

Травмы как центральной, так и периферической нервной системы являются одной из важнейших проблем здравоохранения не только в России, но и во всем мире. В связи с ростом частоты инсультов и черепно-мозговых травм, а также травм спинного мозга у людей моложе 50 лет проблема поиска новых стратегий защиты нервных клеток стоит особо остро. В основе механизмов инициации, развития и репарации повреждения лежат многочисленные биохимические процессы, которые находятся под воздействием эпигенетических факторов. В свою очередь, факторы эпигенетической регуляции могут как запускать механизмы защиты нервных клеток, так и

вызывать нейродегенерацию. К сожалению, в настоящее время отсутствуют эффективные нейропротекторы. Поиск препаратов, способствующих выживанию нервных клеток при ишемическом и/или травматическом повреждении, связан с изучением сложной системы регуляции функционирования генов и белков. Несмотря на то, что механизмы гибели нервных клеток при аксотомии находятся в центре многочисленных исследований и испытано множество потенциальных лекарственных препаратов, пока не найдены эффективные препараты для терапии нейротравм. Стоит также отметить, что большинство исследований посвящены изучению молекулярных механизмов аксонального повреждения клеток центральной нервной системы, в то время как данных о механизмах аксонального повреждения клеток периферической нервной системы существенно меньше. Поэтому для разработки новых подходов к лечению последствий нейротравм периферической нервной системы необходимо более глубокое исследование процессов внутриклеточной регуляции, в том числе эпигенетической регуляции и посттрансляционных модификаций сигнальных белков, лежащих в основе механизмов нейродегенерации и нейропротекции, чему и посвящена диссертационная работа В.А. Дзрян.

Научная новизна исследования

Исследование экспрессии и внутриклеточной локализации факторов транскрипции p53 и E2F1, а также белков, участвующих в эпигенетической регуляции (гистондеацетилазы HDAC1, HDAC2, HDAC3) при травматическом повреждении периферической нервной системы проводилось на объектах с разным уровнем организации: ганглиях брюшной нервной цепочки (БНЦ) речного рака *Astacus leptodactylus* и в аксотомированных ганглиях корешков спинного мозга крысы, что является преимуществом настоящей работы. Такой 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.

Научную новизну представляют схемы участия сигнальных и эпигенетических белков в реакции клеток периферической нервной системы как беспозвоночных (речной рак), так и млекопитающих, при аксональном повреждении. Эти белки принадлежат к разным клеточным подсистемам: внутриклеточные сигнальные белки, про- и антиапоптотические белки, регуляторы клеточного цикла, метаболизма и клеточной защиты, участники межклеточных взаимодействий и адгезии клеток, белки цитоскелета, везикулярного транспорта, биосинтеза нейромедиаторов и синаптической передачи и т.д. и многие из них рассматриваются впервые в контексте аксотомии.

На основе полученных данных удалось определить потенциальные нейропротекторные препараты (ингибиторы выявленных белков), защищающие нейроны и глиальные клетки спинномозговых ганглиев крыс. Показан нейропротекторный эффект неселективного ингибитора деацетилаз гистонов первого класса валпроата натрия, а также селективного ингибитора фактора транскрипции E2F1.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении значительного объема материала, полученного с применением комплекса современных молекулярных, биохимических и физиологических методов, обеспечивающих подтверждение достоверности и воспроизводимости полученных результатов. Автором были использованы грамотные методы статистической обработки полученных данных. Выводы аргументированы и обоснованы, о чем свидетельствуют публикация результатов диссертационного исследования в международных журналах высокого уровня. Так, по материалам диссертации опубликованы 40 работ, из них: 27 публикаций в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 13 публикаций в сборниках материалов научных

конференций.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные в результате проведенных исследований данные представляют несомненный интерес для трансляционной медицины и могут способствовать разработке препаратов направленного действия для, так называемой, «коктейльной» терапии нейротравм.

Личный вклад автора

Дзряян Валентиной Александровной лично были определены цель и задачи исследования, методические подходы к их выполнению. Автор лично участвовала в проведении экспериментов на всех этапах исследования. Автор самостоятельно проанализировала литературу по тематике проблемы, получила, обработала и обобщила полученные данные.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты работы 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 позволит создать новые лекарственные формы для длительной терапии нейротравм.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Дзряян В.А. построена по традиционному плану и включает в свой состав следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты, Обсуждение результатов,

Закключение, Выводы, Список цитированной литературы, включающий 189 источников. Работа изложена на 157 страницах печатного текста, содержит 37 рисунков и 3 таблицы.

В разделе «Введение» автор обосновывает выбор темы, описывает цели и задачи, которые были поставлены в рамках исследования. Также автор описывает практическую и теоретическую значимость полученных результатов и их достоверность.

В разделе «Обзор литературы» приведена информация о проблемах, связанных с терапией нейротравм, а также о существующих способах моделирования данных патологий. Большое внимание уделяется механизмам эпигенетической регуляции и ее роли в развитии повреждений и репарации клеток нервной системы. Так, автор подробно описывает ферменты, участвующие в ацетилировании и деацетилировании гистоновых и негистоновых белков, приводит их классификацию, механизм действия и мишени. Кроме того, рассмотрены молекулярные и эпигенетические механизмы аксотомии. Обзор литературы в достаточной мере описывает теоретическую базу диссертационного исследования.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит полную информацию об экспериментах, проведенных в рамках исследования. При подготовке диссертационной работы автором был освоен и использован широкий арсенал методов, включающий методы микрохирургии, биохимического и молекулярно-биологического анализа образцов, флуоресцентную микроскопию.

В разделе «Результаты» автор приводит данные протеомного исследования аксотомированных ганглиев брюшной нервной цепочки рака, а также данные вестерн-блот анализа влияния аксотомии на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях рака. Проведенный анализ позволил выявить белки, обладающие наибольшей чувствительностью к аксотомии и представляющие интерес в качестве мишеней для разработки терапевтических препаратов. Данные, полученные на клетках беспозвоночного

животного, были сопоставлены с данными, полученными для ганглиев дорсальных корешков крысы. В результате для дальнейшего детального исследования на модели перерезания седалищного нерва крысы были выбраны сигнальные и эпигенетические белки. После аксотомии седалищного нерва крысы оценивали уровень апоптоза нейронов и клеток глии в ганглиях дорсальных корешков на 1 и 7 сутки после операции. Проводили исследование влияния аксотомии на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях, а также уровни их экспрессии на разных сроках после операции. Показано, что такие белки как p53, HDAC1 и E2F1 изменяли субклеточную локализацию и уровень экспрессии в течение первых 24 часов после аксотомии, наибольшие изменения происходили через 4 часа после операции. Также было показано увеличение деацетилазной активности HDAC1. На последнем этапе исследования проводили оценку нейропротекторного эффекта ингибирования HDAC вальпроатом натрия и влияния фармакологического ингибирования E2F1 *in vivo* на уровень апоптоза и содержание проапоптотических белков в аксотомированных ганглиях крыс. Полученные данные демонстрируют нейропротекторные свойства использованных ингибиторов. Так, было показано, что ингибирование гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 вальпроатом натрия защищает глиальные клетки DRG ганглиев крыс от апоптоза, вызванного перерезкой седалищного нерва, практически полностью отменяет вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования гистонов и транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму нейронов. Введение ингибитора фактора E2F1 также способствовало снижению количества клеток, подвергшихся апоптозу, а также значительно снижало уровень экспрессии активной каспазы 3 и фактора транскрипции p53.

Раздел «Обсуждение» содержит анализ полученных данных, их обобщение и сопоставление с данными литературы.

«Заключение» и «Выводы» написаны кратко и четко. Сделанные автором выводы соответствуют поставленным задачам.

Замечания и вопросы

В рамках рекомендации хочется обратить внимание автора на следующие моменты:

- 1) отсутствие единого стиля в оформлении текста диссертации, в частности, в подписях к рисункам. Например, при обозначении разных элементов в составе рисунков, автор использует то латинские, то русские буквы;
- 2) отсутствие списка использованных сокращений. Его наличие облегчило бы чтение текста диссертации;
- 3) в тексте встречается некоторое количество опечаток, стилистических неточностей и лабораторных жаргонизмов;
- 4) на странице 125 раздела «Обсуждение результатов» автор пишет, что в рамках данного исследования цитоплазматическую локализацию E2F1 наблюдали и в клетках беспозвоночных, и в клетках позвоночных животных. Однако для речного рака были приведены только табличные данные, но не было показано ни флуоресцентных изображений, ни фотографий мембран после проведения вестерн-блот анализа, как это было сделано для крыс. Хотелось бы увидеть иллюстративный материал и для данного объекта.

Также после прочтения текста диссертации возник ряд вопросов:

- 1) Какие критерии применяли при выборе белков для дальнейшего анализа на модели аксотомии седалищного нерва крысы после протеомного анализа аксотомированных ганглиев брюшной цепочки речного рака? Среди приведенных в таблице 1 белков были и другие, изменения которых были ничуть не менее существенными, чем те, что вошли в дальнейшие этапы работы.
- 2) На странице 68 раздела «Результаты» автор пишет, что количество нейронов и глиальных клеток, подвергшихся апоптозу после аксотомии седалищного нерва крысы, было различным. Однако из приведенного рисунка и раздела «материалы и методы» не вполне

ясно, как именно визуализировали нейроны, а как глиальные клетки в этом эксперименте.

- 3) На странице 81 на рисунке 15 данные иммуноблоттинга ядерной фракции лизатов клеток нормированы на бета-актин. Как автор может объяснить выбор данного контроля, так как ядерная локализация не является специфичной для этого белка?
- 4) С чем может быть связан тот факт, что ядра глиальных клеток окрашиваются Hoechst, а ядра нейронов нет? Такое различие в окраске видно на рисунке 19, например.

Вышеизложенные замечания не снижают научную и практическую значимость работы.

Заключение

Диссертационная работа Дзрян Валентины Александровны «Ацетилирование и деацетилирование факторов транскрипции p53 и E2F1 клеток периферической нервной системы после аксотомии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области важнейшей научно-практической задачи повышения эффективности нейропротекторной терапии нейротравм. Дальнейшее развитие и внедрение результатов исследования будет способствовать улучшению восстановления после аксотомии, снижению инвалидности, а, соответственно, и связанных с этим затрат на лечение и реабилитацию.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа полностью отвечает 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 соискатель заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Дзреян Валентины Александровны обсужден и утвержден на открытом семинаре Отдела метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН (протокол N 1 от 1 марта 2023 г.).

Отзыв подготовил кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,
руководитель группы метаболических основ патологии
Отдела метаболизма и редокс-биологии
ИБХ РАН,

d.s.bilan@gmail.com



Билан Д.С.

Подпись старшего научного сотрудника

Билана Д.С. удостоверяю

Доктор химических наук

Зам. директора ИБХ РАН



Ямпольский И.В.