены на 7 групп и у которых при токсическом паркинсонизме последовательно изучались: локализация, количество, функциональная активность, биохимические механизмы регуляции гликопротеина-Р, выраженность окислительного стресса и проницаемость гематоэнцефалического барьера. Затем исследовалось влияние индукции гликопротеина-Р на проникновение ротенона в головной мозг крыс и на выраженность симптомов паркинсонизма. Полученные данные обрабатывались адекватными статистическими методами с применением программного обеспечения «StatsoftStatistica 13.0» и GraphPadPrism 8.1.2.

В третьей главе приведены полученные автором результаты исследований. Глава состоит из 8 разделов, в которых подробно описаны функционирование и биохимические механизмы регуляции гликопротеина-Р при экспериментальном паркинсоническом синдроме, а также проницаемость гематоэнцефалического барьера и выраженность окислительного стресса. Далее представлены данные о влиянии индукции гликопротеина-Р на проникновение ротенона в головной мозг

и выраженность симптомов паркинсонизма. Установлено, что введение крысам ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 и 28 дней повышает экспрессию гена *mdr1a*, кодирующего гликопротеин-P, но локализация и количество белка в головном мозге не изменяется. Повышение экспрессии гена связано с активацией редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2. Количество транспортера при этом не изменяется, так как происходит повреждение его молекулы вследствие развития окислительного стресса. Автором показано, что развитие паркинсонического синдрома, вызванного введением ротенона в течение 7 и 28 дней, приводит к повышению проникновения маркерного субстрата гликопротеина-P – фексофенадина в головной мозг, что связано с повышением проницаемости ГЭБ, за счет снижения уровня белков плотных межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина вследствие развития окислительного стресса. В завершение автором установлено, что предварительная индукция гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере, вызванная введением рифампицина, приводит к снижению проникновения ротенона в головной мозг и снижает выраженность симптомов паркинсонизма.

В разделе «Обсуждение полученных результатов» автор подводит итоги проведенного исследования, анализирует их и сопоставляет с современными сведениями научных статей отечественных и зарубежных авторов по изучаемой проблеме.

Выводы и практические рекомендации Градинарь М.М. обоснованы и сформулированы четко, полностью соответствуют задачам и логически вытекают из результатов исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью соответствует содержанию работы и оформлен согласно принятым требованиям ВАК при Минобрнауки России.

Публикации результатов исследования

По результатам диссертационной работы опубликовано 11 работ, из

которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 1 статья в журнале, входящем в цитатно-аналитическую базу данных Web of Science.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

Принципиальных замечаний к изложенным в диссертации результатам, их интерпретации и сформулированным выводам нет. Однако, при прочтении диссертации возник ряд вопросов, сформулированных в плане дискуссии и не затрагивающих сути работы.

1. Почему изменение экспрессии гена *mdr1a* не сопровождалось изменением количества белка гликопротеина-Р?

2. Какие вещества (лекарственные препараты, биологически активные добавки, продукты питания) можно использовать для индукции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере с целью защиты клеток головного мозга от воздействия токсических веществ – субстратов транспортера?

В целом, диссертация является законченным научным трудом, оставляет очень хорошее впечатление по форме и стилю изложения.

Заключение

Диссертация Градинарь Марии Михайловны на тему: «Нейропротекторная роль гликопротеина-Р и его функционирование при экспериментальном паркинсоническом синдроме», выполненная под руководством доктора медицинских наук, доцента А.В.Щулькина и представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решена актуальная научная задача, заключающаяся в изучении биохимической регуляции функционирования белка-транспортера гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме, а также в оценке перспектив его индукции для профилактики развития токсического паркинсонизма, что имеет важное значение для биохимии и фундаментальной медико-биологической науки в целом.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Градинарь Марии Михайловны соответствует требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Градинарь Мария Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Отдела нейропсихофармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» протокол №25-1 от 14.03.2025 г.

Руководитель отдела нейропсихофармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации

Воронина Татьяна Александровна

Подпись д.м.н., профессора Т.А.Ворониной заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», к.б.н.



Васильева Екатерина Валерьевна

«17» марта 2025 г.

Контактная информация: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8,
+7(499)151-18-81; e-mail: info@academpharm.ru