

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии Российской академии наук



д.б.н., профессор РАН

А.Ю. Малышев

« 18 » ноября 2024 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук о научно-практической значимости диссертационной работы Милютиной Юлии Павловны на тему: «Молекулярные механизмы воздействия экспериментальной гипергомоцистеинемии на систему «мать-плацента-плод» и развитие мозга потомства», представленной к защите в Диссертационный совет 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность диссертационной работы.

Воздействие различных неблагоприятных воздействий на организм в период беременности (никотин, алкоголь, токсические соединения на производстве, инфекционные заболевания, гипоксия) может приводить к нарушению развития плода и вызывать стойкие отдаленные последствия в постнатальной жизни потомства. Нервная система, от состояния которой зависит развитие поведенческих и адаптивных реакций, особенно чувствительна к действию неблагоприятных факторов. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) матери относится к числу патологических факторов развития акушерских осложнений (отслойка плаценты,

преэклампсия), а также является состоянием, с которым связывают нарушения процессов развития мозга плода. При тяжелых формах ГГЦ могут наблюдаться различные дефекты нервной трубки плода, в частности ее незаращение (*spina bifida*). Гомоцистеин (ГЦ) способен оказывать свое негативное действие не только опосредованно через организм матери, нарушая функциональное состояние плаценты, но и благодаря трансплацентарному транспорту, воздействовать непосредственно на плод.

Однако данные о механизмах влияния ГГЦ во время беременности на функциональное состояние плаценты недостаточны. Отдельные разрозненные исследования, в которых отмечаются нарушения когнитивных функций в позднем постнатальном периоде развития у потомства, матери которых в период беременности имели повышенный уровень ГЦ также не позволяют оценить молекулярно-клеточный механизм патогенеза. Экспериментальные модели ГГЦ на лабораторных животных могут значительно способствовать получению знаний в этой области, так как клиническое исследование ГГЦ затруднено, в связи с необходимостью немедленной терапии для предотвращения негативных последствий для матери и плода.

При этом большинство исследований в изучении молекулярных механизмов воздействия ГГЦ выполнено либо *in vitro*, либо *in vivo*, на взрослых животных. Наиболее изученным является механизм ГЦ-индуцированного апоптоза, который связан с увеличением содержания внутриклеточного кальция, вызванного чрезмерной активацией NMDA рецепторов. Очевидно, что механизмы воздействия ГГЦ матери на развитие нервной системы плода имеют свои специфические особенности, что, однако не исключает участия в патологическом процессе активации окислительного стресса, так как известно, что ГЦ и продукты его метаболизма стимулируют образование активных форм кислорода, также иницирующих механизмы клеточной гибели. До настоящего времени, большая часть исследований проводилась на самцах. Тем не менее, в последние годы накапливается все

больше фактов, свидетельствующих о том, что выявляемые у грызунов межполовые различия в поведении и когнитивных функциях находятся под контролем определенных медиаторных систем мозга. Для самцов показана связь нарушения памяти и поражения моноаминергических систем, однако на самках такие работы не проводились. При этом, если ряд исследований влияния ГГЦ на отделы мозга, связанные с регуляцией когнитивных функций выполнено на самцах, в отношении особенностей воздействия ГГЦ на структуры гипоталамуса, связанные с центральной регуляцией репродуктивной функции, данные вообще отсутствуют.

Научная новизна диссертационного исследования.

В работе предложена и подробно описана модель ГГЦ с дозированным ежедневным пероральным введением метионина небеременным и беременным самкам крыс. Подтверждено развитие пренатальной ГГЦ (ПГГЦ). Получены новые данные по изменению обмена моноаминов в гиппокампе и структурах гипоталамуса, связанных с регуляцией репродуктивной функции, у половозрелых самок крыс как после ГГЦ во взрослом возрасте, так и после перенесенной ПГГЦ, они носят оригинальный характер и не имеют аналогов в литературе. Более выраженные изменения их содержания в гиппокампе по сравнению со структурами гипоталамуса, сопровождающиеся наблюдаемыми когнитивными дисфункциями, в отсутствие нарушения эстральных циклов, подтверждают возможность использования моноаминов в качестве универсальных биохимических индикаторов нейротоксичности также и при ГГЦ. Впервые показано, что в результате ГГЦ происходит снижение активности моноаминоксидазы (МАО) в плаценте беременных крыс, что может приводить к нарушению деградации моноаминов и их повышенному поступлению от матери к плоду. Впервые выполнено комплексное исследование влияния ГГЦ на две зоны плаценты (базальная зона и зона лабиринта) в динамике ее развития во время беременности, включающее в себя оценку содержания в них различных факторов роста, показателей окислительного стресса, активности матриксной

металлопротеиназы-2, и каспазной активности с одновременным анализом уровня экспрессии соответствующих рецепторов. Полученные результаты при сопоставлении их с полученными в исследовании данными о выраженных морфологических изменениях в плаценте, указывают на то, что ГГЦ во время беременности может приводить к недостаточному формированию плацентарной сосудистой сети, снижению транспортной функции плаценты, что может вносить дополнительный вклад в задержку и нарушение формирования мозга плода. Впервые рассмотрено влияние ГГЦ на содержание про- и зрелых форм нейротрофинов в плаценте и мозге плода, а также продемонстрировано непосредственное влияние ГГЦ на уровень нейрегулина 1 в плаценте и мозге. Получены экспериментальные доказательства того, что перенесенная ПГГЦ приводит к активации глии в гиппокампе, что сопровождается изменением ряда биохимических показателей как в гиппокампе, так и в коре, указывающих на развитие нейровоспаления в раннем постнатальном периоде, и эти изменения могут быть связаны с когнитивными расстройствами в более позднем возрасте. Установлено, что, несмотря на то, что молекулярно-клеточные механизмы непосредственного воздействия ГГЦ и перенесенной ПГГЦ принципиально различаются, обе модели приводят к нарушению различных видов памяти у половозрелых самок крыс.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Комплексное экспериментальное исследование по оценке влияния ГГЦ, вызванной введением метионина, на беременных самок крыс, их плаценту, плод, в процессе развития, далее, на потомство женского пола в раннем постнатальном периоде и уже по достижении половой зрелости, а также сравнение их с небеременными половозрелыми самками крыс, которые испытывали ГГЦ не в пренатальный, а уже непосредственно в постнатальный период, способствует пониманию различных механизмов, лежащих в основе нарушения когнитивных функций в постнатальном развитии. Так продемонстрированы изменения, возникающие в системе

«мать-плацента-плод» при ГГЦ во время беременности, что предопределяет последующее молекулярно-клеточные сдвиги и когнитивные нарушения в постнатальном периоде, что имеет важное практическое значение и указывает на необходимость контроля и коррекции уровня ГЦ не только в период прегравидарной подготовки, но и во время беременности, независимо от факта приема витаминов группы В.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность и обоснованность научных положений определяется соответствием дизайна, поставленной цели и задачам исследования, достаточным объемом проведенных исследований, числом независимых экспериментов, выбором адекватных методических подходов, статистической достоверностью полученных данных, их объективным анализом и аргументацией. Результаты исследования представлены в рецензируемых научных журналах, входящих в РИНЦ и международные базы данных (Web of Sciences, Scopus, PubMed и др.). В работу вошли исследования, выполненные при поддержке грантов РФФИ и РНФ. Результаты исследований были представлены на многочисленных международных и отечественных мероприятиях.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом.

Диссертация написана согласно современным требованиям, изложена на 318 страницах и состоит из введения, глав литературного обзора, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, который включает 765 источников, из них 755 – на английском языке. Текст иллюстрирован 10 таблицами и 67 рисунками.

Во введении автор детально определяет актуальность и необходимость исследования, формулирует цель и задачи, методологию и методы исследования, научную новизну и практическую значимость, представляет результаты апробации работы, личный вклад автора, а также положения,

выносимые на защиту, которые отражают суть диссертационного исследования.

В литературном обзоре (глава 1), представленном на 45 страницах, автор обстоятельно рассматривает область исследований, описывая современные представления о нейротоксических эффектах гипергомоцистеинемии, последствия пренатальной ГГЦ, связанные с нарушением развития плаценты и нервной системы плода и новорожденного, а также данные по влиянию материнской ГГЦ на процессы эпигенетической регуляции в мозге плода и плаценты, что может привести к изменению «фетального программирования».

Во второй главе, «Материалы и методы», представленной на 22 страницах, дано описание материала, который автор выбрал для реализации поставленной цели. Обозначенные в работе задачи решены с помощью исследования лабораторных животных в динамике двух поколений, с использованием подходящих биохимических методов исследования (ВЭЖХ, ИФА, иммуноблотинг, исследование активности ферментов), а также дополненных гистологическими и физиологическими методами. Объем изученного материала, выбранные методы исследования и статистической обработки полученных данных не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

Третья глава занимает 91 страницу и посвящена результатам собственных исследований. Автором сначала была исследована предлагаемая модель ГГЦ, определена суточная динамика изменения ГЦ после метиониновой нагрузки, как у небеременных самок крыс различного возраста, так и у беременных на различных сроках. Показано, что при введении метионина в концентрации 0,6 г/кг массы тела, уровень ГЦ существенно повышается уже через 1 час и большую часть суток животное находится в состоянии ГГЦ. Развитие ПГГЦ также подтверждено повышением уровня ГЦ в сыворотке крови плода и новорожденного, Показано, что после ПГГЦ уровень ГЦ нормализуется у потомства к 5 суткам

жизни. Кроме того, повышение уровня ГЦ установлено как в отдельных структурах мозга взрослых животных, так и в мозге плода. Изменение уровня S-аденозилметионина (SAM) и S-аденозилгомоцистеина (SAH) продемонстрировано также в плаценте. Далее, показано, что влияние ГЦ на изменение содержания моноаминов в исследованных структурах мозга имеет место именно у половозрелых самок, тогда как общее их снижение при старении является более значимым фактором, нежели ГЦ. В связи с этим, в финале дальнейшей работы потомство крыс после ПГЦ выводили из эксперимента именно в молодом половозрелом возрасте. Существенным разделом является исследование двух частей плаценты на различных сроках беременности при ГЦ. Определены как основные общие, так и характерные только для одной из двух частей плаценты молекулярные изменения, которые подкреплены данными морфологического анализа гистологических срезов, что позволило, в дальнейшем их успешно обсудить и сопоставить друг с другом. Полученные результаты позволили предположить, что индуцируемые материнской ГЦ ОС, активация апоптоза и воспалительные реакции оказывают негативное влияние на процессинг нейротрофинов в плаценте крыс, где они играют роль ростовых и, вероятно, ангиогенных факторов. Наряду с повышением уровня ГЦ в крови при пренатальной ГЦ наблюдалось изменение морфометрических показателей плода. На двадцатый день пренатального развития (E20) было зарегистрировано уменьшение массы плода и плаценты. Ряд изменений, выявленных в плаценте, были обнаружены и при анализе мозга плода. Таким образом, проведенные исследования позволили достаточно подробно оценить негативные последствия влияния ГЦ в период беременности на развитие нервной системы потомства, а также проанализировать ряд возможных механизмов ее пренатального нейротоксического эффекта, которые могут быть обусловлены непосредственным влиянием ГЦ и его метаболитов и/или явиться следствием нарушения функционального состояния плаценты. Далее, последствия перенесенной ПГЦ исследованы в мозге новорожденных

крысят, а также в коре и гиппокампе потомства на пятый и двадцатый день постнатального развития (P5 и P20). Полученные данные указывают на развитие нейровоспаления. На последнем этапе работы у половозрелого потомства после ПГЦ оценивалось содержание моноаминов в ПО и СВ-Арк гипоталамуса и гиппокампе, а также выполнено сравнение полученных изменений с моделью ГЦ на взрослых животных, выполненное на первом этапе исследования. В обеих моделях при проведении поведенческих тестов обнаружено также нарушение различных видов памяти.

Работа имеет большой раздел «Обсуждение результатов» на 74 страницах, в котором автор последовательно обстоятельно сопоставляет полученные в работе результаты как друг с другом, так и с данными мировой литературы. Итог исследования подводится в главе «Заключение», изложенной на 5 страницах, и представлено оригинальной схемой, описывающей влияние хронической ГЦ на половозрелых самок крыс и ПГЦ во время беременности на биохимические процессы в плаценте, мозге плода и потомства.

Выводы соответствуют поставленным задачам и целиком вытекают из результатов исследования.

Автореферат и 21 публикация, из которых 20 статей опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ, полностью отражают результаты исследования.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Так как результаты получены на модели фолат-независимой гипергомоцистеинемии, возможно рекомендовать контролировать уровень ГЦ в сыворотке крови при осложнениях беременности, сопряженной с различными рисками развития ГЦ и нарушения формирования нервной системы плода, подбирая условия оптимальной терапии препаратами фолиевой кислоты, исключая ее длительный и бесконтрольный прием, либо, при необходимости, иными витаминами группы В. Полученные данные могут лечь в основу выработки алгоритмов использования в клинике

нейропротекторов при осложнениях беременности, относящихся к группе риска возникновения функциональных нарушений мозга плода и новорожденного (преэклампсия и задержка внутриутробного развития). Результаты представленного диссертационного исследования вносят значительный вклад в фундаментальные знания о механизмах воздействия гипергомоцистеинемии на нервную систему взрослого организма и раскрывают молекулярные механизмы пренатального воздействия гипергомоцистеинемии на систему «мать-плацента-плод», лежащих в основе постэмбриональных последствий для развития мозга потомства и формирования когнитивных нарушений в отдаленном периоде, поэтому они могут дополнить соответствующие учебные пособия и служить теоретической основой для дальнейших исследований в этой области человеческого знания.

Вопросы и замечания

Принципиально важных замечаний нет.

Заключение

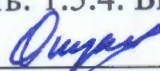
Диссертационная работа Милютиной Юлии Павловны «Молекулярные механизмы воздействия экспериментальной гипергомоцистеинемии на систему «мать-плацента-плод» и развитие мозга потомства», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема по выявлению новых молекулярных механизмов воздействия гипергомоцистеинемии во время беременности, приводящие к нарушению в функциональной системе «мать-плацента-плод» и развитию мозга потомства.

По своей актуальности, научной новизне, объему и уровню проведенных исследований, практической значимости полученных результатов диссертационная работа Милютиной Юлии Павловны соответствует всем требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от

24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. №426, от 26.09.2022 № 1690, от 25.01.2024 № 62), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а автор Милютин Юлиа Павловна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Лаборатории функциональной биохимии нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, протокол №10 от «18» ноября 2024 года.

Ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, адрес 117485 Москва, ул. Бутлерова 5А, тел.+7495-334700, сайт: <https://www.ihna.ru>

доктор биологических наук, специальность: 1.5.4. Биохимия
Онуфриев Михаил Валериевич _____ 

«18» ноября 2024 г.

Людмила М. В. Онуфриева удостоверяю.
Ученый секретарь ИВНД и ИФРАН
К. Б. М., доц. 