

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 21.2.058.07 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 КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 23.03.2023 № 9

О присуждении Дзрян Валентине Александровне, гражданке Российской Федерации ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация на тему: «Ацетилирование и деацетилирование факторов транскрипции p53 и E2F1 клеток периферической нервной системы после аксотомии», по специальности 1.5.4. - «Биохимия» принята к защите 08.12.2022 г., протокол № 9 диссертационным советом 21.2.058.07 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.), почтовый адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

Соискатель Дзрян Валентина Александровна 1993 года рождения, окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет» по направлению подготовки 06.04.01 Биология. В период с 2016 по 2020 гг. обучалась в очной аспирантуре того же учреждения по направлению подготовки 06.06.01. (1.5.) «Биологические науки» и специальности 03.01.04. (1.5.4.) «Биохимия». С 2021 г. по настоящее время работает научным сотрудником лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

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

Научный руководитель:

Демьяненко Светлана Викторовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

Официальные оппоненты:

Плотников Егор Юрьевич – доктор биологических наук, профессор РАН», заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий отдела функциональной биохимии биополимеров Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Семина Екатерина Владимировна – доктор биологических наук, заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Оппонентами даны положительные отзывы на диссертацию.

Но, отзывы содержат замечания, которые носят чисто технический характер и не влияют на научную ценность диссертационной работы.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук» (ИБХ РАН), в своем положительном заключении, утвержденным Габитовым Александром Габитовичем – доктором химических наук, академиком РАН, директором федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН) и подписанном Биланом Дмитрием Сергеевичем – кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником, руководителем группы метаболических основ патологии Отдела метаболизма и редокс-биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН) (протокол №1 от 01.03.2023г.) отметила, что соискатель проводил исследование экспрессии и внутриклеточной локализации факторов транскрипции p53 и E2F1, а также белков, участвующих в эпигенетической регуляции на объектах с разным уровнем организации, что является преимуществом данной работы. Используемый соискателем подход позволяет получить сравнительные данные, которые выявляют фундаментальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов, так как молекулярно – клеточные реакции на нейротравму имеют общие черты у разных видов. На основе полученных данных соискателю удалось определить потенциальные нейропротекторные препараты, защищающие нейроны и глиальные клетки спинномозговых ганглиев крыс, показан нейропротекторный эффект неселективного ингибитора деацетилаз гистонов первого класса вальпроата натрия и селективного ингибитора фактора транскрипции E2F1. Представленные в работе данные представляют несомненный интерес для трансляционной медицины и могут способствовать разработке препаратов направленного действия для, так называемой, «коктейльной» терапии нейротравм. Результаты диссертационной работы Дзрян В.А. могут быть использованы в исследованиях лабораторий биомедицинского профиля. Концептуальные схемы сигнальных и эпигенетических процессов в клетках периферической нервной системы после повреждения (аксотомии) 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 нейротравм.

Отзыв положительный, содержит незначительные замечания, связанные с оформлением работы (наличие ряда опечаток, стилистических ошибок и англицизмов), которые не снижают научную и практическую значимость работы и общую положительную оценку диссертации. Отзыв содержит ряд вопросов, на которые диссертант дал развернутые ответы.

В заключении отмечается, что по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Дзрян В.А. полностью отвечает требованиям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п.9 «Положение 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., №426 от 20.03.2021 г.), а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается наличием у них публикаций в рецензируемых отечественных и международных журналах по тематике, представленной к защите диссертации.

Соискатель имеет 40 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 27 публикаций в рецензируемых профильных научных журналах, входящих в международные базы Web of Science и Scopus, из которых 13 – статьи, 12 из которых опубликованы в журналах первых двух квартилей, 14 – тезисы докладов в научных журналах, и 13 – публикации в сборниках материалов научных конференций и конгрессов.

Общий объем публикаций составил 14,06 печатных листа и содержит 86% авторского вклада.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Dzreyan V.A.** E2F1 Expression and Apoptosis Initiation in Crayfish and Rat Peripheral Neurons and Glial Cells after Axonal Injury / V.A.Dzreyan, M.A.Eid, S.V.Rodkin, M.A.Pitinova, S.V.Demyanenko // International journal of molecular science. – 2022. – V. 23(8), № 4451. – P. 1–22 [Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59]
2. **Dzreyan V.A.** HDAC1 Expression, Histone Deacetylation, and Protective Role of Sodium Valproate in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection / V.A.Dzreyan, S.V.Rodkin, M.A.Pitinova, A.B.Uzdensky // Molecular neurobiology. – 2021. – V. 58, № 1. – P. 217-228 [Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59]
3. **Dzreyan V.A.** The Expression of E2F1, p53, and Caspase 3 in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection / V.A.Dzreyan, S.V.Rodkin, V.V.Nikul, M.A.Pitinova, A.B.Uzdensky // Journal of molecular neuroscience. – 2021. – V. 71(4). – P. 826-835 [Wos, Scopus, Q – 2, IF:3,10]

На автореферат поступили отзывы от:

Сорокиной Елены Геннадьевны, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника Лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России).

В отзыве отмечено, что научно-практическая ценность исследования заключается в том, что автором впервые удалось выявить два основных фактора транскрипции p53 и E2F1, которые подвергаются посттрансляционному ацетилированию в клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в ранний период после аксотомии, что в значительной степени определяет судьбу клетки. В работе выявлены сайты ацетилирования, клеточная и внутриклеточная локализация ацетилированных белков и определены изоформы ферментов деацетилирующих p53 и E2F1. Дзреян В.А. удалось оценить влияние ацетилирования на внутриклеточную локализацию p53 и E2F1 и апоптоз клеток аксотомированных ганглиев беспозвоночных и

млекопитающих. Полученные соискателем данные позволят по-новому взглянуть на функции деацетилаз гистонов, которые могут быть более обширными, чем регуляция транскрипции.

Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Кириченко Евгении Юрьевны, доктора биологических наук, заведующего кафедрой биоинженерия факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Донской государственный технический университет».

В отзыве отмечено, что диссертация Дзряян В.А. является важной и актуальной. Соискателем были сформулированы конкретные задачи, которые с применением флуоресцентной микроскопии, протеомных методов, ряда биохимических и молекулярных методов были успешно решены в процессе выполнения диссертационной работы. Прделана огромная работа по выявлению, осмыслению и интерпретации значительного объема экспериментального материала. Достоверность результатов не вызывает сомнений, поскольку практически все они подтверждены альтернативными методами исследования, выводы являются обоснованными.

Отзыв положительный, но отмечены многочисленные неточности и опечатки, отсутствие результатов обработки протеомных данных с помощью платформы для биоинформационного анализа типа «Cytoscape» или аналогичного, замечания не являются критическими и не снижают ценности работы.

Добаевой Натальи Михайловны, кандидат химических наук, доцента, заведующего кафедрой общей и клинической биохимии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России).

В отзыве отмечается современный уровень исследований автора, сочетающий протеомные методы исследования, иммунофлуоресцентную

микроскопию, иммуноблоттинг, коиммунопреципитацию, изучение апоптоза, анализ активности белков, анализ близкого лигирования. Для выполнения поставленных задач автором была использована одна из важных и популярных экспериментальных моделей нейротравмы - перерезка седалищного нерва на бедре у грызунов, которая ведет к хроматолизу, Валлеровой дегенерации и апоптозу нейронов и глии. Отмечается преимущество работы, которое заключается в моделировании нейротравмы (аксотомии) на экспериментальных объектах с разным уровнем организации: ганглиях брюшной нервной цепочки (БНЦ) речного рака и ганглиях корешков спинного мозга (DRG, dorsal root ganglia) крысы. Проведение экспериментов сразу нескольких экспериментальных моделей, как на позвоночных, так и на беспозвоночных животных с разным уровнем организации позволяет получить сравнительные данные, а полученные знания смогут послужить теоретической базы, что поможет лучше понять фундаментальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов.

Отзыв положительный, но содержит замечания, которые не являются критическими, и касаются орфографических ошибок, неточностей текста и небрежностей в его оформлении.

Михайловой Марии Михайловны, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Биосовместимых матриц и тканевой инженерии» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

В отзыве отмечен высокий методический уровень работы и использование автором ряда современных научных методов, включая ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинг и др. Полученные результаты грамотно проанализированы, их достоверность не вызывает сомнений, позволяют по-новому взглянуть на функции деацетилаз гистонов, а также могут лечь в основу теоретической базы, используемой в дальнейшем для разработки новых ингибиторов HDACs в качестве потенциальных нейропротекторов.

Отзыв положительный, но содержит замечания, касающиеся многословности в формулировке положений, выносимых на защиту, неясности

в описании способа проведения подготовки ткани к иммуноокрашиванию, также ряд вопросов, на которые диссертант дал развернутые ответы. Высказанные замечания и вопросы не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- показано, что выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдаются уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков повышается, а 31 белка – снижается. Через 3 часа наблюдается повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков снижаются. При этом, в аксотомированных ганглиях одновременно экспрессируются белки, участвующие как в нейродегенерации, среди которых изучаемые нами белки HDAC1, HDAC2, p53, E2F1, каспаза 3, а также ряд других белков (Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF и другие), так и в нейропротекции (Bcl-x, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов).

- установлено, что в аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наиболее ранние и специфичные изменения наблюдаются со стороны гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, экспрессия которых увеличивается уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах ганглиев повышается через 4 часа, а проапоптотических белков p53, активированной каспазы 3 – через 24 часа. Уровень ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) снижаются в цитоплазме нейронов ганглиев через 24 часа после аксотомии.

- выявлено, что нейротравма вызывает транслокацию HDAC1, факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после аксотомии и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после повреждения.

- показано, что аксотомия седалищного нерва ассоциирована с повышением экспрессии и активности HDAC1 в аксотомированных ганглиях

крыс, что приводит к снижению ацетилированного p53 (K373) и ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазме нейронов.

– установлено, что введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и увеличивает уровень ацетилирования p53 и E2F1 по K373 и K120, соответственно в нейронах ганглиев, защищая их клетки от апоптоза.

– выявлено, что ингибирование активности E2F1 оказывает выраженное нейропротекторное действие: полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию белков p53 и активной каспазы 3, защищая аксотомизированные ганглии от апоптоза.

Теоретическая и практическая значимость исследования обоснована тем, что:

проведенные исследования позволили выявить два основных фактора транскрипции p53 и E2F1, которые подвергаются посттрансляционному ацетилированию в клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в ранний период после аксотомии, что в значительной степени определяет судьбу клетки. В работе показана клеточная и внутриклеточная локализация ацетилированных белков и определены изоформы ферментов деацетилирующих p53 и E2F1. Удалось оценить влияние ацетилирования на внутриклеточную локализацию и апоптоз клеток аксотомизированных ганглиев беспозвоночных и млекопитающих. Сфокусированность проекта на механизмах ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков, позволила по-новому взглянуть на функции гистонацетилтрансфераз и деацетилаз гистонов, которые оказались более обширными, чем регуляция транскрипции.

Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность кафедры биохимии и микробиологии и в научно-исследовательскую деятельность лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ФГАОУ ВО Южного федерального университета, а также в учебный процесс кафедры биоинженерии факультета «Биоинженерия и

ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет». Результаты научных исследований вошли в отчеты по грантам Минобрнауки России № 6.6324.2017/8.9 и №6.4851.2017/6.7.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: количественную и качественную сопоставимость результатов, полученных автором в ходе исследования, с результатами последних публикаций других авторов, выполненных по схожей тематике; результаты, приведенные соискателем, получены с использованием современных и широко применяемых биохимических методов исследования и подходов молекулярной биологии; выводы аргументированы, научно обоснованы и являются прямым следствием результатов проведенных автором исследований. Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Оригинальность работы согласно системе «Антиплагиат» составляет 96,09 %.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах проведения исследования, получении и обработке экспериментальных данных, статистической обработке полученных данных и теоретическом обобщении полученных результатов.

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., №426 от 20.03.2021 г.), в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные результаты диссертации, в диссертации отсутствует заимствованный материал без ссылки на автора и (или) источник заимствования.

На заседании 23 марта 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Дзрян Валентине Александровне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.4. – Биохимия (биологические науки), участвовавших в заседании, из 29 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 20, против присуждения ученой степени – 1, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Кузнецов Д.А.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Кягова А.А.

24.03.2023 г.

