

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой нормальной физиологии с биофизикой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации доктора медицинских наук, профессора Маслюкова Петра Михайловича на диссертационную работу Градинарь Марии Михайловны «Нейропротекторная роль гликопротеина-R и его функционирование при экспериментальном паркинсоническом синдроме», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование Градинарь Марии Михайловны направлено на решение актуальной проблемы биохимии, касающейся функционирования белка-транспортёра гликопротеина-R в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме, а также перспективу его индукции для профилактики развития паркинсонизма вызванного нейротоксином ротеноном.

Гликопротеин-R является трансмембранным АТФ-зависимым белком-транспортёром, который осуществляет эффлюкс эндогенных и экзогенных веществ различной химической природы из клеток. Локализуясь в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга гликопротеин-R играет защитную роль, предупреждая проникновение веществ-субстратов через гематоэнцефалический барьер в ткань мозга и выводя их обратно в просвет сосуда.

Болезнь Паркинсона – это нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, в основе её патогенеза лежит потеря дофамин-продуцирующих нейронов в черной субстанции. Причинами данного заболевания являются различные экзогенные и эндогенные факторы, из которых достаточно значимым является воздействие нейротоксинов. На сегодняшний день в Российской Федерации регистрируется около 210 тысяч пациентов с данным заболеванием, таким образом, болезнь Паркинсона является вторым по распространённости

нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера.

Для многих нейродегенеративных заболеваний характерна дисфункция гематоэнцефалического барьера с дисрегуляцией белков-транспортёров. Функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при болезни Паркинсона практически не изучалась.

В связи с вышеизложенным диссертационная работа Градинарь М.М., посвященная изучению функционирования и механизмов регуляции гликопротеина-Р при экспериментальном паркинсоническом синдроме, представляется чрезвычайно важной и актуальной.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Диссертационная работа Градинарь М.М. обладает высокой научной новизной. В работе впервые показано, что развитие экспериментального паркинсонизма, повышает экспрессию гена *mdr 1a*, кодирующего гликопротеин-Р, но это не приводит к изменению количества данного белка-транспортёра и его локализации в головном мозге крыс. Установлено, что повышение проникновения субстрата гликопротеина-Р – фексофенадина в головной мозг животных при экспериментальном паркинсоническом синдроме связано с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера вследствие нарушения его структуры и снижения уровня белков плотных межклеточных контактов - ZO-1, E-кадгерина, окклюдина.

Выявлено, что профилактическая индукция гликопротеина-Р в головном мозге крыс, вызванная введением рифампицина, перед введением ротенона, приводит к снижению проникновения нейротоксина в головной мозг и уменьшает выраженность моделируемого паркинсонического синдрома.

Научная и практическая значимость работы

Полученные результаты являются научно обоснованными и имеют фундаментальное значение для понимания функционирования и механизмов регуляции гликопротеина-Р при токсическом паркинсоническом синдроме. Работа имеет также важное практическое значение, так как автором выявлено снижения

выраженности симптомов паркинсонизма у экспериментальных животных при предварительной индукции гликопротеина-Р перед введением ротенона, что показывает перспективность индукции активности транспортера для профилактики развития паркинсонизма при контакте с нейротоксинами.

Следует особо отметить, что основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов, ординаторов на кафедрах биологической химии и фармакологии, а также в работе центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Достоверность полученных Градинарь М.М. результатов не вызывает сомнений, ввиду правильного построения дизайна эксперимента, использования автором современных методов исследования, а также применения адекватных методов статистического анализа. Принципиальные результаты были многократно воспроизведены в ходе выполнения работы, а выявленные автором эффекты подтверждены методами статистического анализа. В работе проведено достаточно обстоятельное обсуждение результатов, с широким привлечением данных других исследований. Сделанные выводы научно обоснованы и логично вытекают из представленных в работе данных.

Структура работы

Диссертационная работа Градинарь М.М. изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 15 рисунков и 17 таблиц. Работа состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список цитируемой литературы. Список литературы содержит 236 источников.

В главе «Обзор литературы» автор достаточно подробно описывает структуру белка-транспортера гликопротеина-Р, его локализацию и функции. В обзоре литературы представлена исчерпывающая информация о

функционировании и механизмах регуляции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере. Большой раздел в обзоре литературы посвящен описанию эпидемиологии, биохимических механизмов развития болезни Паркинсона, также подробно описываются причины и механизмы развития токсического паркинсонизма. Автор рассматривает биохимические механизмы развития экспериментальных моделей болезни Паркинсона, их основные преимущества и недостатки. Также, в обзоре представлена актуальная информация о функционировании гликопротеина-Р при болезни Паркинсона. Литературный обзор написан подробно с привлечением большого количества современных источников. Содержание обзора показывает, что автор хорошо знаком с последними достижениями, результатами и тенденциями в той области исследования, которой посвящена диссертационная работа.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором в работе современные методы биохимии, включая иммуногистохимические методы, вестерн-блот анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография. Выбор Градинарь М.М. перечисленных выше методов исследования является научно обоснованным и полностью соответствует задачам диссертационной работы.

В главе «Результаты исследования», которая состоит из 8 подразделов, автор излагает и анализирует результаты собственных экспериментов. В работе подробно описывается влияние развития экспериментального паркинсонического синдрома на экспрессию гена *mdr1a*, количество и локализацию гликопротеина-Р. Изучена проницаемость гематоэнцефалического барьера и выраженность окислительного стресса при экспериментальном токсическом паркинсонизме. Установлено, что при экспериментальном паркинсоническом синдроме, вызванном подкожным введением ротона в дозе 2,5 мг/кг в течение 7 и 28 суток происходит повышение экспрессии гена *mdr1a*, однако количество и локализация гликопротеина-Р не изменяется. Также происходит повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера за счет снижения относительного количества

белков плотных межклеточных контактов в результате развития окислительного стресса. Автор оценивает роль Nrf2 в индукции экспрессии гена *mdr1a* при развитии токсического паркинсонизма. На основе полученных результатов сделан вывод, что происходит активация транскрипционного фактора Nrf2, что проявляется увеличением его ядерной фракции, в результате повышается экспрессии гена *mdr1a*.

Автор подробно описывает эксперименты по влиянию индукции гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на проникновение ротенона в головной мозг и выраженность симптомов паркинсонизма. Установлено, что предварительная индукция гликопротеина-P, вызванная внутрижелудочным введением рифампицина перед введением ротенона приводит к снижению проникновения ротенона в головной мозг и снижает выраженность симптомов паркинсонизма, моделируемого нейротоксином.

В рамках данного исследования разработана и валидирована точная и чувствительная методика количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В главе обсуждение полученных результатов автор проводит всесторонний анализ полученных результатов с учетом данных современной научной периодической литературы.

Выводы полностью соответствуют поставленным задачам, актуальны для применения в дальнейших исследованиях.

Диссертация имеет завершённый характер. Научные положения, результаты, полученные автором, выводы и практические рекомендации соответствуют цели и задачам исследования, научно аргументированы и имеют научно-практическую значимость.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По материалам диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки

России, 1 статья в журнале, входящем в базу данных Web of Science; 9 тезисов докладов в материалах Российских и международных конференций; работа поддержана грантом РФФИ. Материалы диссертационной работы были многократно представлены на Всероссийских и международных научных конференциях.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Замечания

Принципиальных замечаний к стилю изложения и к оформлению диссертации нет. В оформлении диссертации допущены опечатки, имеются стилистические неточности.

Кроме того, к диссертанту имеются вопросы дискуссионного плана:

1. Насколько стойки изменения, наблюдаемые при токсическом действии ротенона? Происходит ли гибель нейронов (например, по типу апоптоза), или отмечается лишь временное снижение выделения дофамина, например по литературным данным?
2. Чем объяснить такую селективность ротенона, учитывая, что он действует в итоге на ГЭБ а не прямо на нейроны? Поражаются ли другие популяции нейронов помимо дофаминергических?

Вместе с тем, указанные замечания не имеют принципиального характера, они несколько не умаляют значимость диссертационного исследования, и не ставят под сомнение достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных на их основании выводов.

Заключение

Диссертационная работа Градинарь Марии Михайловны «Нейропротекторная роль гликопротеина-R и его функционирование при экспериментальном паркинсоническом синдроме», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится

решение научной задачи исследования функционирования и механизмов регуляции белка-транспортера гликопротеина-R на фоне экспериментального паркинсонического синдрома, а также оценка перспектив профилактики развития токсического паркинсонизма, имеющей важное значение для биохимии, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), а ее автор, Градинарь Мария Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
Высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук (14.00.02 – анатомия человека, 03.00.13 - физиология),
профессор

17.03.2025

Маслюков Петр Михайлович

Подпись д.м.н., профессора Маслюкова П.М. заверяю
Ученый секретарь
доктор медицинских наук, профессор



Мельникова Ирина Михайловна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 150000, Ярославская область, г. Ярославль, ул. Революционная, 5
Телефон: 8 (4852) 30-56-41, 8 (4852) 72-91-42,
Электронная почта: rector@ysmu.ru
Адрес в сети интернет: www.ysmu.ru