



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук профессора ШАБАНОВА Петра Дмитриевича
на диссертацию 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 проблемы

Изучение механизма действия фармакологических веществ на молекулярном уровне в настоящее время стало приоритетным направлением биохимической фармакологии. В этом отношении весьма показательна эволюция фармакокинетических методов исследования от событийных к клеточно-молекулярным, ставших неким эталоном современных научных и научно-практических исследований. Среди последних неизменный интерес вызывают транспортные системы клеток, регулирующих поступление и выведение лекарственных препаратов в или из клетки. С помощью изучения активности этих систем можно предсказывать судьбу лекарств в организме и взаимодействие лекарств на уровне трансмембранного клеточного обмена между внутриклеточным сектором и межклеточной тканью или внутрисосудистым сектором. К таким системам относится в том числе и гликопротеин-R, представляющий собой эффлюксный АТФ-зависимый трансмембранный белок, препятствующий проникновению в клетки эндогенных и экзогенных веществ различной химической природы, являющихся его субстратами. Локализуясь в эндотелии сосудов гематоэнцефалического барьера, данный белок выводит различные субстраты из паренхимы мозга и ограничивает поглощение своих субстратов в головной мозг. Активность гликопротеина-R меняется в условиях патологии, но как, не всегда понятно. Поэтому появление работы

М.М. Градинарь на данную тему следует приветствовать, поскольку поставленные в ней вопросы существенно продвигают понимание трансклеточного обмена лекарств при лечении нейродегенеративных заболеваний, к которым относится и выбранный автором паркинсонический синдром, моделируемый введением нейротоксина ротенона. Работа М.М. Градинарь фундаментальна по сути и направлена на практическое внедрение полученных результатов. Автор поднимает целый ряд новых идей, уточняет методы их реализации, проводит анализ биохимических и фармакологических возможностей, наконец, формулирует оригинальный подход к изучению клеточной фармакокинетики нейропротекторных средств, используемых для лечения паркинсонизма.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских программ, разрабатываемых в ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, где традиционно уделяют много внимания изучению фундаментальных и прикладных аспектов биомедицинской науки, включая изучение фармакокинетических основ применения лекарственных средств, что лишний раз подтверждает востребованность научного изучения данной проблемы.

Оценка наиболее значимых результатов, полученных автором

Целью исследования диссертанта была оценка особенностей биохимических механизмов регуляции и функционирования гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере головного мозга крыс на фоне экспериментального паркинсонического синдрома и перспективу его индукции для профилактики развития токсического паркинсонизма. На основании цели сформулированы конкретные задачи исследования (их 5), касающиеся главным образом оценки экспрессии, количества, локализации, активности и механизмов регуляции белка-транспортера гликопротеина-Р в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, вызванном нейротоксином ротеноном, уточнения особенностей проницаемости гематоэнцефалического барьера, относительного количества белков межклеточных контактов и выраженности окислительного

стресса в ткани головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, отработке и валидации методики количественного определения ротенона в ткани коры больших полушарий головного мозга крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, изучения проникновения ротенона в головной мозг крыс при индукции активности гликопротеина-P, наконец, оценки перспективы индукции гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере для профилактики развития паркинсонического синдрома.

Для решения этих вопросов автор использовал большой набор современных биохимических, молекулярно-биологических, патофизиологических и фармакологических методов исследования. Постановка цели и задач работы понятны, конкретны и логичны. Примененные методы исследования, а также характер и количество полученного материала адекватны цели и задачам диссертации. Значительный объем данных, их статистическая обработка, компоновка и дизайн работы, представление и высокий уровень анализа позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными, а положения и выводы вполне обоснованными. Заключение и выводы показывают, что основные цель и задачи исследования, поставленные в работе, достигнуты.

Методология исследований была традиционной и включала использование экспериментального биохимического, молекулярно-биологического, фармакологического и статистического методов, соответствующим современным принципам проведения лабораторных и экспериментальных исследований. Все исследования проведены на сертифицированном оборудовании.

В процессе исследований диссертантом был выявлен ряд важных закономерностей и находок. Так, в работе убедительно доказано, что моделирование экспериментального паркинсонического синдрома подкожным введением ротенона в дозе 2,5 мг/кг массы вызывает индукцию экспрессии гена *mdr1a*, кодирующего гликопротеин-P, за счет активации редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, но не влияет на количество самого белка-транспортера. Уточнено, что увеличение

проникновения субстрата гликопротеина-Р фексофенадина в головной мозг животных при моделировании экспериментального паркинсонического синдрома связано с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера вследствие нарушения его структуры и развития окислительного стресса, а не с изменением количества и активности белка-транспортера. На основании своих разработок автором предложена оптимизированная и валидированная ВЭЖХ методика детекции ротенона, пригодная для его быстрого и точного количественного определения в биологических образцах. И важный в практическом отношении вывод, что индукция активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере снижает проникновение ротенона в кору больших полушарий головного мозга крыс и предупреждает развитие токсического паркинсонизма, вызванного ротеноном.

Результаты исследований репрезентативны, объемны, корректно обработаны и представлены и, безусловно, не вызывают сомнений.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Представленный большой объем экспериментальных данных (исследования выполнены на 375 крысах, у 2/3 которых моделировали экспериментальный паркинсонизм введением нейротоксина ротенона, проведением биохимического, молекулярно-биологического и фармакологического анализа с оценкой обмена дофамина и показателей перекисного окисления липидов и белков), соответствие дизайна исследования критериям доказательной медицины, комплексное биохимическое исследование разных аспектов проблемы с использованием современных методов, включая корректную статистическую обработку полученных данных, четкое представление материалов диссертации в виде рисунков, таблиц и обстоятельного описания, а также достаточный анализ позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации как вполне обоснованные.

Научная новизна

Диссертант описывает в работе оригинальные данные о функционировании белка-транспортера гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме, вызванном введением ротенона. Показано, что развитие экспериментального паркинсонизма, повышает экспрессию гена *mdr1a*, кодирующего гликопротеин-Р, но это не приводит к изменению количества данного белка-транспортера и его локализации в головном мозге крыс. Важно в научном отношении изучение механизмов регуляции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме. При этом автором 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. Автором разработана и валидирована методика количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс. Наконец, 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.

Рецензируемая работа может быть квалифицирована как доказательное обстоятельное исследование в области биохимии, патофизиологии, фундаментальной и клинической фармакологии, неврологии и медицинской науки в целом.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Теоретическое значение рецензируемой работы состоит в изучении механизмов регуляции гликопротеина-Р в головном мозге при ротеноновом паркинсонизме, заключающемся в активации редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 и повышении экспрессии гена, кодирующего

белок-транспортер. Важно отметить, что при этом количество белка гликопротеина-Р не изменяется. Автором установлено, что гликопротеин-Р не играет существенной роли в проницаемости субстратов в головной мозг через гематоэнцефалический барьер при токсическом паркинсоническом синдроме. В то же время развитие токсического паркинсонизма повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера за счет снижения уровня белков плотных межклеточных контактов ZO-1, окклюдина и E-кадгерина. Кроме того, доказано, что одним из способов защиты нейронов головного мозга от воздействия токсических веществ-субстратов гликопротеина-Р является его индукция в гематоэнцефалическом барьере. С точки зрения практической следует отметить, что диссертантом разработана методика ВЭЖХ анализа ротенона в головном мозге крыс. Она является чувствительной, селективной, точной, прецизионной и пригодна для количественного определения данного вещества в биологических образцах.

Представленные в диссертации данные следует рассматривать как новые, имеющие важное теоретическое и практическое значение для биохимии, базисной и клинической фармакологии, нейрофизиологии, неврологии.

Результаты исследований М.М. Градинарь могут быть полезны для научно-исследовательских работ, проводимых в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербургской государственном медицинском педиатрическом университете МЗ РФ, НМИЦ перспективных оригинальных фармацевтический технологий (Москва), Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ (Санкт-Петербург), учреждениях Российской академии наук, Министерства здравоохранения и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 132 страницах машинописи, иллюстрирована 15 рисунками и 17 таблицами. Построение диссертации традиционное и

соответствует ГОСТу РФ и требованиям ВАК. Диссертация включает введение (С.5-14), обзор литературы (С.15-43), главу материалов и методов исследования (С.44-63), главу результатов исследований (С.64-89), обсуждение полученных результатов (С.90-96), заключение (С.97), выводы (С.98-99), практические рекомендации (С.100), перспективы дальнейшей разработки темы (С.101), перечень сокращений (С.102-104), список использованной литературы (С.105-132). Литературный указатель содержит 236 ссылок (37 отечественных и 199 иностранных) на работы, опубликованные в основном за последние 10 лет. Диссертация написана хорошим литературным языком и легко читается.

Статистика

Полученные данные корректно обработаны с применением современных методов статистики. Используемые статистические методы позволяют адекватно оценивать полученные результаты.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 3 статьи, включенные в журналы, рекомендованные ВАК, 1 статья в журнале Web of Science, 8 работ в сборниках научно-практических конференций. Публикации в целом отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

Автореферат

Основные положения автореферата диссертации полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы.

Выводы и практические рекомендации

Диссертация содержит 5 выводов и 2 пункта практических рекомендаций. Все выводы и рекомендации обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертации. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений соискателя следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертационной работы возникли некоторые замечания и следующие вопросы, требующие дополнительного пояснения и уточнения:

1. В выводе 4 говорится об антагонизме рифампицина в отношении проникновения ротенона через гематоэнцефалический барьер. Вопрос: в какой степени этот эффект может контролироваться подавлением нейровоспаления как ответной реакции на ротенон?

2. Насколько целесообразно применение индукторов гликопротеина-Р при уже возникших симптомах паркинсонизма?

3. Просьба уточнить, почему в качестве регуляторного фактора транскрипции был оценен Nrf2? Какие еще транскрипционные факторы регулируют экспрессию гликопротеина-Р?

В целом, работа производит весьма благоприятное впечатление, как по сути, так и по оформлению.

Все приведенные вопросы и замечания не затрагивают существа работы и сформулированы в плане дискуссии.

Заключение

Диссертация Градинарь Марии Михайловны на тему «Нейропротекторная роль гликопротеина-Р и его функционирование при экспериментальном паркинсоническом синдроме», выполненная под научным руководством доктора медицинских наук доцента А.В. Щулькина и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является завершенной, самостоятельно выполненной научной квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи в области биохимии, состоящей в выявлении биохимических механизмов регуляции и функционирования гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере головного мозга при экспериментальном паркинсоническом синдроме, что имеет большое значение для биохимии, фармакологии, клинической

фармакологии, неврологии и медицинской науки в целом. Работа полностью соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (пп. 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 метабомика в норме и при патологии; 16. Механизмы развития нейрокогнитивного дефицита). Научная новизна и практическая значимость результатов исследования позволяют утверждать, что данное исследование соответствует п.9 Положения ВАК Министерства образования РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции Постановления Правительства РФ от 25.01.2024 г. № 62) о порядке присуждения ученых степеней на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Градинарь Мария Михайловна, по своей эрудиции, компетенциям, авторитету, научному и практическому опыту достойна присуждения искомой степени.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией биохимической фармакологии
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
доктор медицинских наук профессор

Петр Дмитриевич ШАБАНОВ
тел. 8-921-900-1951, e-mail: pdshabanov@mail.ru
Санкт-Петербург, 197022, ул. Акад. Павлова, 12

«*А*» марта 2025 года

Подпись профессора П.Д. Шабанова удостоверяю
Начальник УРП ФГБНУ «ИЭМ»



Л.Ю. Ижбулдина Л.Ю. Ижбулдина