

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 темы исследования

Диссертационное исследование Е.В. Митрошиной сфокусировано на изучении некоторых клеточно-молекулярных механизмов повреждения клеток нейрональной и глиальной природы при гипоксии и нейродегенерации. Актуальность этой проблематики не вызывает сомнений, коль скоро гипоксия и аккумуляция aberrантных белков в ткани признаются в настоящее время ключевыми патогенетическими механизмами широкого спектра острых и хронических заболеваний центральной нервной системы, чья медико-социальная значимость не может быть оспорена. Исследования, ставящие своей целью расшифровку таких механизмов, должны сформировать научную основу для разработки новых эффективных методов нейропротекции для предотвращения развития или прогрессирования патологии головного мозга. Кроме того, несмотря на то, что существенная часть исследований проводится с использованием *in vivo* и *in vitro* моделей ишемии и нейродегенерации, по-прежнему актуальной является разработка новых клеточных моделей и методологических подходов к оценке их функционирования при действии повреждающих факторов внешней среды. В этом контексте, применительно к ткани головного мозга, особенно важны модели, которые могут быть применены для регистрации межклеточных взаимодействий (нейрон-нейрональных, нейрон-астроглиальных и пр.) *in vitro*. Считаю важным отметить и то, что такого рода модели чрезвычайно востребованы при выполнении протоколов тестирования нейротропной активности лекарственных кандидатов. Таким образом, работа Е.В. Митрошиной выполнена по

актуальной теме и с применением современных методов, что определяет значимость ее результатов для физиологии и смежных дисциплин.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

В рамках выполнения диссертационного исследования Е.В. Митрошиной получены результаты, обладающие научной новизной. Считаю, что очевидной научной новизной обладают следующие результаты: а) установлен вклад некоторых киназ-участников сигнальной трансдукции (eEF2K, SRC, IKK β) при активации рецепторов нейротрофинов (BDNF, GDNF) в реализацию их нейропротективного эффекта; б) зарегистрированы новые механизмы взаимного влияния активности транскрипционного фактора HIF-1 и экспрессии BDNF, GDNF при повреждении клеток головного мозга; в) продемонстрированы возможности модуляции стабильности HIF-1 с помощью оригинального препарата для поддержания жизнеспособности и функциональной активности клеток нейрональной и глиальной природы; г) изучены проявления нарушений сетевой электрической и кальциевой активности нейронных сетей *in vitro*, ответственные за реализацию цитотоксического потенциала гипоксии/ишемии и аккумуляции аберрантного бета-амилоида; д) протестированы новые возможности применения генно-инженерных подходов для достижения гиперэкспрессии BDNF в клетках головного мозга, обеспечивающей нейропротективный эффект при гипоксии и нейродегенерации; е) выполнены работы по оптимизации существующих клеточных моделей гипоксического повреждения клеток головного мозга *in vitro* и моделей, базирующихся на острой, подострой или хронической экспозиции к патологическим формам бета-амилоида.

Существенный прогресс в понимании работы мультиклеточных ансамблей в ткани головного мозга достигнут автором диссертации с использованием мультиэлектродной регистрации спонтанной электрической активности нейронов и кальциевой сигнализации в культурах клеток. В частности, впервые выполнен комплекс исследований по оценке влияния гиперэкспрессии BDNF на функциональную архитектуру нейронных сетей в

норме и при моделировании патологических состояний, описаны особенности биоэлектрической и кальциевой нейросетевой активности клеток первичных культур гиппокампа.

В работе впервые убедительно показано, что подавление активности HIF-пролилгидроксилазы препятствует развитию нарушений спонтанной активности нейронной сети, индуцированных гипоксией *in vitro*. Продемонстрировано, что защитное действие модуляторов стабильности HIF-1 можно оценивать по сохранности сетевой кальциевой активности нейрон-глиальных сетей как в периоде гипоксии, так и в постгипоксическом периоде.

Интересной находкой автора следует считать то, что BDNF более эффективно сохраняет жизнеспособность нервных клеток при гипоксическом повреждении, а GDNF – при глюкозной депривации. Кроме того, охарактеризованы особенности ультраструктуры нервных клеток в постгипоксическом периоде на фоне применения нейротрофических факторов: GDNF эффективен в плане предотвращения повреждения синаптических контактов, а BDNF – митохондрий и синаптических везикул нейронов. Впервые обнаружено, что BDNF и GDNF подавляют индуцируемую гипоксией экспрессию HIF-1 при гипоксии, но стабилизация HIF-1 ингибитором HIF-пролилгидроксилазы способствует экспрессии GDNF в постгипоксическом периоде. Указанные различия в эффектах двух нейротрофических факторов впервые подтверждены в экспериментах по оценке активности разного набора протеинкиназ в клетках при действии BDNF и GDNF.

В целом, автором на основе полученных новых экспериментальных данных постулируются некоторые важные позиции, касающиеся: а) общности некоторых звеньев патогенеза ишемического повреждения головного мозга и хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа; б) особенностей реализации клеточно-молекулярных механизмов протективного эффекта нейротрофических факторов и экзогенных модуляторов HIF-1-регулируемых эффектов; в) возможности применения схожих подходов к управлению механизмами нейропroteкции при ишемии и нейродегенерации; г)

адекватности применяемых клеточных моделей в контексте тестирования нейротоксических и нейропротективных эффектов *in vitro*. Поэтому считаю, что все ключевые результаты, представленные в работе, обладают несомненной научной новизной, свидетельствуют о достижении цели и решении задач исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Основными предпосылками к тому, чтобы признать научные положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации обоснованными, являются: а) применение автором комплекса современных исследовательских подходов и протоколов, удачно взаимосвязанных и дополняющих друг друга; б) использование междисциплинарного подхода к решению поставленных задач, что относится не только к применению клеточно-биологических, молекулярно-генетических, физиологических, фармакологических методов, но и методов биофизического профиля, методов математического моделирования регистрируемых процессов; в) глубокий авторский анализ существующих представлений о механизмах реализации эффектов нейротрофических факторов, гипоксии и нейродегенерации для формирования оригинального дизайна исследования; г) скрупулезная оценка различных регистрируемых параметров и интерпретация полученных результатов с использованием принципов доказательности; д) оценка эффектов с использованием нескольких «внутренних» контрольных групп и серий для обеспечения качества получаемых данных; е) представление и обсуждение результатов на конференциях, в профильных журналах российского и международного уровней (автором опубликовано более 100 печатных работ, из них 40 статей - в ведущих периодических изданиях, рекомендуемых ВАК, в том числе индексируемых в международных базах данных, включая статьи в журналах Q1), подготовку и регистрацию РИД, что, в целом, подтверждает и существенный личный вклад автора в выполненное исследование.

На основании изложенного считаю, что в диссертации Е.В. Митрошиной представлены данные, обладающие научной новизной, обоснованностью и достоверностью.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Теоретическая ценность полученных данных для фундаментальной науки (физиология, патофизиология, клеточная биология) заключается в расшифровке механизмов действия нейротрофических факторов и реализации HIF-1-опосредованных эффектов в клетках головного мозга в физиологических условиях, а также при гипоксии/ишемии и нейродегенерации, в идентификации новых молекул-мишеней для обеспечения защиты клеток головного мозга от повреждения.

Практическая ценность диссертационного исследования для решения задач в области нейрофармакологии, трансляционной неврологии, связана с возможностью использования предлагаемых новых экспериментальных моделей и подходов при тестировании эффектов лекарств-кандидатов, при разработке новых протоколов регистрации аберрантной функциональной активности клеток нейрональной и глиальной природы, учитывающих особенности межклеточных взаимодействий.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Считаю, что результаты диссертационной работы Е.В. Митрошиной могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: а) физиология нервной системы – при изучении механизмов межклеточной коммуникации и сигнальной трансдукции в ткани головного мозга, лежащих в основе нейропластичности, в том числе при действии эндогенных нейротрофических/нейропротективных факторов; б) патофизиология нервной системы – при исследования молекулярного патогенеза повреждения головного мозга вследствие гипоксии или аккумуляции аберрантных белков;

в) фармакология – при поиске новых молекул-мишеней и лекарств-кандидатов для фармакологической коррекции ишемического повреждения головного мозга и хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа; г) экспериментальная нейробиология и нейрофизиология, трансляционные нейронауки – при разработке новых *in vitro* и *in vivo* моделей заболеваний центральной нервной системы; д) высшее профессиональное образование в области биологии и медицины. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах и академических центрах Российской Федерации.

Оценка содержания диссертации в целом. Диссертация Е.В. Митрошиной изложена на 296 страницах, состоит из введения, трех глав, общего заключения, выводов, списка литературы, приложений. Работа написана академическим языком, достаточно полно иллюстрирована рисунками и таблицами.

Во **введении** автором раскрыты актуальность работы и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная и практическая ценность работы.

Глава 1 диссертации представляет собой обзор литературы. Он достаточно подробный (вероятно, в некоторых фрагментах, избыточно объемный!), демонстрирует способность автора к критическому анализу современной литературы по проблематике работы. Автор приводит исчерпывающие сведения об известных на сегодняшний день механизмах функционирования мультиклеточных ансамблей в ткани головного мозга (нейронные и нейрон-астроглиальные сети), функциональной активности HIF-1 и механизмах действия BDNF и GDNF, клеточно-молекулярных механизмах адаптации к гипоксии/ишемии, а также о достижениях в разработке нейропротективных технологий на основе применения нейротрофических факторов или модуляторов активности HIF-1. Всего автором использовано порядка 500 актуальных работ для анализа.

В **главе 2** приводятся сведения об использованных автором материалах и методах. Считаю важным отметить, что объем экспериментального

материала (порядка 700 первичных культур клеток головного мозга мышей линий C57BL/6 и 5xFAD) достаточно для получения обоснованных и достоверных результатов. Все методы и протоколы, использованные в работе, описаны с достаточной степенью детализации. Считаю, что этот раздел работы выиграл бы от представления совокупного дизайна работы или дизайна ее отдельных разделов (*in vitro*, *in vivo*) в формате оригинального рисунка в разделе 2.2. Вместе с тем, в главе 2 присутствуют отдельные схемы, иллюстрирующие некоторые протоколы, что, несомненно, повышает наглядность представленных методических подходов.

Глава 3 диссертации посвящена описанию результатов исследования. Все результаты изложены логично, последовательно, описание результатов сопровождается достаточным количеством рисунков и таблиц. В конце каждого раздела главы автором размещено заключение по данному разделу, что позволяет не только систематизировать полученные результаты по каждому из фрагментов работы, но и оценить общую логику исследования, подтвердить обоснованность выбора методологии для следующего фрагмента диссертации.

В **Заключении** обобщаются основные результаты работы. Автор резюмирует полученные сведения о молекулярно-клеточных механизмах действия BDNF и GDNF, обсуждает их с учетом современных данных о механизмах повреждения и адаптации клеток к повреждающему действию внешних факторов, оценивает перспективы применения технологий, ориентированных на увеличение экспрессии BDNF в клетках для достижения нейропротективного эффекта.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, хорошо структурирован и информативен. Замечаний принципиального характера по автореферату нет.

В целом, работа производит хорошее целостное впечатление, однако при знакомстве с диссертацией возник ряд **замечаний и комментариев**:

1) В тексте диссертации присутствуют неудачные стилистические обороты и переводные термины (например, «бета-амилоидоз», «шаттл»,

«трехсторонний синапс», «внеклеточный потенциал действия», «эпилептические припадки», «Ca²⁺ колебания» и др.), опечатки и ошибки (например, «макро контуры», «разщепляется», «хаббы», «расстояние между электродов» и др.).

2) Рисунки, размещенные в разделе «Обзор литературы», по большей части являются не оригинальными, а заимствованными, причем некоторые из них имеют недостаточное качество – как с точки зрения графического изображения (например, рисунки 4, 9), так и по смысловому наполнению (например, в легенде к рисунку 5 указано, что IP3 действует через рианодиновые рецепторы RyR, но это некорректное утверждение, так как IP3 действует через IP3-рецепторы, а лигандом RyR является циклическая АДФ-рибоза; на рисунке 18 присутствует обозначение “cognitive and memory”, вероятно, следовало указать “cognition and memory”).

3) Рисунок 29 не имеет шкалы размеров (масштаба) или указания на увеличение микроскопа, на рисунке 32 отсутствуют подписи к его частям А, Б, В, хотя в легенде они упоминаются, на рисунке 70, которые представляются как основной резюмирующий по работе, не указано, какие новые механизмы установлены автором при выполнении данного исследования (например, какие протеинкиназы преимущественно активны при действии каждого из нейротрофинов), но присутствуют те молекулы, которые в работе никак не изучались.

Все указанные замечания не носят концептуального характера и не влияют на общее, сугубо положительное впечатление о работе.

В порядке научной дискуссии хотелось бы задать автору **следующие вопросы:**

1) Из описания методов исследования и полученных результатов осталось не понятным, как формировалась контрольная серия при трансдукции клеток AAV-BDNF-EGFP, был ли оценен уровень продукции BDNF не только иммуноцитохимически, но и количественно, например, иммуноблоттингом?

2) Почему в клетках, гиперэкспрессирующих BDNF, автор не воспользовался протоколом подавления активности соответствующих протеинкиназ, чтобы доказать присутствие выявленных им ранее (при добавлении экзогенного нейротрофического фактора) специфических механизмов сигнальной трансдукции?

3) На основании чего автор считает, что добавление глюкозоксидазы в среду, а priori лишенную глюкозы и кислорода, способно индуцировать окислительный стресс при «моделировании ишемия-подобного» состояния *in vitro* (сочетание гипоксии, глюкозной депривации и окислительного стресса)? Что в этом случае является источником глюкозы и кислорода для работы фермента, генерирующего пероксид водорода?

4) Какие, по мнению автора, существуют ограничения в клиническом применении нейротрофических факторов при церебральной ишемии или нейродегенерации?

Заключение

Диссертационная работа Митрошиной Елены Владимировны «Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствующую паспорту специальности «физиология человека и животных», в частности, п. 2 (анализ механизмов нервной и гуморальной регуляции, генетических, молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических функций), п. 6 (изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации), п. 11 (изучение молекулярной и интегративной организации физиологических функций). Диссертация Е.В. Митрошиной содержит решение актуальной научной проблемы изучения механизмов действия нейротрофических факторов в норме и при патологии, разработки современных клеточных моделей для оценки этих эффектов и новых подходов к управлению экспрессией этих молекул в клетках нейрональной природы.

Считаю, что диссертация Митрошиной Елены Владимировны по своей новизне, научной и практической ценности полученных результатов, перспективам их практического применения полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168 с изменениями от 26 мая 2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор - Митрошина Елена Владимировна - заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – «физиология человека и животных».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник и заведующий
лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии,
заведующий отделом молекулярных и клеточных механизмов
нейропластичности Института мозга
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научный центр неврологии»,
доктор медицинских наук (3.3.3 – патологическая физиология),
профессор

 Алла Борисовна Салмина

Россия, 125367, г. Москва,
Волоколамское шоссе, д.80,
Тел. +7(495)9170999;
E-mail: allasalmina@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. удостоверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Научный центр неврологии», старший научный сотрудник,
кандидат медицинских наук

 Дмитрий Владимирович Сергеев

«28 » августа * 2023 г.