

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора, академика Российской академии наук Балабана Павла Милославовича на диссертацию Митрошиной Елены Владимировны «Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Актуальность диссертационной работы

Диссертационное исследование Митрошиной Е.В. посвящено актуальной теме: раскрытию ранее неизвестных механизмов нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF при экспериментальном моделировании ишемических факторов и нейродегенеративных заболеваний. Необходимо отметить, что имеющихся в настоящее время знаний о работе нейронных сетей при гипоксически-ишемических повреждениях и развитии нейродегенеративных процессов недостаточно. Подробному и комплексному исследованию этой актуальной и значимой для биомедицины проблемы и посвящена диссертационная работа Е.В. Митрошиной.

Подавляющее большинство исследований, посвященных активации адаптационных возможностей нервной системы, выполнено с применением животных моделей гипоксии/ишемии и нейродегенеративных заболеваний, либо на уровне отдельных нейронов (например, методом патч-кламп). Для более глубокого понимания процессов, происходящих при воздействии гипоксии и развитии нейродегенерации необходимо изучение не отдельных нервных клеток, а нейронных сетей – минимальных функциональных единиц нервной системы, ответственных за процессы реконсолидации памяти и хранения информации. Нейронная сеть представляет собой единый функциональный ансамбль, способный синергично реагировать на изменения, вызванные как внешними, так и внутренними факторами. В настоящее время исследование активности

нейронной сети в интактном головном мозге является крайне сложной методической задачей. Одной из наиболее адекватных современных экспериментальных моделей для этого являются первичные диссоциированные культуры клеток различных отделов мозга. Культуры позволяют исследовать отдельные клеточные и сетевые реакции при действии как стресс-факторов так и нейропротекторов в условиях хронического эксперимента с возможностью многократной регистрации нейросетевой активности. Именно с фокусировкой на исследовании функционирования нейрон-глиальных сетей первичных культур нервных клеток в качестве модельного объекта автором проведено изучение механизмов действия BDNF и GDNF как ключевых регуляторных молекул, участвующих в поддержании жизнеспособности и активности нервных клеток при различных повреждающих воздействиях.

В работе автором раскрыта роль ряда киназ, участвующих в реализации нейротрофинами своего защитного действия, а также роль фактора HIF-1. Представленный автором комплексный анализ молекулярно-клеточных механизмов, задействованных в поддержании активности и функциональной архитектуры нейрон-глиальных сетей, является актуальным научным исследованием, результаты которого позволят приблизиться к более глубокому пониманию механизмов развития и коррекции последствий гипоксии и нейродегенерации.

Структура диссертации. Материал изложен пространно и ясно, диссертация хорошо структурирована и оформлена. Работа изложена на 296 страницах машинописного текста, имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследования, собственных результатов исследования и их обсуждения, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 70 рисунками и 13 таблицами. По объему соотношение разделов в диссертации сбалансировано. Список литературы включает 515 источников, преимущественно опубликованных в зарубежных рецензируемых научных журналах.

Во **введении** обоснована актуальность проведенного исследования, четко и логично сформулированы цель и задачи исследования, обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В **главе 1 «Обзор литературы»** приводится развернутое описание современных гипотез и известных механизмов патогенеза ишемии и болезни Альцгеймера и роли нейротрофических факторов в предотвращении их негативных эффектов. Большое внимание уделено обобщению известных фактов об особенностях функционирования нейронных сетей при данных патологических состояниях.

В **главе 2 «Материалы и методы»** описаны объекты исследования (первичные культуры клеток гиппокампа мышей линии C57BL/6, а также трансгенной линии 5xFAD, являющейся носителем мутаций, ассоциированных с семейной формой болезни Альцгеймера), методы *in vitro* моделирования гипоксии, глюкозной депривации и окислительного стресса, а также их комплекса, а также описаны методики моделирования болезни Альцгеймера (трансгенные культуры и применение β -амилоида 1-42). Приводится подробное описание современных нейробиологических методов, позволяющих исследовать активность нейронных сетей и с помощью оригинального математического анализа реконструировать нейросетевую архитектуру. Автор использует в своей работе как электрофизиологические методики (мультиэлектродные матрицы), так и методы нейроимиджинга. Также описаны молекулярно-биологические методы, используемые автором при получении аденовирусного вектора, несущего ген BDNF. Статистическая обработка данных не вызывает сомнений.

Глава 3 содержит результаты собственных исследований и анализ полученных данных. Экспериментальный материал изложен очень детально и хорошо проиллюстрирован рисунками и таблицами. Обращает на себя внимание прекрасное качество представленных репрезентативных микрофотографий, а также приведенные графы, реконструирующие архитектуру нейронных сетей в различных функциональных состояниях, что безусловно свидетельствует о высоком методическом уровне, на котором проведены исследования.

На первом этапе работы автор оценивает особенности нейропротекторного действие нейротрофических факторов BDNF и GDNF при действии как изолированных ишемических факторов, так и их комплекса, приводит данные о жизнеспособности, биоэлектрической активности и ультраструктуре первичных культур нервных клеток.

Далее автор исследует молекулярные каскады, участвующие в реализации действия нейротрофинов. Проведен ингибиторный анализ магистральных метаболических путей, активируемых рецепторами исследуемых нейротрофинов. Исследованы ранее не известные киназ-опосредованные механизмы. Относительно магистральных каскадов данные автора согласуются с имеющейся литературой – автор подтверждает, что BDNF реализует свои нейротрофические эффекты через MAPK/ERK и PI3K-сигнальных пути, а GDNF в основном посредством PI3K-сигнального пути. Важно отметить, что автором впервые выявлено, что нерецепторная киназа SRC играет роль в действии BDNF и GDNF. Также показана роль киназы IKK β в эффектах BDNF, а киназ Jak1, Jak2 и eEF2K – GDNF.

Далее автор изучает потенциальное взаимодействие двух важнейших систем, отвечающих за устойчивость клетки к гипоксическому повреждению – системы нейротрофических факторов и системы фактора HIF. Выявлено их взаимное влияние, что открывает простор для дальнейших исследований в этой области.

Во второй части работы автор фокусируется на BDNF, как наиболее интересном для автора нейропротекторном агенте. **В разделе 3.2.** приводятся результаты исследования действия вектора AAV-Syn-BDNF-EGFP, индуцирующего гиперэкспрессию целевого нейротрофина в нейронах. Автором продемонстрировано, что повышение уровня экспрессии BDNF эффективно сохраняет не только жизнеспособность клеток, но и биоэлектрическую и кальциевую активность нейрон-глиальных сетей и их функциональную архитектуру как при гипоксическом повреждении, так и в модели амилоидоза.

Особенно интересен раздел, раскрывающий роль фактора NIF-1 в адаптации нервных клеток к повреждающим условиям. Удалось не только с помощью превентивного ингибирования NIF-пролилгидроксилазы сохранить высокий уровень активности нейронных сетей, но и продемонстрировать цитопротекторное действие при использовании ингибитора NIF-пролилгидроксилазы в постгипоксическом периоде, что представляет большой интерес для развития этой перспективной области исследований с точки зрения поиска новых методов эффективной терапии инсультов.

В «**Заключении**» обобщены и концептуально представлены основные результаты работы.

Выводы логично сформулированы и полностью обоснованы полученными результатами исследования.

Все результаты, представленные в диссертационном исследовании, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии, что подтверждается опубликованными 40 статьями в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе относящихся в высокоимпактным журналам первого и второго квартилей, а также широкой апробацией результатов на тематических международных и российских конференциях. Это говорит о безусловно значительном **личном вкладе** автора в представленное исследование.

Научная новизна исследования

Представленное диссертационное исследование, несомненно, обладает научной новизной. В работе Е.В. Митрошиной впервые было продемонстрировано, что блокада киназы IKK β нивелирует нейропротекторное действие BDNF, а киназы eEf2K – GDNF, что свидетельствует о важной роли данных ферментов в реализации действия нейротрофинов. Охарактеризована роль киназы SRC в реализации эффектов, оказываемых обоими нейротрофическими факторами.

Автором впервые выполнен комплекс исследований влияния гиперэкспрессии нейротрофического фактора BDNF, индуцированной аденоассоциированным вирусным вектором, несущим ген BDNF и

флуоресцентную метку, на функциональную архитектуру нейронных сетей в норме и при моделировании патологических состояний и убедительно показано, что повышенная экспрессия BDNF значительно усиливает адаптационные возможности нервных клеток.

Митрошиной Е.В. впервые выполнено исследование активности нейрон-глиальных сетей головного мозга при моделировании β -амилоидоза как ключевого компонента болезни Альцгеймера. Кроме того, в работе получены принципиально новые данные о роли фактора HIF-1 в поддержании нейросетевой активности в постгипоксическом периоде и при нейродегенерации.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в полученных фундаментальных сведениях о роли киназ киназы eEF2K, SRC и IKK β в действии нейротрофических факторов BDNF и GDNF на жизнеспособность нервных клеток и активность нейронных сетей при гипоксическом повреждении. Также принципиально новыми являются сведения о возможности с помощью ингибирования HIF-пролилгидроксилазы активировать адаптационные возможности нервных клеток и сохранять активность нейрон-глиальных сетей. Это не только в значительной степени расширяет современные представления о механизмах нейропротекции, но и, очевидно, может служить началом новому перспективному направлению научных исследований, которое будет иметь не только фундаментальное, но и практическое значение, поскольку указывает на новые терапевтические мишени для лечения гипоксии и нейродегенерации.

Важным практическим аспектом диссертации является демонстрация эффективности применения аденоассоциированного вирусного вектора AAV-BDNF с целевыми генами для поддержания работы нейронных сетей при различных повреждающих воздействиях.

Кроме того, с практической точки зрения будут полезны и новые методы анализа нейросетевой активности, которые представлены в диссертации Е.В. Митрошиной.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации

Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования Е.В. Митрошиной, получены на впечатляющем объеме первичных нейрональных культур с использованием обширного комплекса ультрасовременных методов, адекватных поставленным задачам. В работе использованы оригинальные и интересные методы обработки данных для оценки нейросетевых эффектов, результаты грамотно статистически обработаны, достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по сути работы нет. В работе имеется ряд опечаток, грамматических и стилистических ошибок.

После прочтения текста диссертации остаются следующие вопросы, ответы на которые хотелось бы услышать на защите:

1. В работе постоянно подчеркивается, что в качестве модели используются нейроглиальные сети, однако мало обсуждается возможное избирательное влияние на глию. Было бы важно услышать мнение автора о вкладе нейронов и глии в наблюдаемые эффекты в тех случаях, когда по временному параметру (нейроны - минуты, глия - часы) можно отдельно оценить вклад нейронов и глии отдельно.

2. Исследование полностью проведено в модельных условиях. Интересно мнение автора об ограничениях перенесения результатов на целый мозг.

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают общую высокую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Рассмотрев представленные в работе материалы, можно уверенно сказать, что диссертационная работа Е.В. Митрошиной представляет собой комплексное фундаментальное исследование молекулярных механизмов действия BDNF и GDNF на нейронные сети головного мозга в норме и при патологии и вносит значительный вклад в раскрытие ключевых механизмов адаптации нервных клеток к гипоксии и нейродегенерации.

Диссертация Елены Владимировны Митрошиной на тему «Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации» является законченной научно-квалификационной работой в области биомедицины, значимость и новизна которой не вызывает сомнения. Совокупность выводов и положений, сделанных по результатам представленных в работе исследований, можно оценить как новое научное достижение в области физиологии человека и животных, биомедицины.

Представленная к защите диссертация полностью соответствует всем требованиям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (в актуальной редакции), а ее автор Митрошина Елена Владимировна достойна присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией
клеточной нейробиологии обучения
Института высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии
РАН, доктор биологических наук,
профессор, академик Российской
академии наук

Балабан П.М.

01.03.2023

Адрес: 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А

Тел. _7-495-3344151

e-mail: pmbalaban@gmail.com

Подпись *П.М. Балабана*
УДОСТОВЕРЯЮ
Зам. канц. ИВНД и НФ
Кузнецова

