

## **ОТЗЫВ**

**члена диссертационного совета на диссертацию Ветрового Олега Васильевича на тему: «Долгосрочные последствия нарушения развития мозга крыс, вызванного пренатальной гипоксией», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.4 «Биохимия»**

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Диссертационная работа О.В. Ветрового посвящена изучению отдаленных последствий пренатальной гипоксии у экспериментальных животных (крыс), вызванной гипоксическим стрессом матери, а также исследованию роли индуцированного гипоксией стрессорного ответа у матери на возникновение дисфункций в глюкокортикоидной нейроэндокринной системе у потомства. Необходимо отметить, что в настоящее время имеется широкий спектр факторов, прямо или косвенно вызывающих гипоксические состояния как у матери, так и у потомства. Среди них инфекционные и метаболические расстройства (осложнённая беременность), проблемы с вынашиванием беременности, курение, злоупотребление алкоголем, токсические воздействия. Отдельную группу факторов составляют острые и хронические стрессовые состояния у матери, которые могут быть не связаны с ишемией. Все это приводит к изменениям генома, которые могут быть запрограммированы в виде эпигенетических модификаций хроматина в нейронах и глиальных клетках, а также могут выражаться в нарушении функционирования интегративных систем мозга, затрагивающих в том числе центральные звенья регуляции гипоталамо-гипофизарной оси. Понимание механизмов возникновения функциональных нарушений в геноме нейронов и глиальных клеток у потомства в результате пренатальной гипоксии и расшифровка последствий для плода стрессовых реакций матери на гипоксическое воздействие важно для ранней диагностики и своевременной

коррекции неврологических, поведенческих и эндокринных расстройств, обусловленных пренатальной гипоксией.

Актуальность предпринятого диссертационного исследования непосредственно связана со степенью разработанности изучаемой тематики. Несмотря на значительный прогресс здесь имеются много нерешенных вопросов и белых пятен, существенно сдерживающих оптимизацию подходов для снижения негативного влияния пренатальной гипоксии на исходы беременности и здоровье потомства, в том числе в отдаленной перспективе (в зрелом возрасте). Так остается невыясненным, каким образом соотносятся пренатальная гипоксия и обусловленные ею стресс-реакции у матери в плане негативного их влияния на формирование мозга в раннем онтогенезе, а также на этиопатогенез неврологических и нейроэндокринных расстройств. Не выяснена роль в этом глюкокортикоидов, которые разнонаправленно влияют на генную транскрипцию в нейронах и потому могут по-разному влиять на процессы роста и дифференцировки нейронов, нейрогенез и аксоногенез, на формирование нейрональных сетей и нейропластичность. Это исключительно важно для оценки рисков кортикостероидной терапии во время беременности для развития мозга и других систем плода. Не выяснена роль нарушений функциональной активности и интегративных взаимодействий в различных структурах мозга, в том числе в гиппокампе, возникающих в условиях пренатальной гипоксии, на формирование и дальнейшее функционирование нейроэндокринной системы ребенка, включая гипоталамо-гипофизарно-кортикальную ось. При анализе дисфункций в нейроэндокринной системе основной акцент, как правило, делается на гипоталамических структурах, что сужает круг факторов, вовлеченных в патогенез эндокринопатий. Сравнительно мало имеется информации о паттерне генов, задействованных в реализации патогенетического влияния пренатальной гипоксии и раннего стрессорного воздействия на жизнедеятельность различных клеток мозга, включая нейроны гиппокампа, мозжечка и коры, а также оледендрциты. Тем самым, накопленный в настоящее время объем знаний лишь подчеркивает

остроту и важность нерешенных проблем, и в диссертационной работе Ветрового О.В. предпринята успешная попытка решить некоторые из них.

**Обоснование цели исследования, соответствие поставленных задач научным положениям и выводам работы, используемые методы и подходы, статистическая обработка результатов**

Основываясь на всестороннем анализе проблемы, ее актуальности и востребованности как в области биохимии и молекулярной биологии, так и в области фундаментальной и практической медицины, Ветровой О.В. четко формулирует цель своего исследования, которая состоит в изучении влияния пренатальной гипоксии на некоторые аспекты функционирования мозга крыс на протяжении постнатального онтогенеза. В соответствии с планом исследований автором сформулированы шесть основных задач, которые находятся в полном соответствии с положениями, выносимыми на защиту, и сделанными на их основе выводами. Среди конкретных задач исследования: (1) изучение влияния пренатальной гипоксии на паттерн эпигенетических модификаций хроматина, возникающих в структурах мозга крыс в течение постнатального онтогенеза, (2) изучение функциональной активности индуцируемого гипоксией фактора HIF1 $\alpha$  в гиппокампе у потомства с пренатальной гипоксией, (3) исследование влияния глюкокортикоидного препарата дексаметазона на глюкокортикоидные рецепторы в гиппокампе у потомства, как модельной системы для оценки влияния на эти рецепторы стрессорного ответа матери, (4) исследование функционального статуса гипоталамо-гипофизарно-кортикальной системы у потомства, пережившего пренатальную гипоксию, (5) исследование функциональной активности глутаматергической системы у потомства с пренатальной гипоксией, (6) исследование когнитивных функций и нейрональных сетей в гиппокампе крыс, подвергнутых внутриутробно гипоксическому воздействию.

Надежность полученных результатов и сделанных на их основе выводов подтверждается широким набором современных биохимических,

молекулярно-биологических и гистохимических методов, которые были использованы автором, достаточным объемом выборок и числа независимых экспериментов, а также обработкой полученных результатов с помощью адекватных поставленным задачам методов статистического анализа.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

В результате проведенного комплекса исследований получены принципиально новые результаты. Установлено временное окно для индукции наиболее выраженных нейродегенеративных нарушений в ходе пренатальной гипоксии, которое соответствует третьей неделе гестации – периоду, когда в различных структурах развивающегося мозга с наибольшей интенсивностью протекают процессы нейрогенеза. Сформулирована гипотеза о механизмах формирования отсроченных негативных последствий пренатальной гипоксии, в основе которой не только усиление провоспалительных и проапоптотических процессов в нейронах и глиальных клетках головного мозга, но и индуцированные гипоксией изменения глюкокортикоидной регуляции в гиппокампе и других структурах мозга, что приводит к нарушению широкого спектра глюкокортикоид-зависимых клеточных процессов и дисбалансу в позднем онтогенезе всей системы надпочечниковой регуляции. Важно, что эти нарушения проявляются и реализуются на уровне генома, в основе чего лежат функциональные изменения эпигенетического кода. Автором впервые установлена ключевая роль глутаматергической системы в нейродегенерации, вызываемой пренатальной гипоксией, причем и в этом случае изменения обусловлены эпигенетической модификацией хроматина в нейронах и глиальных клетках.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

Полученные данные открывают широкие возможности для ранней диагностики и превентивной терапии неврологических, когнитивных и

нейроэндокринных заболеваний, обусловленных пренатальной гипоксией и иными негативными факторами, действующими на плод, в том числе нарушающими формирование ЦНС. Наибольшее значение имеют генетические и биохимические маркеры, которые были выявлены в ходе исследований отставленных эффектов пренатальной гипоксии и включают глюкокортикоид-зависимые гены и белки, а также компоненты и мишени глутаматергической системы, чья активность претерпевает значимые изменения в ходе гипоксии и воздействия стрессорных факторов на ранних стадиях онтогенеза.

### **Структура работы**

Диссертационная работа Ветрового О.В. изложена на 121 странице текста, включает 28 иллюстраций и 148 ссылок на использованные источники литературы. Она включает Введение, 4 главы с результатами собственных исследований, Заключение, Выводы.

### **Публикации по результатам исследований и ее апробация**

По теме диссертации опубликованы более 80 работ, в том числе 21 статья в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты докторских диссертаций и 60 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях. Результаты были представлены и обсуждены на 45 конференциях, в том числе на таких престижных профильных форумах, как ISN-ESN Meeting (2017), FENS Forum of Neuroscience (2018), ISN-ASN Meeting (2019), ECN Conference (2019), FENS Forum of Neuroscience (2020), ESN Virtual Conference (2021).

Принципиальных возражений и замечаний к представленному диссертационному исследованию не имеется. Однако в ходе ознакомления с работой возникли следующие вопросы и замечания:

## Вопросы

1. На странице 25 отмечается, что паттерн эпигенетических модификаций хроматина у животных, подвергшихся пренатальной гипоксии и повреждающей гипоксии во взрослом возрасте, является сходным, но в случае взрослых животных изменения исчезают уже к 4-му дню, а в случае пренатальной гипоксии закрепляются и сохраняются до поздних стадий онтогенеза. С чем вы это связываете, какие молекулярные механизмы за это ответственны (по данным литературы или в соответствии с вашими данными, если таковые имеются)?
2. На стр. 40 отмечается, что различия в экспрессии фактора транскрипции  $\text{NIF-1-alpha}$  в гиппокампе отмечаются только у 18-ти-месячных животных, и указывается, что повышение экспрессии этого фактора может быть вовлечено в возраст-ассоциированные нарушения энергетического метаболизма мозга. Однако, учитывая, что на более ранних стадиях онтогенеза экспрессия этого фактора не менялась, было бы логичнее предположить, что ее повышение в возрасте 18 месяцев является компенсаторной реакцией на функциональные изменения в сосудах головного мозга и на энергетический дисбаланс в нейронах и глиальных клетках (например, вследствие изменения активности АМРК), индуцированные пренатальной гипоксией. Другими словами, что здесь причина, и что следствие?
3. Вызывают вопросы уровни глюкозы на рис. 12, причем как в контрольной группе, так и в группах с пренатальной гипоксией. Не понятно, почему они существенно выше референсных значений, обычно составляющих в венозной крови 4-5 мМ для глюкозы натощак. В артериальной крови уровень глюкозы натощак обычно выше, но существенно ниже значений 11-13 мМ (речь идет о контрольной группе), представленных на рис. 12. Если это постпрандиальная глюкоза (о чем нигде не сказано), то в этом случае возможны очень существенные колебания ее уровня в крови в зависимости от пищевого поведения, времени анализа и других факторов, и в этом случае приводимые данные нельзя считать релевантными. К тому же в обсуждении делается

акцент на метаболизм гликогена в печени, то есть теоретически речь должна идти о глюкозе натощак. Необходимо разъяснение.

4. Представленное в главе 4 предположение о гиперактивации глутаматергической системы, особенно с учетом данных по снижению уровня глутамата, не выглядит убедительным, поскольку (и это справедливо отмечено самим автором в обсуждении) повышение экспрессии метаботропных глутаматных рецепторов 1-го типа является компенсаторной реакцией в ответ на снижение уровня глутамата. К тому же повышение экспрессии рецептора может быть связано с нарушенным его процессингом или с активацией процесса его даун-регуляции, причем в обоих случаях рецептор будет детектироваться иммуногистохимически. Вывод о гиперактивации рецепторной компоненты глутаматергической системы в этом случае слишком смел, тем более что изучен только один тип глутаматного рецептора.

#### **Замечания**

1. На странице 22 отмечается «снижение уровня meDNA и meH3K9», в то время как на схеме (рис. 1) и далее по тексту (стр. 23 и 24) указывается обратное, например, «пренатальная гипоксия... приводит к стабильному увеличению уровня meDNA во всех исследованных структурах мозга вне зависимости от возраста». Объясните это несоответствие. К тому же здесь и далее в других разделах необходимо указывать исследуемую область мозга, в которой обнаружены изменения, поскольку из текста это не всегда очевидно.

2. На рис. 4 (стр. 33) отсутствуют доверительные интервалы и не указана достоверность различий. На рисунках также отсутствуют сведения о планках погрешности на графиках, что они представляют – SE, SD...?

3. Говорить о предотвращении снижения уровня глюкокортикоидных рецепторов в ядре при обработке крыс метирапоном не совсем корректно, поскольку различия с группой с пренатальной гипоксией без обработки этим препаратом незначительны (рис. 15, B). Возможно, для прояснения ситуация, необходимо представить данные в другом формате и разрешении.

4. Стр. 61 и 66. Название «инозитол-3-фосфат» не верное, должно быть «инозитол-1,4,5-трифосфат», что принципиально иное.

**Заключение.** Диссертация Ветрового Олега Васильевича на тему: «Долгосрочные последствия нарушения развития мозга крыс, вызванного пренатальной гипоксией» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Ветровой Олег Васильевич полностью заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.4 «Биохимия». Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета:

Шпаков Александр Олегович

заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии,  
заместитель директора по науке, доктор биологических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской  
академии наук

E-mail: alex\_shpakov@list.ru

Александр Олегович Шпаков

«14» сентября 2022 года



Подпись руки  
удостоверяю  
зав. канцелярией  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института эволюционной  
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук

14.09.2022