

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 21.2.058.07 (208.072.14)
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 14.10.2021 № 2

О присуждении Демьяненко Светлане Викторовне, гражданке Российской Федерации ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Сигнальные и эпигенетические процессы повреждения и защиты мозга после ишемического инсульта» по специальностям: 1.5.4. (03.01.04) - «Биохимия» и 14.03.03 – Патологическая физиология принята к защите 27.05.2021 г. протокол № 1 диссертационным советом 21.2.058.07 (Д208.072.14) на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (приказ № 1135/нк от 23.09.2015г.), адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

Соискатель Демьяненко Светлана Викторовна 1973 года рождения, в 1996 г. окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный университет» по специальности «Биология».

В 2003 году защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук в ГОУ ВПО «Ростовский государственный университет» на тему: «Влияние ноотропа ГВС-111 на свободнорадикальные процессы в мозге и крови крыс разного уровня тревожности» (специальность 03.00.04 – биохимия).

В настоящее время работает ведущим научным сотрудником Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

Диссертация выполнена в лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Узденский Анатолий Борисович, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета.

Официальные оппоненты:

Ярыгин Константин Никитич – доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Сурин Александр Михайлович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Гринкевич Лариса Николаевна - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции функций нейронов мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова» Российской академии наук.

Оппонентами даны положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии» Российской академии наук в своем положительном заключении, подписанным Маргулисом Борисом Александровичем – доктором биологических наук, главным научным сотрудником лаборатории защитных механизмов клетки отдела молекулярных и клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института цитологии» Российской академии наук и утвержденном Томилиным Алексеем Николаевичем - доктором биологических наук, член-корреспондентом Российской академии наук, директором Федерального

государственного бюджетного учреждения науки «Института цитологии» Российской академии наук (протокол №7 от 06.09.2021г.) отметила, что соискателем выполнен анализ экспрессии сотен сигнальных, нейрональных белков эпигенетической регуляции, участвующих в обеспечении ответа клеток мозга на ишемию, все эксперименты выполнены на моделях ишемии, основанных на принципе фотохимического повреждения клеток, две из моделей предложены автором впервые; научную новизну представляют схемы участия сигнальных и эпигенетических белков в реакции ткани коры головного мозга на ишемию и формирование ишемической толерантности; соискателю удалось определить потенциальные нейропротекторные препараты (ингибиторы выявленных белков или другие нейропротекторы, такие как белок теплового шока 70), защищающие нейроны и глиальные клетки мозга; автором показан нейропротекторный эффект ингибитора протеинкиназы LIMK2, участвующей в регуляции активности кофилина, селективных ингибиторов деацетилаз гистонов второго и шестого типа, а также экзогенного белка теплового шока 70; выводы диссертационной работы представляют несомненный интерес для трансляционной медицины и могут способствовать разработке препаратов направленного действия для так называемой «коктейльной» терапии инсульта; предложенные автором животные модели ишемического повреждения могут быть полезны при исследовании инсульта; результаты работы могут быть использованы в исследованиях лабораторий биомедицинского профиля, концептуальные схемы сигнальных и эпигенетических процессов в клетках мозга после ишемии могут быть использованы в курсах лекций по биохимии патофизиологии, неврологии, клеточной биологии и цитологии; дальнейшее исследование нейропротекторных препаратов, обозначенных в диссертационной работе, в перспективе позволят создать новые лекарственные формы для длительной терапии инсульта. Отзыв положительный, однако, содержит следующие замечания: отмечено, что диссертантом проделана огромная работа по анализу изменений ткани мозга на клеточном и молекулярном уровнях при инсульте, важно то, что автор четко разделила негативные эффекты ишемии и характеристики восстановления, однако, в обсуждении и в выводах, эти важные данные

подробно не проанализированы, и, хотя принципиальной ошибки в данном упущении нет, хочется получить комментарии автора по поводу данной части своих же результатов; имеется также небольшое количество замечаний к содержанию и оформлению работы, касающиеся качества одного из рисунков, наличия орфографических и стилистических ошибок; вышеизложенные замечания не снижают общей высокой оценки работы. В заключении отмечается, что по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа полностью отвечает требованиям п.9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 2.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г.) предъявляемым к докторским диссертациям, а соискатель, заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.4. (03.01.04) – Биохимия и 14.03.03 – Патологическая физиология.

Соискатель имеет 46 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 1 монографию, 24 научных статьи, 2 из которых опубликованы в рецензируемых профильных научных журналах, включенных в перечень ВАК, 19 статей – в зарубежных высокорейтинговых журналах, 3 – в сборниках конференций, и 21 тезисов докладов на конгрессах и конференциях, опубликованных в рецензируемых высокорейтинговых журналах. Общий объем публикаций составил 15,5 печатных листов и содержит 92% авторского вклада. Оригинальность работы согласно системе «Антиплагиат» составляет 97,1%.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Демьяненко С. В. Фототромботический инсульт. Биохимия пенумбры / Узденский А. Б., Демьяненко С. В. // Ростов-на-Дону: Изд. Южного федерального университета, 2016. – 127 с.
2. Demyanenko S.V. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex / Demyanenko S.V., Uzdenky

A.B. // Mol. Neurobiol. - 2017. - 54(9): 6839–6856. IF (Scopus) – 8,4; IF (WoS) – 4,5; Q1.

3. Demyanenko S.V. Expression of class I histone deacetylases in ipsilateral and contralateral hemispheres after the focal photothrombotic infarction in the mouse brain / Demyanenko S.V., Neginskaya M.A., Berezhnaya E.V. // Transl. Stroke Res. - 2018. - 9 (5):471-483. IF (Scopus) – 9.1; IF (WoS) – 5.78; Q1.

На автореферат поступили отзывы от:

Абрамова Андрея Юрьевича, доктора биологических наук, профессора, главы лаборатории Департамента клинической и двигательной нейронаук Института Неврологии Университетского колледжа Лондона (Великобритания). Отзыв содержит оценку актуальности работы; отмечается, что автореферат написан ясным языком и отражает основные положения диссертации, однако в нем отсутствуют данные, о нейропротекторном эффекте экзогенного препарата Hsp70 и селективных ингибиторов деацетилаз гистонов 2 и 6 типа, полученные на нейроглиальном препарате рецептора растяжения речного рака, которые представлены в опубликованных работах и диссертации.

Вербенко Валерия Николаевича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной генетики и Нарыжного Станислава Николаевича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией протеомики отделения молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Отмечается современный уровень исследований, несомненная теоретическая и практическая ценность работы; вместе с тем отмечены опечатки и неточности в терминологии, отсутствие наименований генов белков согласно HUGO Gene Nomenclature Committee, отсутствие информации о белке TP73; заданы вопросы: почему не был исследован эффект ингибитора белка Par4, уровень которого повышался в 1,5-2 раза, а также почему в работе был использован именно человеческий белок теплового шока 70, а не белок грызунов?

Бездудной Татьяны Григорьевны, кандидата биологических наук, доцента, научного сотрудника Медицинского колледжа нейробиологии и анатомии Университета Дрекселя, Филадельфия (США). В отзыве отмечена практическая значимость работы и достоверность полученных результатов; автор подтверждает их альтернативными методами исследования; однако, отмечено наличие неточностей и опечаток в тексте, отсутствие результатов обработки протеомных данных с помощью платформ для биоинформационного анализа «Cytoscape» или аналогичных.

Павлова Евгения Юрьевича, кандидата биологических наук, профессора, заведующего лабораторией митохондриальной физиологии Департамента молекулярной патобиологии Нью-Йоркского университета (США). Отзыв критических замечаний не содержит, в нем отмечен высокий методический уровень работы и её комплексный характер.

Плотникова Егора Юрьевича, доктора биологических наук, профессора Российской академии наук, заведующего лабораторией структуры и функций митохондрий Научно-исследовательского института им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Отзыв содержит оценку актуальности работы, научной новизны и практической значимости исследования, в нем отмечена высокая научная значимость полученных результатов, о чем свидетельствует высокий процент публикаций в журналах 1 и 2 квартиля.

Прасолова Владимира Сергеевича, доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук. Отзыв положительный, содержит оценку научной и практической значимости результатов работы; принципиальных замечаний нет, однако, отмечено, что отсутствует анализ взаимосвязи между изменениями экспрессии сигнальных белков и уровнем их ацетилирования, что украсило бы работу и сделало её более законченной.

Силачева Дениса Николаевича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский

исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Отзыв положительный, замечаний не содержит, отмечены научная и практическая значимость работы в области создания эффективных нейропротекторных препаратов.

Выбор официальных оппонентов обосновывается наличием у них публикаций в рецензируемых отечественных и международных журналах по тематике, представленной к защите диссертации, выбор ведущей организации – широко известными прикладными и научными достижениями в области биохимии патологических состояний клеток.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- выявлено, что фототромботический инсульт в коре мозга крыс вызывает увеличение экспрессии 77 сигнальных, нейрональных и эпигенетических белков и снижение экспрессии 80 белков в пенумбре в первые 24 часа. В пенумбре одновременно экспрессируются белки, участвующие как в нейродегенерации, так и в нейропротекции.

- установлено, что активация апоптотических процессов в пенумбре после ишемии связана с повышением экспрессии белков, которые выполняют апоптоз: каспазы 3, 6 и 7; SMAC/DIABLO; инициируют или регулируют проапоптотические пути: E2F1, p53, c-Мyc AIF и GADD153, MAP киназы p38 и JNK, DYRK1A, Par4, рецепторы NMDAR2a, p75 и GAD65/67, PSR; а также со снижением уровня шаперонов Hsp70 и Hsp90. В тоже время увеличение экспрессии антагонистов p53 - MDM2, p21/WAF-1 и p63, Bcl-x, Akt, ERK1/2, ERK5, протеинфосфатазы 1 α и MKP-1, кальмодулина и кальмодулинзависимых киназ II и IV, рецепторов EGF и эстрогена указывает на активацию антиапоптотических механизмов.

- выявлено, что перестройки цитоскелета в клетках ишемической пенумбры обусловлены увеличением экспрессии белков, входящих в комплекс p35/Cdk5, катенинов α -катенин и p120CTN, N-кадгерина, актопаксина, миозина V α и MAP-1. О разрушении актинового цитоскелета свидетельствует снижение уровня нейрофиламента 68 и O-гликированного нейрофиламента-M,

тропомиозина и спектринов, сверхэкспрессия кофилина и протеинкиназы FAK. О разрушении промежуточных волокон - снижение уровня цитокератинов 7 и 19. О дестабилизации микротрубочек снижение β -тубулина и его полиглутаминовой формы.

- показано, что после фототромботического инсульта в пенумбре нарушаются синаптические процессы. Это выражается в снижении везикулярного транспорта, на что указывает уменьшение уровня белков клатриновых пузырьков AP2 α,β,γ и адаптинов $\beta 1/2$. В подавлении синтеза дофамина в результате снижения уровня тирозингидроксилазы, декарбоксилазы L-DOPA, транспортера дофамина DAT и роста экспрессии моноаминоксидазы B. Одновременно активируются серотонинергические и ГАМК-ергические процессы, связанные с увеличением экспрессии триптофангидроксилазы и глутаматдекарбоксилазы.

- выявлено, что эпигенетические процессы играют важную роль в реакции ткани коры мозга в первые 24 часа после фототромботического инсульта. В ядрах нейронов снижается уровень ацетилирования гистона H3 по лизину 9, что связано с увеличением экспрессии гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC6. В астроцитах, напротив, ацетилирование гистона H3 по лизину 9 повышается благодаря сверхэкспрессии гистонацетилтрансфераз HAT1 и PCAF.

- установлено, что в ранний восстановительный период (3-21 день) в нейронах, несмотря на сверхэкспрессию гистондеацетилаз HDAC2 и HDAC6, повышается уровень ацетилирования гистона H4 за счет снижения уровня деацетилаз HDAC1 и SIRT1 в ядрах клеток из-за их перехода в цитоплазму.

- показано, что повышенная экспрессия HDAC2 и HDAC6 связана с развитием апоптоза клеток пенумбры.

- выявлено, что ишемическое прекондиционирование повышает экспрессию факторов транскрипции c-Myc и E2F1; регуляторных белков Par4, кальмодулин-зависимой киназы $\text{I}\alpha$; белков внутриклеточного транспорта: Ran, NTF2, β -COP, AP2 α,β и γ и клеточного цикла: циклина D1, Cdk4/6, Cdc-7, которые участвуют в формировании ишемической толерантности.

- установлено, что ингибиторы фосфорилирования кофилина T56-LIMKi, гистондеацетилаз HDAC2 - MI192 и α -фенил трополон, HDAC6 - тубастатин А и НРОВ снижают апоптоз клеток пенумбры и объем инфаркта мозга, сохраняют морфологию клеток и восстанавливают поведенческие функции мышей после фототромботического инсульта. Интраназальное введение человеческого рекомбинантного Hsp70 снижает объем инфаркта и апоптоз клеток пенумбры, способствует формированию синаптических контактов, о чем свидетельствует увеличение экспрессии синаптофизина и GAP43. Эти соединения могут являться потенциальными нейропротекторными препаратами для лечения ишемического инсульта.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

результаты проведенных исследований имеют фундаментальное значение для понимания сигнальных и эпигенетических механизмов повреждения и нейропротекции клеток мозга после ишемии; создают основу для разработки фармакологических препаратов для нейропротекции при ишемическом инсульте и поиска новых маркеров ишемического повреждения мозга. Выявлено, что в процессе фототромботического прекодиционирования участвуют регуляторные белки Par4 и САМ киназаIIa, которые можно рассматривать как потенциальные модуляторы ишемической толерантности мозга.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: результаты данной работы могут быть применены при разработке терапевтических подходов для защиты и восстановления мозга после ишемического инсульта, а также препаратов направленного действия на основе селективных ингибиторов LIM-киназы-2, HDAC2 и HDAC6, снижающих апоптоз клеток пенумбры и объем повреждения, способствуя восстановлению функций мозга после инсульта. Предложенные экспериментальные модели фототромботического инсульта с расширенной пенумброй и ишемического прекодиционирования на основе фототромбоза у крыс, будут полезны в дальнейших исследованиях нейропатологий.

Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность кафедры общей и клинической биохимии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», кафедры биохимии и микробиологии Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», на факультете «Биоинженерия и ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет» и в научно-исследовательскую деятельность «Студенческой научно-исследовательской лаборатории новых биопрепаратов» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет».

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- высокую степень достоверности результатов, которая достигалась благодаря использованию сертифицированного научного оборудования и реагентов, а также верификацией полученных результатов альтернативными методами; результаты, приведенные соискателем, получены с использованием комплекса современных и широко применяемых биохимических, иммуногистохимических, морфологических, биофизических и физиологических методов исследования; выводы аргументированы, научно обоснованы и являются прямым следствием результатов проведенных автором исследований.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии на всех этапах проведения исследования, получении и обработке экспериментальных данных, статистической обработке полученных данных и теоретическом обобщении полученных результатов. Основные результаты диссертационной работы представлены лично автором в форме устных докладов на 7-ми российских конференциях с международным участием и 2-х международных конференциях, организованных Европейской и Всемирной организациями по инсульту.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью

соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г.), в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные результаты диссертации.

На заседании 14 октября 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Демьяненко Светлане Викторовне ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 27 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.4. (03.01.04) – Биохимия (биологические науки) и 5 докторов наук по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки), участвовавших в заседании, из 37 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 27, против присуждения ученой степени – нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного
совета, доктор биологических наук,
профессор

Д.А. Кузнецов

Учёный секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук,
профессор

А.А.Кягова

15.10.2021г.