

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.340.06, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 23.03.2023 г. № 6

О присуждении Митрошиной Елене Владимировне, гражданке России, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации» по специальности **1.5.5 – физиология человека и животных** принята к защите 08.12.2022 г., протокол № 21, диссертационным советом 24.2.340.06, созданным на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, приказ Минобрнауки РФ от 14 октября 2016 года № 1256/нк).

Соискатель, Митрошина Елена Владимировна, 1983 года рождения, в 2005 г. соискатель ученой степени с отличием окончил специалитет ГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по специальности биология.

Соискатель ученой степени доктора наук имеет диплом кандидата биологических наук от 01 июля 2015 серия КНД № 008834. В 2019 г. соискателю присвоено научное звание доцента (диплом серия ЗДЦ №020723 от 22 апреля 2019 г.).

В период подготовки диссертации Митрошина Е.В. работала в ННГУ им. Н. И. Лобачевского на кафедре нейротехнологий Института биологии и биомедицины в должности сначала старшего преподавателя, а с 20.09.2016 - доцента кафедры. По совместительству являлась старшим научным сотрудником лаборатории по разработке методов нейропротекции НИИ Нейронаук, в настоящее время – старшим научным сотрудником кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины.

Диссертация Митрошиной Елены Владимировны «Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации» выполнена на базе Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского, была рекомендована к защите на расширенном заседании кафедры нейротехнологий ИББМ 13 октября 2022 г.

Научный консультант – **Ведунова Мария Валерьевна** – доктор биологических наук, профессор, директор Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Официальные оппоненты:

Балабан Павел Милославович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клеточной нейробиологии обучения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва;

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник и заведующая лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии, заведующая отделом молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», г. Москва;

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

дали положительные отзывы на диссертацию.

В положительном отзыве официального оппонента д.б.н., проф., академика РАН **Балабана Павла Милославовича** отмечается, что 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. В работе автором раскрыта роль ряда киназ, участвующих в реализации нейротрофинами своего защитного действия, а также роль фактора NIF-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.

Замечания и вопросы к работе:

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

После прочтения текста диссертации остаются следующие вопросы:

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 глиии в наблюдаемые эффекты в тех случаях, когда по временному параметру (нейроны - минуты, глиия - часы) можно отдельно оценить вклад нейронов и глиии 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. 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, значимость и новизна которой не вызывает сомнения. Совокупность выводов и положений, сделанных по результатам представленных в работе исследований, можно классифицировать как новое научное достижение в области физиологии человека и животных.

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.

В положительном отзыве официального оппонента д.м.н., проф., **Салминой Аллы Борисовны** отмечается, что диссертационное исследование Е.В. Митрошиной сфокусировано на изучении некоторых клеточно-молекулярных механизмов повреждения клеток нейрональной и глиальной природы при гипоксии и нейродегенерации.

В рамках выполнения диссертационного исследования Е.В. Митрошиной получены результаты, обладающие научной новизной. Очевидной научной новизной обладают

следующие результаты: а) установлен вклад некоторых киназ-участников сигнальной трансдукции (eEF2K, SRC, IKKb) 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.

У оппонента имеется 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», «расщепляется», «хаббы», «расстояние между электродами» 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 риаудиновые 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 представляется 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 непонятным, 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 глюкозооксидазы в среду, аргинин 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?

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».

В положительном отзыве официального оппонента д.б.н., профессора РАН **Плотникова Егора Юрьевича** отмечается, что 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 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 β 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 β -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.

Вопросы и уточняющие замечания:

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 глюкозооксидазы 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 нейрональные 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.

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.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, в своем положительном отзыве, подписанном Зефириным Тимуром Львовичем, д.м.н., профессором, заведующим кафедрой охраны здоровья человека Высшей школы медицины Института фундаментальной медицины и биологии КФУ и утвержденным первым проректором –

проректором по научной детальности, профессором Таюрским Дмитрием Альбертовичем, указала, что тема диссертационного исследования Митрошиной Елены Владимировны, посвященного изучению молекулярно-клеточных механизмов нейропротекторного действия нейротрофических факторов, является, несомненно, актуальной.

Диссертация содержит новые сведения о нейрональных киназах, участвующих в реализации нейропротекторного действия BDNF и GDNF. Впервые показана роль eEF2K, SRC и IKK β в опосредованное нейротрофическими факторами BDNF и GDNF поддержании активности нейронных сетей. Получены новые данные о взаимодействии исследованных нейротрофических факторов и фактора HIF-1.

Автором исследовано влияние оверэкспрессии нейротрофического фактора BDNF, индуцированной вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP, на биоэлектрическую и кальциевую нейросетевую активность клеток первичных культур гиппокампа. В работе приводятся новые сведения о нарушениях функционирования нейрон-глиальных сетей при моделировании болезни Альцгеймера 5xFAD *in vitro*. Особый интерес представляют данные, свидетельствующие, что хроническое повышение концентрации BDNF поддерживает спонтанную нейросетевую активность и функциональную архитектуру нейронных сетей при моделировании БА и гипоксического повреждения. Также впервые исследовано влияние модуляции активности фактора HIF-1 с помощью оригинального ингибитора HIF-пролилгидроксилазы при моделировании гипоксического повреждения и β -амилоидоза.

Отмечается, что научные исследования, проведенные Митрошиной Е.В., имеют существенное значение не только для фундаментальной физиологии, но и для решения прикладных задач.

Диссертационная работа производит благоприятное впечатление, недостатков принципиального характера в содержании работы, основных положениях, выносимых на защиту, а также выводах рассматриваемой работы нет.

В отзыве есть несколько замечаний и вопросов:

1. Можете ли вы оценить, погибают ли нейроны и астроциты с одинаковой частотой при моделировании стресс-условий *in vitro*

2. Считается ли коэффициент корреляции кальциевой активности 0,4 и ниже значимым? Или значение менее 0,5 говорит о том, что связь между клетками отсутствует?

3. Сохраняются ли основные индивидуальные характеристики сети при оценке паттерна активации нейронной сети в процессе развития или моделировании стресс-факторов?

По тексту диссертационной работы выявлены единичные грамматические ошибки и

опечатки, а также некоторые стилистические неточности. Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической ценности работы.

Принимая во внимание актуальность выполненной работы, ее научную новизну, обоснованность выводов, а также их существенную фундаментальную и практическую значимость, можно заключить, что диссертационная работа Митрошиной Елены Владимировны «Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации» является самостоятельным, целостным и завершенным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне, которое полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в актуальной редакции), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – «физиология».

Соискатель имеет 137 опубликованных научных работ по теме диссертации, из них 40 статей в рецензируемых научных изданиях, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 97 тезисов в материалах конференций и 6 зарегистрированных РИД. Опубликованные работы посвящены исследованию молекулярно-клеточных механизмов реализации нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации. Опубликованные работы в полной мере отражают результаты диссертационного исследования.

Авторский вклад соискателя составляет 88%. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации Митрошиной Е.В. отсутствуют.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации.

1. **Mitroshina E.**, Savyuk M. Vedunova M. Necroptosis in CNS diseases: focus on astrocytes // *Front. Aging Neurosci.* 2022. Vol. 14. P. 1016053.

2. **Mitroshina E.**, Pakhomov A., Krivonosov M., Yarkov R., Gavrish M., Ivanchenko M., Vedunova M. Novel approaches to studying the role of astrocytes in neuronal activity in Alzheimer's disease models // *International Journal of Molecular Science.* 2022. Vol. 23, №24. P. 15928.

3. Gavrish M., Urazov M., Mishchenko T., Turubanova V., Epifanova E., Krut' V., Babaev A., Vedunova M., **Mitroshina E.** Overexpression of Brain- and Glial Cell Line-Derived

Neurotrophic Factors Is Neuroprotective in an Animal Model of Acute Hypobaric Hypoxia // International Journal of Molecular Science. 2022. Vol. 23.

4. **Mitroshina E.**, Loginova M., Yarkov R., Urazov M., Novozhilova M., Krivonosov M., Ivanchenko M., Vedunova M. Inhibition of Neuronal Necroptosis Mediated by RIPK1 Provides Neuroprotective Effects on Hypoxia and Ischemia *In Vitro* and *In Vivo* // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 23, № 2. P. 735.

5. Loginova M., Novozhilova M., Urazov M., Yarkov R., Krivonosov M., Kravchenko G., **Mitroshina E.**, Vedunova M. Effects of SRC and IKK β Kinase Inhibition in Ischemic Factors Modeling *In Vitro* and *In Vivo* // Applied Sciences. 2022. Vol. 12, № 7. P. 3469.

6. **Mitroshina E.**, Loginova M., Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Tarabykin V., Ivanchenko M., Vedunova M. Neuroprotective Effect of Kinase Inhibition in Ischemic Factor Modeling *In Vitro* // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, № 4. P. 1885.

7. **Mitroshina E.**, Savyuk M., Ponimaskin E., Vedunova M. Hypoxia-Inducible Factor (HIF) in Ischemic Stroke and Neurodegenerative Disease // Front Cell Dev Biol. 2021. Vol. 9.

8. **Mitroshina E.**, Krivonosov M., Burmistrov D., Savyuk M., Mishchenko T., Ivanchenko M., Vedunova M. Signatures of the Consolidated Response of Astrocytes to Ischemic Factors *In Vitro* // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, № 21. P. 7952.

9. **Mitroshina E.**, Yarkov R., Mishchenko T., Krut' V., Gavrish M., Epifanova E., Babaev A., Vedunova M. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Preserves the Functional Integrity of Neural Networks in the β -Amyloidopathy Model *in vitro* // Front Cell Dev Biol. 2020. Vol. 8.

10. Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Gazaryan I., Ivanchenko M., Khristichenko A., Poloznikov A., Hushpulian D., Nikulin S., Tonevitsky E., Abuzarova G., **Mitroshina E.**, Vedunova M. Neuroprotective Effect of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibition in an *In Vitro* Hypoxia Model // Antioxidants. 2020. Vol. 9, № 8. P. 662.

11. **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Loginova M., Tarabykin V., Vedunova M. Identification of Kinome Representatives with Neuroprotective Activity // Neurochemical Journal. 2020. Vol. 14, № 4. P. 394–407.

12. Mishchenko T.A., **Mitroshina E.**, Usenko A., Voronova N., Astrakhanova T., Shirokova O., Kastalskiy I., Vedunova M. Features of Neural Network Formation and Their Functions in Primary Hippocampal Cultures in the Context of Chronic TrkB Receptor System Influence // Front Physiol. 2019. Vol. 9.

13. **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Shirokova O., Astrakhanova T., Loginova M., Epifanova E., Babaev A., Tarabykin V., Vedunova M. Intracellular Neuroprotective Mechanisms in Neuron-Glial Networks Mediated by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor // Oxid Med Cell Longev. 2019. Vol. 2019. P. 1–15.

14. **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Usenko A., Epifanova E., Yarkov R., Gavrish M., Babaev A., Vedunova M. AAV-Syn-BDNF-EGFP Virus Construct Exerts Neuroprotective Action on the Hippocampal Neural Network during Hypoxia *In Vitro* // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, № 8. P. 2295.

15. Shishkina T., Mishchenko T., **Mitroshina E.**, Shirokova O., Pimashkin A., Kastalskiy I., Mukhina I., Kazantsev V., Vedunova M. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) counteracts hypoxic damage to hippocampal neural network function *in vitro* // *Brain Res*. 2018. Vol. 1678. P. 310–321.

Указанные публикации входят в перечень ВАК и международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов, все положительные. В отзывах указывается, что представляемая работа характеризуется высоким теоретическим и экспериментальным уровнем, по своей новизне и актуальности имеет большое научное и практическое значение, соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии. Отзывы получены из:

1. ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», г. Саранск, за подписью д.б.н., проф., декана факультета биотехнологии и биологии **Ревина Виктора Васильевича**, без замечаний.

2. ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет», за подписью д.б.н., проф., профессора каф. биохимии, клеточной биологии и микробиологии **Самарцева Виктора Николаевича**, без замечаний.

3. ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, за подписью д.сельхоз.н., проф., главного научного сотрудника **Ребезова Максима Борисовича**. В отзыве имеются замечания: считаю некорректным использовать представленную в автореферате информацию «также опубликовано более 100 тезисов в материалах конференций». Анализируя «список цитированной литературы» диссертации нам не удалось найти искомое число публикаций автора в материалах конференций.

4. ФГБОУ ВО «Московский государственный областной педагогический университет», за подписью д.ф.-м.н., доц., главного научного сотрудника научно-образовательной лаборатории теоретической и прикладной нанотехнологии **Чаусова Дениса Николаевича**, без замечаний.

5. ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» РАН за подписью д.б.н., проф. РАН, руководителя Центра биофотоники Гудкова Сергея Владимировича.

В отзыве имеется несколько замечаний и вопросов:

Несмотря на позитивное впечатление, в автореферате присутствует масса досадных орфографических ошибок. Так, у второго оппонента при указании регалий перепутаны падежи. Латинская фраза "*in vitro*" часто написана не курсивом. В положении №2, выносимом на защиту, есть слово "прериоде" и т.д.

Что касается сутевой части, то на мой взгляд, диссертанту следует пояснить предложение, с которого начинается раздел автореферата Научная новизна: "В представленной работе впервые исследовано нейропротекторное действие нейротрофических факторов BDNF и GDNF...". Меня смущает тот факт, что роль BDNF при ишемии была определена еще в конце прошлого века. Что диссертант имел в виду? Замечание является дискуссионным и не влияет на общую положительную оценку работы.

6. ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» за подписью д.ф.-м.н., доц., профессора кафедры системного анализа и автоматического управления **Сысоева Ильи Вячеславовича**

В отзыве имеется несколько замечаний и вопросов:

1. Что отложено по оси ординат на рис. 2Б и каков масштаб? В подписи написано, что это «интенсивности кальциевой активности», но в каких физических единицах она выражается?

2. На рис. 4А количество зрелых химических синапсов с разбросом достигает почти 120%, что очень странно. На том же рис. 4Б при гипоксии куда-то делись 0.08% синапсов (в сумме 100% не получаются).

3. На рис. 6-7 присутствуют два обозначения для значений, значимо отличных от других:

«*» и «#», но доверительный уровень, которому соответствует «#», не расшифрован.

4. На рис. 9 есть обозначение «# - различия достоверны относительно группы «Контроль, гипоксия», но соответствующих значков на самом графике нет. Достоверных различий не было обнаружено?

5. Чему соответствуют красный и зелёный цвета, выделение и невыделение жирным шрифтом в таблице 1?

6. На первом из двух рис. 20 в части Г столбик гистограммы с разбросом снова превысил 100%. Вероятно, при оценке разброса были сделаны не совсем корректные предположения о типе распределения.

Имеются также замечания по оформлению, в первую очередь непоследовательность в ряде вопросов.

7. В автореферате и диссертации список литературы дан под номерами, но ссылки в автореферате даны в формате (Автор, год). При этом списка цитируемых источников в автореферате нет вообще, а ссылки на них есть!

8. Названия журналов в списке трудов автора даны непоследовательно: один и тот же журнал дается то в сокращении, то полностью, другой то в русской версии, то в переводной.

9. В списке патентов фамилия соискательницы не выделена, а в списке статей выделена, а для патента 2 авторы перечислены дважды (наверное, чтобы никого не забыть)?

7. ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН за подписью д.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории функциональной биохимии нервной системы **Кудряшовой Ирины Владимировны**, без замечаний.

Эти незначительные замечания не снижают научной ценности работы, проделанной Митрошиной Е.В., а её автор, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их соответствием критериям требований, изложенных в пп. 22 и 24 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842: являются компетентными по заявленной в диссертации соискателя специальности, имеют профильные публикации по проблеме диссертационного исследования и способны объективно оценивать актуальность темы диссертации, а также достоверность, теоретическую значимость и научно-практическую ценность полученных в работе результатов (сведения о них размещены на официальном сайте ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»: <https://diss.unn.ru/1322>).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- **выявлены** особенности нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании изолированных факторов ишемии (гипоксии, глюкозной депривации и окислительного стресса), а также моделировании ишемия-подобных условий.

- **выявлены** новые киназ-опосредованные механизмы нейропротекторного действия нейротрофических факторов (BDNF и GDNF).

- **показано** взаимное влияние нейротрофических факторов, заключающееся в том, что экзогенное введение GDNF подавляет индуцированное гипоксией увеличение

экспрессии мРНК BDNF, а также снижает уровень экспрессии рецептора TrkB. Аппликация BDNF приводит к снижению экспрессии мРНК как BDNF, так и GDNF в постгипоксическом периоде.

- **выявлено**, что экзогенное применение нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании гипоксии приводит к снижению уровня экспрессии HIF-1 α . Ингибирование HIF-пролилгидроксилазы и стабилизация HIF-1 α при моделировании гипоксии вызывает усиление экспрессии мРНК GDNF в постгипоксическом периоде.

- **доказано**, что хроническая β -амилоидопатия приводит к значимому нарушению формирования кальциевой и биоэлектрической сетевой активности и функциональной нейросетевой архитектуры *in vitro*.

- **доказан** нейропротекторный эффект гиперэкспрессия BDNF, индуцированной AAV-Syn-BDNF-eGFP, в моделях острой гипоксии и β -амилоидопатии *in vitro*.

- **показано**, что ингибирование HIF-пролилгидроксилазы позволяет сохранять жизнеспособность нервных клеток и нейросетевую активность при моделировании гипоксии и β -амилоидоза.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- **раскрыты** новые киназ-опосредованные механизмы нейропротекторного действия нейротрофических факторов при моделировании гипоксии и нейродегенерации. Выявлена роль киназы IKK β в реализации действия BDNF, киназ eEf2K и Jak1, Jak2 в реализации действия. Охарактеризована роль киназы SRC в реализации эффектов, оказываемых обоими нейротрофическими факторами.

- **изучены** особенности функциональной нейросетевой архитектуры и реорганизации нейрон-глиальной сетевой сигнализации при моделировании гипоксического повреждения и нейродегенерации

- **раскрыты** эффекты, оказываемые усилением экспрессии нейротрофического фактора BDNF на адаптационные возможности нервных клеток *in vitro*;

- **раскрыта** нейропротекторная роль модуляции активности HIF-1 в клетках головного мозга при гипоксическом повреждении и моделировании β -амилоидоза *in vitro*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- **предложены** новые молекулы-мишени для обеспечения защиты клеток головного мозга от повреждения.

- **показана** эффективность применения аденоассоциированного вирусного вектора AAV-BDNF для поддержания работы нейронных сетей при различных повреждающих воздействиях.

- **разработан** комплекс новых экспериментальных моделей и аналитических подходов, который может использоваться при тестировании эффектов потенциальных лекарств-кандидатов на функциональную активность клеток как нейрональной, так и глиальной природы, с учетом особенностей межклеточных функциональных взаимодействий.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- **проведено** большое количество экспериментов, позволяющее оценить воспроизводимость результатов исследований, использованы стандартные методы статистического анализа, позволяющие оценить достоверность полученных результатов;

- **использовано** высокотехнологичное оборудование и надежные апробированные экспериментальные методы;

- **установлено** качественное и количественное согласие с теоретическими выводами и обоснованиями, а также с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.

Личный вклад соискателя состоит в участии в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов, а также подготовку научных статей и представление результатов на конференциях.

Диссертация является целостным, законченным научным исследованием, охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается четкой логикой и соответствующей содержанию работы структурой исследования, формулировками цели работы и выводов на основании полученных результатов. Диссертация соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие уточняющие вопросы: (1) что означает появление двойной мембраны у синаптических везикул и каковы физиологические последствия наличия двойной мембраны; (2) какова фармакокинетика белка при трансдукции клеток с помощью вирусного вектора; (3) какой может быть целевая группа для превентивного применения вирусных векторов, несущих ген нейротрофического фактора; (4) как оценивалась эффективность трансфекции клеток; (5) является ли Нейроадапт зарегистрированным препаратом или это экспериментальный препарат; (6) какими методами в клинической практике определяют содержание нейротрофических факторов в тканях; (7) можно ли использовать нейротрофические факторы в качестве заместительной терапии; (8) с чем может быть связана разная

эффективность применения BDNF и GDNF при гипоксии, глюкозной депривации и окислительном стрессе; (9) будут ли нейротрофические факторы оказывать нейропротекторный эффект не только на гиппокамп, но и на другие отделы мозга; (10) на каком этапе эволюции возникли нейротрофические факторы; (11) почему фактор HIF был выбран для усиления адаптации к острой гипоксии, хотя обычно рассматривается при хронической.

Соискатель Митрошина Е.В. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию, указав, что: (1) наличие двойной мембраны свидетельствует о нарушении формирования синаптических везикул в результате гипоксического воздействия, что ведет к нарушению экзоцитоза нейромедиатора; (2) экспрессия белка, индуцированная генноинженерным вирусным вектором, сохраняется длительное время, на протяжении нескольких месяцев и даже лет (3) потенциальной целевой группой для превентивной терапии AAV-BDNF могут являться люди с пониженным уровнем содержания нейротрофического фактора головного мозга в биологических жидкостях; (4) эффективность трансфекции оценивалась с помощью флуоресцентной микроскопии по присутствию в клетках флуоресцентного белка eGFP, также экспрессия мРНК BDNF оценивалась с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени; (5) Нейроадапт - это экспериментальное соединение; (6) содержание нейротрофических факторов определяют с помощью иммуноферментного анализа в биологических жидкостях, например в сыворотке крови и в ликворе; (7) подход с использованием нейротрофических факторов для генной терапии перспективен при нейродегенеративных заболеваниях; (8) вероятно, разная эффективность применения BDNF и GDNF при разных повреждающих воздействиях связана с активацией ими различных киназных каскадов, что было показано в исследовании; (9) нейротрофические факторы BDNF и GDNF оказывают нейропротекторное действие также и на другие отделы мозга, например на кору больших полушарий; (10) нейротрофические факторы являются очень древними белками, они существовали ещё до появления позвоночных животных. Их появление обусловлено усложнением нервной системы, необходимостью тонкой регуляции дифференцировки нервных клеток, синаптической передачи, что позволяет лучше отвечать на изменения среды; (11) фактор HIF регулирует клеточные ответы как на хроническую, так и на острую гипоксию.

На заседании 23 марта 2023 года диссертационный совет принял решение за исследование ранее неизвестных механизмов нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF при экспериментальном моделировании ишемических факторов и нейродегенеративных заболеваний, имеющее значение для

развития физиологической науки, присудить Митрошиной Елене Владимировне ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 10 докторов наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за 18, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель

диссертационного совета

Воденеев Владимир Анатольевич

Ученый секретарь

диссертационного совета

Акинчиц Елена Константиновна

23 марта 2023 года

