

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.127.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ им. И.М. СЕЧЕНОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело №___

решение диссертационного совета от 13 октября 2015 года № 51

О присуждении Козловой Дарье Игоревне, гражданство РФ, ученой степени кандидата биологических наук. Диссертация «ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И РЕГУЛЯЦИИ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ НЕПРИЛИЗИНА В МОЗГЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ» по специальности 03.01.04 «Биохимия» и 03.03.01 «Физиология» принята к защите 2 июля 2015 года, протокол № 47, диссертационным советом Д002.127.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт-Петербург, проспект Тореза, дом 44. Диссертационный совет утвержден приказом Министерства образования и науки РФ от 11.04.2012 №105/нк.

Соискатель Козлова Дарья Игоревна, 1987 года рождения, в 2010 году окончила Санкт-Петербургский Государственный университет и получила степень магистра биологии, работает в должности младшего научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук в лаборатории сравнительной физиологии и патологии центральной нервной системы. Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2015 году в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Научные руководители: доктор биологических наук, Журавин Игорь Александрович, заведующий лабораторией сравнительной физиологии и патологии ЦНС; доктор биологических наук, Наливаева Наталия Николаевна, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии и патологии ЦНС в Федеральном

государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1) Дубинина Елена Ефимовна, доктор медицинских наук (03.01.04 - биохимия и 14.01.08 - педиатрия), главный научный сотрудник отделения клинко-диагностических исследований Санкт-Петербургского научно-исследовательского психоневрологического института им. В.М. Бехтерева.

2) Рыбникова Елена Александровна, доктор биологических наук (03.03.01 - физиология), главный научный сотрудник лаборатории нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» в отзыве, подписанном заведующим кафедрой биохимии Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, кандидатом биологических наук – Стефановым Василием Евгеньевичем и доцентом кафедры биохимии Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, кандидатом биологических наук – Галкиной Ольгой Вячеславовной и утвержденным проректором по научной работе Санкт-Петербургского государственного университета профессором Сергеем Павловичем Туником, указала, что диссертация Козловой Дарьи Игоревны является законченной научной квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Полученные Козловой Д.И. экспериментальные данные имеют большое теоретическое значение и практическую ценность. Они расширяют знания о механизмах регуляции экспрессии неприлизина в норме и при патологических условиях (гипоксия) и роли данного фермента в развитии нейродегенерации, а также дают в будущем возможность использования показателя активности неприлизина в клинике в качестве диагностического критерия для прогнозирования некоторых когнитивных нарушений, в т.ч. и болезни Альцгеймера (БА). Было отмечено, что результаты диссертационной работы могут быть использованы в научно-исследовательской работе ряда учреждений, в частности: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Институт мозга человека РАН, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева и др., а также они могут быть использованы в лекционных курсах, читаемых в ВУЗах.

Ведущее учреждение заключило, что диссертационная работа Козловой Дарьи Игоревны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия и 03.03.01 - физиология, является законченной научной квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункт 9-14), а Козлова Дарья Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия и 03.03.01 - физиология.

Соискателем опубликовано 24 печатные работы по теме диссертации: 3 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций, 3 – главы двух коллективных монографий и 18 тезисов докладов в материалах всероссийских и международных конференций.

Статьи по теме диссертации:

1. Журавин И.А., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Багрова Д.И., Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Наливаева Н.Н. Когнитивные расстройства в онтогенезе млекопитающих при нарушении пренатального развития // Журнал «Психиатрия». –2010. –№ 4. – С. 36-43.

2. Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R, Makova N.Z., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats // J. Mol. Neurosci. –2012. – V. 46. – P. 569-577, doi 10.1007/s12031-011-9644-x.

3. Козлова Д.И., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Туманова Н.Л., Журавин И.А. Изменение активности протеазы каспаза-3 в раннем постнатальном онтогенезе крыс влияет на содержание амилоид-деградирующей пептидазы неприлизин в ткани коры головного мозга // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. –2015. – Т. 51. – №6. – С. 427-430.

На автореферат диссертации поступили отзывы:

1) от профессора, д.б.н., профессора кафедры физиологии человека и животных Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ФГАОУ ВО «Южного федерального университета» - Менджерицкого А.М.;

2) от профессор кафедры биологической химии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, ведущего научного сотрудника лаборатории биохимического гомеостаза НИИ нефрологии, д.б.н., старшего научного сотрудника – Суглобовой Е.Д.;

3) от доцента кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, к.м.н. – Лобачевской Т.В.;

4) от доцента кафедры биохимии ФГБОУ ВО СПбГУ, к.б.н. - Романовской Е.В.;

5) от старшего научного сотрудника лабораторно-диагностического отдела ФГБУ «СПб НИИ ЛОР» Минздрава РФ к.м.н. Тырновой Елены Валентиновны.

Все отзывы на автореферат диссертации положительны, в них сделано заключение о том, что диссертационная работа Козловой Д.И. отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам диссертант заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что назначенные оппоненты являются компетентными учеными в области нейрофизиологии и биохимии, имеющими публикации в ведущих российских и зарубежных изданиях.

Ведущее учреждение – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» широко известно своими достижениями в области биохимии, нейробиологии, молекулярной биологии и физиологии ВНС и способно компетентно определить научную и практическую ценность диссертации Д.И. Козловой.

Диссертационный совет отмечает, что в результате исследований, выполненных соискателем Д.И. Козловой, впервые выявлено, что в ходе нормального постнатального онтогенеза происходит снижение активности неприлизина (НЕП) в теменной коре и гиппокампе мозга крыс, которое усугубляется действием пренатальной гипоксии. При этом в поведенческих тестах было показано статистически достоверное снижение когнитивных функций у старых интактных крыс, а также у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, что демонстрирует наличие взаимосвязи между изменениями экспрессии и активности НЕП на молекулярном уровне и изменениями в функционировании организма в целом. Подробно рассмотрен один из возможных молекулярных механизмов регуляции экспрессии и активности НЕП при действии гипоксии. Впервые установлено снижение уровня связывания транскрипционного фактора AICD, регулирующего его экспрессию, с промотором гена НЕП, что коррелирует с повышением уровня экспрессии и активности каспазы-3 в клетках нейробластомы человека NB7. Установлено, что введение ингибитора каспаз препятствует снижению содержания AICD и активности НЕП в клетках нейробластомы, вызванного гипоксией, а также снижению активности НЕП в мозге крыс после пренатальной гипоксии, приводя к улучшению их когнитивных функций.

Впервые исследованы показатели активности НЕП в плазме крови пациентов с диагнозом а-МКС (мягкое когнитивное снижение амнестического типа) и БА по сравнению с показателями у пациентов без нарушений внимания и памяти. Продемонстрировано наличие взаимосвязи между уровнем снижения активности НЕП и степенью выраженности когнитивных нарушений при развитии БА. Также описаны изменения данного показателя при действии лекарственных препаратов, применяемых при лечении пациентов с а-МКС и БА. Полученные в ходе работы данные показали возможность использования значений активности НЕП в плазме крови человека в качестве диагностического критерия для оценки наличия а-МКС или БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти, позволяющего оценить степень развития патологических изменений и эффективность применяемых терапевтических средств.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что результаты работы позволили раскрыть один из возможных молекулярных механизмов регуляции экспрессии гена НЕП при гипоксии. На клеточной модели (клетки нейробластомы NB7) показано, что гипоксия приводит к повышению в клетках экспрессии и активности каспаз, а также к снижению содержания транскрипционного фактора AICD, который регулирует экспрессию НЕП. При действии ингибитора каспазы-3 в этих клетках наблюдалось существенно меньшее снижение содержания AICD, что приводило к увеличению его связывания с промотором гена НЕП и повышению активности НЕП. Установлено, что аналогичные механизмы регуляции экспрессии НЕП работают при гипоксии и на зоотропной модели (крысы после гипоксии на E14, имеющие когнитивные дисфункции в постнатальном онтогенезе). Полученные данные позволяют расширить диапазон поиска мишеней для регуляции экспрессии и активности НЕП и других нейрональных генов с целью коррекции патологических изменений поведенческих реакций, памяти и обучения, индуцированных действием неблагоприятных факторов развития. Все это позволило автору заключить, что повышение экспрессии и активности каспаз при гипоксии является одним из факторов, приводящих к снижению связывания транскрипционного фактора AICD, являющегося их субстратом, с промотором гена НЕП. Выяснено, что ингибиторы каспазы-3 позволяют регулировать экспрессию НЕП за счет увеличения связывания AICD с промотором гена исследованного фермента. В работе высказано предположение и получены экспериментальные факты, подтверждающие, что изменение экспрессии и активности НЕП является одним из механизмов, приводящих к нарушениям поведенческих реакций в процессе старения или после пренатальной гипоксии. Автором также исследованы возможные пути коррекции нарушений поведенческих реакций и когнитивных функций, индуцированных патологией (гипоксия), с использованием

биологически активных веществ, в частности, вальпроата натрия, ингибитора гистондеацетилаз, или антиоксиданта эпигаллокатехин-3-галлата, который также является ингибитором гистондеацетилаз и ДНК-метилтрансфераз. Воздействие данных препаратов приводит не только к восстановлению уровня активности НЭП в мозге крыс до контрольных значений, но также к улучшению процессов запоминания и обучения.

Практическая значимость проведенной работы состоит в том, что метод анализа активности НЭП был адаптирован для исследований с использованием плазмы крови крыс и человека. Данные, полученные в ходе работы, продемонстрировали возможность использования активности НЭП в плазме крови человека в качестве диагностического критерия, который позволяет подтвердить диагноз а-МКС и наличие риска дальнейшего развития БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти. Он позволяет с высокой точностью и скоростью проводить клинический анализ большого количества проб, используя небольшое количество крови.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научно-исследовательской работе ряда медицинских учреждений, а также в лекционных курсах, читаемых в ВУЗах.

В ходе экспериментальной работы автором использован широкий спектр современных физиологических, биохимических, молекулярно-биологических и иммуноцитохимических методов. Для определения активности НЭП был использован двухступенчатый флуоресцентный метод. Автор использовал различные условия культивирования клеток нейробластомы человека NB7, а также широкий спектр поведенческих тестов и анализа когнитивных функций крыс. В работе также был использован клинический материал от пациентов с диагнозом а-МКС и БА, наблюдавшихся в Научном центре психического здоровья, и от пожилых людей, не имеющих нарушений когнитивных функций. Все испытуемые или их представители дали согласие на участие в тестировании их когнитивных функций и анализ биомаркеров плазмы крови.

Статистический анализ данных проводился с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 с надстройками для проведения дисперсионного анализа ANOVA. Достоверность отличий оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента и различия считались значимыми при $p < 0.05$. Анализ результатов иммуноблоттинга проводился с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Сравнение средних значений в экспериментах по оценке кратковременной и долговременной памяти осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента для несвязанных выборок, либо с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, при этом значимыми считались

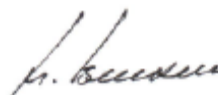
различия при $p \leq 0.05$. Оценка достоверности результатов исследования показала, что данные, представленные в диссертации, получены с участием достаточного количества экспериментального материала и пациентов.

Личный вклад Д.И. Козловой в выполнение данного диссертационного исследования состоит в планировании, подготовке и проведении всех экспериментов, сборе и анализе научного материала, а также публикации статей по материалам работы.

Диссертационный совет пришел к выводу, что диссертация Д.И. Козловой представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям, изложенным в Постановлении Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 «Положение о присуждении ученых степеней».

На заседании 13 октября 2015 года диссертационный совет принял решение присудить Д.И. Козловой ученую степень кандидата биологических наук. В заседании диссертационного совета и тайном голосовании приняло участие 17 членов совета (в том числе 12 докторов наук по специальности 03.03.01 – физиология и 5 докторов наук по специальности 03.03.04 – биохимия) из 23, входящих в его состав. Результаты голосования: за присуждение ученой степени - 17, против присуждения ученой степени - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель Диссертационного совета
академик



Н.П. Веселкин

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук



Р.Г. Парнова

13 октября 2015 г.