

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Кучеряну Валерияна Григорьевича на диссертацию Тимошиной Юлии Анатольевны на тему: «Роль Na,K-АТФазы в поведенческих нарушениях у мышей, индуцированных убаином, марганцем и МФТП», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.24 Нейробиология

Актуальность работы. Диссертационная работа Ю.А. Тимошиной выполнена на актуальную тему нейробиологии и посвящена рассмотрению Na,K-АТФазы в качестве универсального агента, принимающего участие в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона (БП). БП – хроническое неуклонно прогрессирующее, второе по частоте встречаемости нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется массовой гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга, что приводит к резкому снижению уровня дофамина в стриатуме. На сегодняшний день не существует специфических прогностических маркеров развития и течения заболевания, а также не существует лекарственных средств, которые могли бы остановить прогрессирование заболевания или полностью его излечить. Это во многом обусловлено отсутствием понимания целостного механизма, обуславливающего развитие нейродегенеративных процессов. В последние годы возрастает интерес к роли Na,K-АТФазы и её ингибиторов — кардиотонических стероидов (КТС) — в ЦНС в норме и при развитии различных патологий, поскольку накопились данные о связи между изменением количества КТС у пациентов с рядом неврологических заболеваний и психических расстройств. Была также выявлена связь ряда неврологических заболеваний с нарушением работы Na,K-АТФазы. Более того, на различных экспериментальных моделях показано, что у Na,K-АТФазы в ЦНС существует ряд специфических функций, обусловленных

белок-белковыми взаимодействиями фермента и не связанных непосредственно с насосной функцией.

Таким образом, изучение работы Na,K-АТФазы в моделях двигательных нарушений, вызванных действием различных агентов, является актуальным направлением исследований. Всестороннее изучение функционирования данного фермента в норме и при патологии необходимо для оценки его терапевтического потенциала, что создает основу для разработки новых целевых стратегий по снижению тяжести неврологических расстройств, связанных с нарушением активности Na,K-АТФазой.

Структура работы. Работа построена по традиционному плану и содержит разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, четыре главы собственных результатов, объединенных с их обсуждением, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит 41 рисунок и 1 таблицу. Список литературы содержит 281 источник, из них 18 русскоязычных.

В главе «Введение» автор аргументирует актуальность выбранной темы исследования на основании литературных данных, формулирует цели и задачи, научную новизну исследования, теоретическую и практическую значимость работы, а также формулирует положения, выносимые на защиту, приводит сведения об апробации результатов работы.

В главе «Обзор литературы» приведена общая характеристика Na,K-АТФазы, рассмотрены механизмы действия кардиотонических стероидов как специфических ингибиторов Na,K-АТФазы, большое внимание уделено описанию неврологических заболеваний, связанных с мутациями в $\alpha 3$ -субъединице Na,K-АТФазы, и моделям на животных, воспроизводящим характерные фенотипические признаки, обсуждены данные научных статей, описывающих работу Na,K-АТФазы в моделях токсин-индуцированного паркинсонизма. Также рассмотрены механизмы марганцевой нейротоксичности и характер влияния марганца на работу Na,K-АТФазы в различных моделях манганизма на животных.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны использованные в работе методики. Глава содержит 3 раздела, в которых изложена структура проведенных экспериментов, и 4 раздела, посвященных описанию использованных методов: инвазивных манипуляций по внутрижелудочковому введению веществ, поведенческого тестирования, направленного на оценку наличия двигательных нарушений у животных, аналитических процедур, в частности определение содержания белков методами Вестерн блот и иммуногистохимии, содержания катехоламинов и ионов методами ВЭЖХ-ЭД, МС-ИСП и АЭС-ИСП. Указаны методы статистической обработки результатов. Используемые при выполнении диссертационной работы методы исследования позволили качественно на современном уровне решить поставленные задачи.

Глава «Результаты и обсуждение» включает в себя четыре раздела, материал которых отражает решение поставленных соискателем задач и соответствует сделанным выводам. В первом разделе автор приводит результаты экспериментов *in vitro* по изучению механизмов токсического действия убаина на клетки культуры нейробластомы человека SH-SY5Y. Дифференцировка клеток данной культуры по дофаминергическому типу выступает в качестве модельного объекта для изучения работы дофаминергической системы и моделирования токсин-индуцированной нейродегенерации, что объясняет выбор данной культуры. При использовании ингибиторного анализа было обнаружено, что токсическое действие убаина в наномолярных концентрациях происходит при участии протеинкиназы C и MAP/ERK-киназного пути и не связано с глутаматными и дофаминовыми рецепторами. Также проведена оценка содержания дофамина и его метаболита в клетках и культуральной среде после действия убаина.

Второй раздел посвящен описанию результатов внутрижелудочкового введения убаина мышам. Обнаружено, что как однократное введение, так и четырехкратное введение приводят к гиперлокомоции животных, сопровождающейся нарушением координации в случае 4х-кратного введения,

однако более обширной паркинсоноподобной симптоматики у животных не сформировано. Выявленные поведенческие изменения не связаны с изменением в количестве или активности Na,K-АТФазы в дофаминергических областях мозга экспериментальных животных, но происходят при участии киназ ERK1/2 и Akt.

В третьем разделе автор оценивает влияние накопления ионов марганца в мозге мышей на их двигательные функции и способность к обучению, а также участие Na,K-АТФазы в реализации наблюдаемых поведенческих изменений. Также как и в предыдущей серии экспериментов возникающее у животных нарушение координации не опосредуется снижением активности Na,K-АТФазы, не обнаруживается прямой связи между активностью и содержанием данного фермента, накоплением ионов марганца в отделах мозга и тяжестью наблюдаемых поведенческих изменений.

Четвертый раздел посвящен описанию авторской методики моделирования ранней стадии паркинсонизма на мышах с использованием нейротоксина МФТП, в которой также не было обнаружено изменений активности Na,K-АТФазы, но снижался уровень дофамина (ДА) в стриатуме и коре головного мозга. Кроме того, было показано, что хроническое введение МФТП приводило к снижению количества тирозингидроксилазы-позитивных клеток на 22% в компактной части черной субстанции и повреждению аксональных терминалей дофаминергических нейронов в стриатуме на 37%. Найденный факт подтверждает тезис о том, что нейродегенерация при болезни Паркинсона начинается с терминалей аксонов ДА-ергических нейронов.

В главе «Заключение» автор сопоставляет данные собственного исследования с большим количеством литературного материала, концентрируясь на обсуждении механизмов дисфункции Na,K-АТФазы у пациентов с мутациями в гене, кодирующем $\alpha 3$ -субъединицу.

Содержание раздела «Выводы» диссертационной работы основано на фактическом материале и соответствует задачам, поставленным диссертантом в работе. Выводы обоснованы и логичны.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Теоретическая значимость настоящего исследования состоит в сопоставлении работы Na,K-АТФазы в трех моделях двигательных нарушений, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве универсального агента в патогенезе расстройств движения. Отсутствие данных о снижении его активности или содержания, а также данные клинических исследований, указывают на важность внутриклеточных сигналов, запускаемых при участии эндогенных кардиотонических стероидов и Na,K-АТФазы, и задает направление дальнейших исследований. Полученные результаты свидетельствуют о важности регуляторного значения Na,K-АТФазы и расширяют существующие представления относительно сигнальной функции Na,K-АТФазы в ЦНС.

Достоверность полученных результатов и выводов основывается на комплексном описании влияния исследуемых соединений на поведенческом и биохимическом уровне с применением разнообразных методик. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием большого количества животных. Использованные автором методики информативны, современны и адекватны поставленным задачам. Научные положения и выводы базируются на достаточном по объему статистически обработанном материале, обоснованы, логичны и полностью соответствуют целям и задачам исследования. По результатам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы индексирования Web of Science, Scopus и RSCI, из них 5 содержат непосредственно результаты диссертационной работы, а 2 посвящены литературному обзору роли Na,K-АТФазы в работе дофаминергической системы и подходам к моделированию паркинсоноподобных состояний на грызунах и приматах.

Замечания.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Всё же возникли некоторые вопросы:

- 1) Как можно объяснить более значимое снижение уровня дофамина в сенсомоторной коре (на 52%) чем в стриатуме (34%),

найденное при моделировании продромальной формы болезни Паркинсона на животных с помощью введения низких доз нейротоксина МФТП, когда известно, что плотность ДА-ергических нейронов в черной субстанции существенно выше, чем в коре?

2) При проведении нейрохимических исследованиях методом ВЭЖХ в структурах мозга было определено уровень дофамина (ДА) и один его метаболитов-3,4-диоксифенилуксусная кислота (ДОФУК). Почему в работе не были изучены уровень двух других метаболитов ДА - гомованилиновой кислоты (ГВК) и 3-метокситирамина (3-МТ), уровень которых служит важным биомаркером для характеристики обмена дофамина в ЦНС?

3) При моделировании продромальной (безсимптомной) формы болезни Паркинсона на животных с помощью введения низких доз нейротоксина МФТП не обнаружено изменений активности Na,K-АТФазы в среднем мозге и мозжечке. Почему не исследовали уровень этого фермента в тех же структурах мозга при моделировании более выраженной (симптомной) стадии болезни Паркинсона с помощью введения МФТП в больших дозах?

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают значимости диссертационного исследования. Диссертация Тимошиной Юлии Анатольевны на тему: «Роль Na,K-АТФазы в поведенческих нарушениях у мышей, индуцированных убаином, марганцем и МФТП» отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.24 Нейробиология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, и оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой

степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Юлия Анатольевна Тимошина заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.24 Нейробиология.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук,
Главный научный сотрудник лаборатории
общей патологии нервной системы
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
Кучеряну Валериян Григорьевич

02 декабря 2025 г.

Контактные данные:

тел.: e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.00.16 – Патологическая физиология

Адрес места работы:

125315, г. Москва, ул. Балтийская д.8

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Тел.: +7-499-151-1756

E-mail: niiopp@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук Валерияна Григорьевича Кучеряну

«ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь ФГБНУ

НИИОПП к.м.н.

Е.Н. Кожевникова