

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

Плотникова Егора Юрьевича 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**

Диссертационная работа Е.В. Митрошиной направлена на решение актуальной и несомненно важной проблемы нейробиологии и биомедицины – исследованию механизмов адаптации головного мозга к воздействию различных стресс-факторов и роли эндогенных регуляторных систем головного мозга в данных процессах. В настоящее время, в России и за рубежом, отмечается постоянный рост заболеваемости различными неврологическими заболеваниями, включая ишемические и нейродегенеративные. К сожалению, эти заболевания все чаще встречаются у лиц трудоспособного возраста, что является серьезной проблемой для общества и медицины.

Гипоксия является одним из ключевых факторов, который способствует развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как ишемический инсульт или болезнь Альцгеймера. Это обуславливает необходимость поиска новых подходов, которые могут компенсировать негативные последствия гипоксии и предотвратить развитие нейродегенеративных процессов. Использование эндогенных соединений, которые обладают нейропротекторными свойствами, выглядит перспективным подходом. В частности, нейротрофические факторы и фактор HIF (фактор, индуцируемый гипоксией) могут быть использованы для защиты нервной системы от неблагоприятных воздействий и компенсации негативных последствий гипоксии.

Диссертационная работа Е.В. Митрошиной направлена на исследование молекулярных механизмов, которые позволяют нервным клеткам адаптироваться к неблагоприятным воздействиям, включая гипоксию и нейродегенерацию. Понимание этих механизмов может служить фундаментальной базой для разработки эффективных терапевтических стратегий и методов коррекции неврологических нарушений и является актуальной задачей современной науки. Число исследований в этой области постоянно увеличивается, что подтверждает важность и актуальность данной диссертационной работы.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертационная работа Митрошиной Е.В. написана грамотным литературным языком, в традиционном стиле, изложена на 289 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 69 рисунками. Список литературы включает в себя 514 источников (13 отечественных и 501 зарубежных).

Во **введении** автор дает общую характеристику работы, обосновывает ее актуальность, описывает цель и задачи исследования, характеризует научную новизну и практическую значимость работы. Приводятся положения, выносимые на защиту.

Глава 1 диссертации посвящена тщательно выполненному и достаточно исчерпывающему обзору литературы, освещющему основные достижения и проблемы исследований по тематике диссертационной работы. Обзор позволяет составить ясное и полное представление о современном состоянии проблемы, рассматриваемой в диссертации.

Представлена информация о механизмах развития ишемического повреждения и вкладе отдельных патогенетических факторов в данный процесс. Приведены имеющиеся экспериментальные данные, которые позволяют говорить о гипоксии как триггере развития болезни Альцгеймера.

Приведены сведения об особенностях функционирования нейронных сетей при данных. Отдельные разделы посвящены нейротрофическим факторам BDNF и GDNF и их роли в развитии данных заболеваний. Приводится описание известных на сегодняшний день молекулярных механизмов, активируемых фактором HIF при гипоксии и нейродегенерации.

Кроме того, в обзоре в отдельных разделах показаны мировые тенденции поиска новых эффективных методов нейропротекции, направленных на использование соединений, принадлежащих к семейству нейротрофинов и семейству факторов, индуцированных гипоксией.

Список литературы содержит более 500 ссылок, основная часть из которых датируется последними 5-10 годами.

В главе «**Материалы и методы**» подробно описаны использованные автором для достижения поставленных целей и задач методики. Следует отметить применение оригинальных математических алгоритмов для исследования сетевой активности нейронов и астроцитов, в том числе на которые получены патенты. Методы адекватны сформулированным задачам, являются современными и признанными мировым научным сообществом.

Диссертация выполнена с использованием впечатляющего по объему экспериментального материала (более 700 диссоциированных культур клеток гиппокампа). Выбор методов исследования соответствует поставленным в диссертации задачам.

В третьей главе диссертации приведены собственные **результаты исследования**.

Представлены оригинальные данные о молекулярно-клеточных механизмах, лежащих в основе антигипоксического и нейропротекторного эффектов BDNF и GDNF. Приведены данные о влиянии нейротрофинов на ультраструктуру нервных клеток при моделировании гипоксии. Охарактеризованы особенности биоэлектрической и кальциевой активности культур нервных клеток в постгипоксическом периоде на фоне применения BDNF и GDNF и показан их выраженный нейропротекторный эффект.

Исследована роль киназ, которые входят в каскады, активируемые нейротрофическими факторами, в реализацию этих эффектов. Впервые выявлено, что важную роль в них играют киназы eEF2K, SRC и IKK $\beta$ . Представлены данные, свидетельствующие о взаимосвязи нейротрофических факторов BDNF и GDNF и фактора HIF.

Опираясь на полученные данные, автор делает выбор BDNF в качестве наиболее перспективного нейропротективного агента и приводит результаты исследования влияния на функционирование нейронных сетей в норме и при моделировании гипоксии и нейродегенерации такого метода, как повышение экспрессии данного нейротрофина с помощью применения генноинженерных подходов – использовании аденоассоциированного вирусного вектора AAV-syn-BDNF-eGFP. Получены уникальные данные о функционировании нейронных сетей при моделировании амилоидозов как основного патогенетического компонента болезни Альцгеймера. Убедительно показано, что применение BDNF позволяет препятствовать разрушению нейросетевой биоэлектрической и кальциевой активности.

Отдельный раздел посвящен исследованию влияния фактора HIF на устойчивость нейронных сетей к действию повреждающих факторов. В работе использован оригинальный ингибитор фермента HIF-пролилгидроксилазы, применение которого позволяет стабилизировать комплекс HIF-1.

Работа написана грамотным языком и понятна для восприятия. В заключении приводятся основные этапы и результаты исследовательской работы. Автор предлагает схему, обобщающие известные на сегодняшний день и открытые им механизмы взаимодействия системы нейротрофических факторов и фактора HIF в норме и в гипоксических условиях, которые позволяют данным эндогенным соединениям реализовывать их защитное действие.

Выводы диссертационного исследования логически вытекают из изложенных результатов и соответствуют поставленным в работе задачам.

## **Научная новизна и значимость исследования**

Научная новизна и практическая ценность работы Митрошиной Е.В. не вызывают сомнений. В диссертации описываются особенности защитного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании различных компонентов ишемического повреждения, а также демонстрируются новые сведения о влиянии этих факторов на ультраструктуру нервных клеток при гипоксическом повреждении. Работа также содержит новые данные о нейрональных киназах, которые опосредуют нейропротекторные эффекты BDNF и GDNF, включая впервые показанную роль eEF2K, SRC и IKK $\beta$  в поддержании активности нейронных сетей. Кроме того, получены уникальные сведения о взаимодействии исследованных нейротрофических факторов и фактора HIF-1.

Диссертация также описывает впервые выполненное исследование влияния усиления экспрессии нейротрофического фактора BDNF с помощью вектора AAV-Syn-BDNF-eGFP на биоэлектрическую и кальциевую нейросетевую активность клеток первичных культур гиппокампа.

Работа Е.В. Митрошиной содержит уникальные данные о функционировании нейронных сетей при  $\beta$ -амилоидозе. Показано, что хроническое повышение концентрации BDNF как с помощью рекомбинантного белка, так и генноинженерными подходами поддерживает спонтанную нейросетевую активность и функциональную архитектуру нейронных сетей при моделировании болезни Альцгеймера и гипоксического повреждения.

Проведено исследование роли фактора HIF-1 в толерантности нейронных сетей к гипоксии и нейродегенерации. Продемонстрировано, что стабилизация комплекса HIF-1 путем ингибирования HIF-пролилгидроксилазы оригинальным ингибитором Нейроадапт сохраняет нейросетевую активность не только при превентивном воздействии, но и при применении соединения в постгипоксическом периоде, что представляется чрезвычайно перспективным для дальнейшей разработки подходов к коррекции повреждения нейронных сетей.

## **Практическая значимость работы**

Исследование Митрошиной Е.В. несомненно открывает возможности дальнейшего практического использования ключевых разработанных подходов, к коррекции нарушений нейросетевой активности клеток головного мозга при гипоксическом и ишемическом повреждении и при нейродегенеративных процессах. Можно рекомендовать в дальнейшем проведение доклинических исследований по оценке нейропротекторного действия нейротрофических факторов и ингибиторов HIF-пролилгидроксилазы.

Кроме того, многие положения диссертационного исследования могут быть использованы при обучении студентов высших учебных заведений медицинского и биологического профилей.

## **Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации**

Научное исследование, выполненное диссидентом, является законченной научной работой, в которой представлен большой объем экспериментального материала. Исследование выполнено с применением современных методов клеточной и молекулярной биологии, электрофизиологии, конфокальной микроскопии. Для обработки полученных данных были использованы корректные методы статистической обработки данных. Выводы работы логично следуют из полученных результатов и обоснованы. Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и отражают оригинальность результатов. Проведенные исследования были выполнены на мировом уровне, достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений.

**Личный вклад автора** в получение и обработку всех представленных в диссертации данных не вызывает сомнений. Все приводимые результаты, их анализ и обсуждение в явном виде присутствуют в опубликованных статьях автора с коллегами, список публикаций по тематике диссертации представлен в автореферате. Результаты исследований, представленных в диссертации Е.В.

Митрошиной, изложены в 40 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых базами данных Web of Science и Scopus. Необходимо отметить, что 16 статей опубликованы в журналах первого квартиля. Также постулаты работы были представлены на ведущих российских и зарубежных конференциях. Полученные с участием автора зарегистрированные результаты интеллектуальной деятельности подтверждают новизну и практическую значимость разработанных при выполнении работы методических подходов.

### **Замечания и вопросы по диссертационной работе**

Диссертационная работа производит благоприятное впечатление, недостатков принципиального характера не содержит. Однако, при ознакомлении с материалами диссертации возник ряд вопросов и уточняющих замечаний, требующих дополнительного пояснения:

1. Показано ли на функциональном уровне, что в исследуемых вами культурах гиппокампа образуется именно интегрированная сеть, то есть сигнал передается от клетки к клетке?
2. Насколько применение глюкозоксидазы адекватно для моделирования «полной» ишемии? Поскольку под ишемией в патофизиологии подразумевают отсутствие кислорода и субстратов дыхания, а в случае глюкозооксидазы к этому прибавляется еще и внешний источник АФК. Тогда как считается, что ишемия (или реоксигенация) сама должна запускать генерацию АФК в клетках. Кроме того, доказана ли генерация АФК глюкозооксидазой в условиях (К)ГД, когда субстраты этого фермента (глюкоза и кислород) в среде присутствуют только в следовых количествах?
3. Как вы можете объяснить, что ростовые факторы BDNF и GDNF при глюкозной депривации по отдельности защищают нейральные клетки, а при совместном применении защитный эффект, наоборот, ниже.

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической ценности работы.

## **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, которая соответствует всем критериям, установленным пунктами 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к докторским диссертациям. В диссертации на основе выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области биологии нервной системы. Автор диссертации Митрошина Елена Владимировна заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

### **Официальный оппонент**

Заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий НИИ ФХБ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова,  
д.б.н., профессор РАН



Плотников Е.Ю.

20.02.2023

### **Адрес:**

119991 г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73  
Телефон: +7-495-939-5944  
e-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru

Подпись Плотникова Е.Ю. заверяю

