

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Семиной Екатерины Владимировны о диссертации Дзрян Валентины Александровны «АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ p53 И E2F1 КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ АКСОТОМИИ», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы выполненной работы

Нейротравмы относятся к числу социально значимых заболеваний человека и являются одной из актуальнейших проблем здравоохранения во всем мире, но, несмотря на активный поиск нейропротекторов, способных повысить выживаемость нейронов после травмы, прогресса пока не достигнуто. Одним из травматических факторов для нейрона, определяющих его гибель, является аксотомия - перерезка периферических аксонов. Сигналы о повреждении аксона (Ca^{2+} , ряд регуляторных белков) ретроградно передаются к телу и ядру нейрона, что стимулирует экспрессию генов, синтез необходимых белков и их обратный транспорт к поврежденному участку. Далее происходят восстановительные процессы: подготовка к регенерации цитоплазматической мембраны, органелл и цитоскелета, регенерация нерва, установление контактов с клеткой-мишенью и восстановление нервных связей. Но при сильном повреждении, таком как аксотомия, этих мер может оказаться недостаточно и происходит необратимая дегенерация нейрона. Процессы гибели и выживаемости нейронов контролируются определенными сигнальными процессами и факторами транскрипции: так, белки p53 и E2F1 оказывают проапоптотическое действие; патологические воздействия, в т. ч. нейротравмы, снижают ацетилирование гистонов и негистоновых белков. Вероятно, это происходит в результате активации гистондеацетилаз (HDACs), что нарушает белковый синтез, однако, вовлеченность эпигенетических процессов с участием гистондеацетилаз и

гистонацетилтрансфераз (НАТ), включая процессы деацетилирования негистоновых белков в регуляцию гибели и выживаемости нейронов в ранние сроки после травмы, до сих пор остается мало изученной. Необходимы более глубокие исследования сигнальных и эпигенетических механизмов, регулирующих процессы нейродегенерации и нейропротекции для снижения доли отмирающих нейронов и поиска средств неотложной нейропротекции при повреждении нервов. В связи с чем являются крайне востребованными исследования, направленные на изучение спектра процессов, происходящих в повреждённых нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы, с целью поиска путей снижения или ограничения необратимых последствий нейротравмы.

Диссертационная работа Дзрян Валентины Александровны посвящена изучению процессов посттрансляционного ацетилирования и деацетилирования факторов транскрипции p53 и E2F1 в нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы после аксотомии. Выполненная Валентиной Александровной работа позволила установить прямое взаимодействие HDAC и НАТ с негистоновыми белками, идентифицировать в каких клетках – нейронах или глии, а также в каких компартментах клеток и в какой период после травмы происходит ацетилирование/деацетилирование регуляторных белков, как это влияет на апоптоз и регенерацию, а также насколько эволюционно древним является данный механизм регуляции активности белков. Проведенные исследования дают яркое представление об объеме будущих исследований молекулярно-клеточных механизмов повреждения при нейротравме и терапии ее последствий. Поэтому диссертационное исследование В.А. Дзрян является не только весьма актуальным, но и, несомненно, обладает научной новизной.

Структура диссертации и автореферата

Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста, состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей Материалы и методы исследования, Результаты исследований,

состоящих из трех глав, Обсуждения результатов, Заключение и Выводов. Завершает текст диссертации Список использованных источников (189 публикации, из которых 1 в отечественном источнике). Иллюстративный материал включает 37 рисунков и 3 таблицы. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы и дает о ней адекватное представление. Текст автореферата написан ясным языком и хорошо иллюстрирован.

Во **Введении** обоснована актуальность исследования, формулируется цель и задачи работы, новизна и научно-практическая ценность полученных результатов. Представлены положения, выносимые на защиту.

В **Обзоре литературы** анализ публикаций выполнен довольно полно, логично и удачно иллюстрирован. Здесь стоит отметить, Обзор литературы приведен не только в Главе 1. Разнообразие использованных диссертантом методических подходов и обилие фактического материала вынуждает автора регулярно перемещать часть анализа литературы в раздел Обсуждения результатов. В Обзоре представлены необходимые сведения о молекулярных и эпигенетических механизмах аксотомии, а также подробно описаны экспериментальные модели нейротравм, их достоинства и недостатки. Обзор позволяет взглянуть комплексно на проблему нейротравм с позиции процессов, происходящих в максимально ранние сроки после повреждения, и таких сведений в научной литературе встречается крайне мало. В целом, Обзор литературы оставляет впечатление качественно написанной монографии и может быть использован как методическое пособие для студентов медико-биологических факультетов и смежных специалистов.

Глава **Материалы и Методы исследования** детально описывает используемые в работе реактивы и методы исследований, что дает возможность не только воспроизвести проводимые автором эксперименты, но и позволяет сделать обоснованный вывод о непосредственном участии самого автора в их постановке и проведении. Глава Материалы и Методы исследования включает следующие подразделы: (1) эксперименты на

животных с описанием процедуры аксотомии ганглиев брюшной нервной цепочки (БНЦ) речного рака и дорзальных ганглиев крыс; (2) протеомное исследование экспрессии сигнальных белков в ганглиях БНЦ рака; (3) подготовка мРНК и описание процедуры ПЦР в реальном времени; (4) биохимические методы приготовления образцов для последующих анализов методами протеомики и вестерн-блота; (5) метод иммуноблоттинга; (6) двойного иммунофлуоресцентного окрашивания; и (7) коиммунопреципитации; (8) анализ активности гистондеацетилаз; (9) анализ близкого лигирования; (10) визуализация апоптотических клеток; (11) методические приемы приготовления и последующего испытания нейропротекторных свойств ингибиторов исследуемых белков; (12) описание методов статистической обработки данных.

Использованные методы адекватны поставленным экспериментальным задачам. Статистическая обработка результатов убеждает в их достоверности и высоком научно-методическом уровне диссертационного исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Степень обоснованности шести научных положений, выносимых на защиту в диссертационной работы, базируется на глубоком знании диссертантом научной литературы, многолетнем опыте работы в коллективе лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета, многообразии методов и методических разработок, освоенных и использованных Валентиной Александровной лично и в содружестве с коллегами лаборатории. Выводы диссертационного исследования полностью соответствуют поставленным задачам и положениям, вынесенным на защиту.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов для науки и практики

Достоверность полученных Валентиной Александровной Дзрян результатов определяется широким спектром методических подходов, перечисленных выше и надежным статистическим анализом всех выполненных экспериментов.

Новизну диссертационного исследования нагляднее всего иллюстрирует информация, предоставляемая поисковиком PubMed по ключевым словам «acetylation», «deacetylation», «nerve injury»: всего 32 публикации за период с 1995 до 2022гг, из которых 1 статья принадлежит диссертанту, и в которой она является первым автором. Такое число публикаций говорит о высоких требованиях к техническому уровню исполнения и больших усилиях для получения финансовой поддержки дорогостоящих экспериментов. Безусловная научная новизна диссертационной работы Валентины Александровны заключается в том, что в ходе комплексного исследования ей удалось сочетанием технологии протеомных чипов и традиционного метода вестерн блоттинга осуществить анализ содержания 224 белков в клетках аксотомированных ганглиев. В таблице 1 диссертации выделены наиболее яркие протеомные изменения при повреждении ганглиев. По критерию, предложенному в диссертационной работе, это те белки, чьи количественные изменения превышают 30% по сравнению с контролем. Этот перечень составил более 80 белков, обеспечивающих выживание, или, напротив, способствующих апоптозу, и находящихся в примерно равном соотношении.

Разнонаправленность изменений содержания про- и антиапоптотических белков в поврежденных ганглиях – один из главных, но не очевидных результатов. Целью протеомного анализа было выявить белки, уровень которых заметно повышался в ответ на аксотомию в первые часы. Эти белки выполняют разные функции, а изменения их уровней представляют собой интегральную биохимическую характеристику процесса аксотомии. Для дальнейшего исследования выбраны следующие белки, уровень которых после аксотомии заметно возрастал: p53, E2F1, каспаза 3, гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3. Установив, что аксотомия вызывает

разнонаправленное изменение содержания в нейронах и глиальных клетках ганглиев крыс более 80 различных по функции белков, диссертант решила в первую очередь выяснить механизмы, ведущие к обнаруженному ею феномену. Стратегически верным было решение исследовать белки регуляции транскрипции генома. Это является второй основной новацией, изложенной в следующей части главы Результаты исследований, в которой Валентина Александровна сконцентрировалась на исследовании гистондеацетилаз, непосредственно участвующих в эпигенетической регуляции экспрессии генов, показали изменение содержания и внутриклеточную локализацию HDAC1, HDAC2 и HDAC3, вызванное аксотомией периферических нервов. Указанные данные являются принципиально новыми.

Валентиной Александровной впервые изучены вызванные аксотомией изменения содержания и внутриклеточной локализации факторов транскрипции E2F1 и p53 и их ацетилированных форм в ганглиях брюшной нервной цепочки речного рака и в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы. Полученные результаты первой части работы позволили диссертанту сделать предположение о наличии деацетилазной активности гистондеацетилаз I класса в отношении E2F1 и p53. Чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу, а также изучить возможное взаимодействие между HDAC1, HDAC2 или HDAC3 и белками E2F1 или p53, были использованы два современных метода молекулярной биологии - ко-иммунопреципитация и технология Duolink PLA (метод близкого лигирования), которые подтвердили это предположение.

Наконец, возможно, самое важное в отношении терапии нейротравмы, это выполненная диссертантом проверка эффекта ингибирования некоторых белков из идентифицированного протеомным анализом списка, известных как участники регуляции апоптоза. На основании этой части исследований диссертант смогла впервые предложить возможные «точки роста» для создания перспективных нейропротекторных средств терапии нейротравмы

периферических нервов. Кроме того, предложенный ингибиторный анализ помог раскрыть механизмы участия исследуемых гистондеацетилаз, а также факторов транскрипции и процессов их ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев. Проведенная работа помогла не только установить сам факт взаимодействия HDAC и HAT с негистоновыми белками, но и оценить в каких клетках – нейронах или глии, в каких компартментах клеток и в какой период после травмы происходит ацетилирование/деацетилирование регуляторных белков, как это влияет на апоптоз и регенерацию, а также насколько эволюционно древним является данный механизм регуляции активности белков.

Освещение диссертации в научной печати

Результаты диссертационного исследования Дзрян Валентины Александровны многократно доложены на российских и международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых научных журналах в виде 27 публикаций, входящих в международные базы Web of Science и Scopus, из которых 13 – статьи, 12 из которых опубликованы в журналах первых двух квартилей. Это очень высокий показатель.

Выводы диссертации соответствуют целям и задачам исследования, обоснованы фактическим материалом проделанной работы.

Замечания по диссертации:

1. Каким образом был сделан вывод в отношении активности гистондеацетилаз HDAC при анализе лизатов тканей? При таком подходе может быть сделан вывод об уровне экспрессии, так как для анализа активности необходимо использовать антитела к активным формам белка или по реакции в отношении субстрата.
2. Каким образом был сделан вывод об апоптозе именно в нейронах на основе данных, приведенных на Рис.7 (стр. 68), на котором приведены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания без использования специфичных к нейронам антител?

3. На стр.77-79 приведен вывод о результатах, не подтвержденных графическим материалом («Это свидетельствует о развитии апоптотических процессов в глиальных клетках, т. к. по данным TUNEL анализа в это время апоптоз заметно увеличивался в глии, но не в нейронах. Таким образом, данные вестерн блот анализа соответствуют усилению апоптоза к этому времени.»).
4. Есть ряд небольших замечаний в отношении орфографических ошибок, неточностей текста и небрежного оформления рукописи. Рис 2 на стр. 42 – несоответствие рисунка с текстом, который на него ссылается; ссылка на Рис.4 (стр. 42) не отображает информации в тексте, Стр. 45-46 – ошибочно указан ВНЦ, вместо БНЦ, информация на Рис.2 и Рис.4 дублирует друг друга; нет обозначения цифр на столбиках графиков (Рис. 9 и др.).

Считаю необходимым отметить, что перечисленные выше замечания носят чисто технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не влияют на научную ценность диссертационной работы, имеющей практическое и фундаментально-научное значение.

Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация Дзрян В.А. **«Ацетилирование и деацетилирование факторов транскрипции p53 и E2F1 клеток периферической нервной системы после аксотомии»** является научно-квалифицированной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача, установлен не только сам факт взаимодействия HDAC и HAT с негистоновыми белками, но и показано в каких клетках – нейронах или глии, в каких компартментах клеток и в какой период после травмы происходит ацетилирование/деацетилирование регуляторных белков, как это влияет на апоптоз и регенерацию, а также насколько эволюционно древним является

данный механизм регуляции активности белков. Полученные результаты имеют важное значение как с точки зрения создания животных моделей углубленного изучения патогенеза аксотомии, так и созданий на их основе терапевтических стратегий для лечения нейротравм периферических нервов.

Диссертационная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 и № 748 от 02.08.2016г., № 650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г., № 426 от 20.03.2021г.), а ее автор, Дзряя Валентина Александровна, достойна присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент  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»,
Адрес: 236041, Россия, Калининград,
ул. Александра Невского, 14
Тел: +7-905-701-6872;
e-mail: e-semina@yandex.ru

Подпись Семиной Е.В. заверяю:



«20» января 2023 г.