

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНИЦ ИБХ РАН)**

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01 от 25 февраля 2026 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Шувалова Маргарита Львовна

Роль активных форм кислорода и редокс-сигналинга в функционировании
гемато-энцефалического барьера

Специальность: 1.5.3. – Молекулярная биология

Москва, 2026 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 25 февраля 2026 года.

Председатель

диссертационного совета

акад., д.х.н. Анатолий Иванович Мирошников

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Владимир Александрович Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

- | | | | |
|-----|------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1. | Академик РАН, д.х.н. | Мирошников Анатолий Иванович | (1.5.6) |
| 2. | Д.х.н. | Смирнов Иван Витальевич | (1.4.9) |
| 3. | Д.физ.-мат.н. | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 4. | Д.б.н. | Ажикина Татьяна Леодоровна | (1.5.3) |
| 5. | Д.х.н. | Безуглов Владимир Виленович | (1.4.9) |
| 6. | Д.х.н. | Белогуров Алексей Анатольевич | (1.5.3) |
| 7. | Д.х.н. | Бовин Николай Владимирович | (1.5.6) |
| 8. | Д.х.н. | Генералова Алла Николаевна | (1.5.6) |
| 9. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Долгих Дмитрий Александрович | (1.5.3) |
| 10. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Завриев Сергей Кириакович | (1.5.6) |
| 11. | Д.б.н. | Зарайский Андрей Георгиевич | (1.5.3) |
| 12. | Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (1.5.3) |
| 13. | Академик РАН, д.б.н. | Лукьянов Сергей Анатольевич | (1.5.3) |
| 14. | Член-корр. РАН, д.х.н. | Мирошников Константин Анатольевич | (1.5.6) |
| 15. | Д.х.н. | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 16. | Д.б.н. | Рубцов Юрий Петрович | (1.5.3) |
| 17. | Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (1.5.3) |
| 18. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Тоневицкий Александр Григорьевич | (1.5.6) |
| 19. | Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (1.4.9) |
| 20. | Член-корр. РАН, д.х.н. | Цетлин Виктор Ионович | (1.4.9) |
| 21. | Д.х.н. | Шахпаронов Михаил Иванович | (1.4.9) |

Председатель совета, Мирошников Анатолий Иванович: Уважаемые коллеги, давайте начнем. Согласно повестке, сегодня мы заслушаем защиту диссертации Шуваловой Маргариты Львовны. Представляю слово ученому секретарю, Олейникову Владимиру Александровичу, для зачитания документов, содержащихся в деле соискателя.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Диссертация Маргариты Львовны «Роль активных форм кислорода и редокс-сигналинга в функционировании гемато-энцефалического барьера» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Научный руководитель — Белоусов Всеволод Вадимович, доктор биологических наук, член-корр РАН, руководитель Отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН. Официальные оппоненты — Абрамов Андрей Юрьевич, руководитель лаборатории клеточной физиологии и патологии Орловского государственного университета им. И.С. Тургенева, и Тарабыкин Виктор Степанович, доктор биологических наук, профессор, НИИ нейронаук ННГУ им. Н. И. Лобачевского. Ведущая организация - Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина. Согласно материалам личного дела, Маргарита Львовна, гражданка Российской Федерации, закончила Биологический факультет имени Ломоносова в 2020 году. С 2021 года является младшим научным сотрудником Отдела метаболизма и редокс-биологии нашего института. Кандидатский экзамен по специальности «молекулярная биология» сдан на отлично. Диссертационная работа выполнена в Отделе метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН. По теме диссертации выпущено пять статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите вывешено на сайте ВАК 23 декабря 2025 года, то есть вовремя. Все необходимые документы в личном деле имеются. Есть ли какие либо вопросы? Если вопросов нет, то, Маргарита Львовна, пожалуйста, начинайте. Вам дается 20 минут на выступление.

Шувалова М. Л., доклад

Добрый день, уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые слушатели. Моя диссертация называется «Роль активных форм кислорода и редокс-сигналинга в функционировании гемато-энцефалического барьера».

Между кровью и центральной нервной системой существуют особые взаимодействия. Ограничение входа потенциально опасных соединений и клеток, доставку питательных веществ и удаление продуктов обмена в ЦНС обеспечивает комплекс структур под названием «гемато-энцефалический интерфейс». К нему относятся гемато-энцефалический барьер, гемато-цереброспинальный, арахноидный. Все эти барьеры контролируют поток веществ между кровью и мозгом и играют важную роль в развитии многих патологических состояний.

Роль активных форм кислорода в нарушениях ГЭБ и связанных с этим состояниях постулируется, однако строго не доказана. Предполагается, что появление АФК в ГЭБ связано с такими выжнейшими заболеваниями, как рассеянный склероз, инсульты, травмы и многие другие заболевания.

Анатомическая основа ГЭБ - это микрососуды головного мозга. Просвет сосуда выстилают эндотелиоциты. Вокруг эндотелиоцитов, окруженные базальной мембраной, лежат перициты - клетки, которые регулируют просвет сосуда и его проницаемость. Благодаря хорошо выраженным плотным контактам эндотелий ГЭБ не пропускает большинство растворимых в воде соединений.

Цель данной работы — изучить роль АФК и редокс-сигналинга в функционировании ГЭБ. Для этой цели были сформулированы следующие задачи: создать генетические векторы для доставки в клетки моделей ГЭБ генов генератора и сенсора АФК, изучить механизмы влияния АФК на барьерные свойства ГЭБ с использованием *in vitro* моделей, изучить динамику передачи АФК между клеточными компонентами ГЭБ с использованием *in vitro* моделей, изучить эффект антиоксидантов на барьерные свойства ГЭБ в присутствии АФК, изучить эффект АФК на трансмиграцию раковых клеток через ГЭБ, разработать *in vitro* модель ГЭБ на основе сфероидов.

Модель ГЭБ конструировали на основе культуральной вставки Transwell. Модель представляет из себя монослой эндотелиоцитов, растущий на люминальной (верхней) стороне пористой мембраны, астроциты, растущие на аблюминальной (нижней) стороне мембраны и нейроны, растущие на дне лунки. Таким образом верхний компартмент модели соответствует просвету сосуда, нижний - ткани мозга. Данная модель считается «золотым стандартом» и широко используется во многих исследованиях.

Классическими методами изучения функций АФК являются добавление экзогенных АФК к клеткам и их детекция с использованием специальных красителей. Это не позволяет точно воспроизводить события сигналинга с участием АФК и наблюдать за генерацией АФК в режиме реального времени. Для генерации и детекции АФК предложено использовать генетически кодируемые инструменты, которые лишены этих недостатков. В данной работе впервые применили хемогенетический генератор оксидазу D-аминокислот (DAAO) и генетически кодируемый сенсор НуPer7 для выяснения функций АФК в функционировании ГЭБ.

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) - это один из хемогенетических генераторов АФК. Это FAD-зависимый фермент, катализирующий окислительное дезаминирование D-аминокислот с образованием соответствующей α -кетокислоты и аммония, а FADH₂ затем окисляется до H₂O₂. В клетках млекопитающих практически нет D-аминокислот, поэтому

количество генерируемого с помощью DAAO H₂O₂ регулируется через манипуляцию концентрацией доступного субстрата.

Эффективным инструментом для визуализации H₂O₂ является сенсор H₂O₂ HyPer7. HyPer7 основан на циркулярном пермутанте желтого флуоресцентного белка и содержит редокс-чувствительный домен OxyR. Редокс-чувствительный домен сенсора окисляется под действием пероксида водорода, что приводит к изменению конформации молекулы и спектральных характеристик хромофора. Он обладает двумя пиками возбуждения флуоресценции при 420 нм и 500 нм и одним пиком эмиссии 520 нм. При окислении HyPer7 интенсивность флуоресценции при возбуждении 420 нм снижается, а при 500 нм пропорционально повышается. Это позволяет наблюдать образование H₂O₂ в реальном времени под микроскопом. Здесь, на картинке представлен пример визуализации сигнала от сенсора.

В качестве эндотелиальных клеток использовали линию церебральных эндотелиоцитов bEnd.3, которые широко используются для моделирования ГЭБ *in vitro*. Чтобы убедиться, что данные клетки экспрессируют белки плотных контактов и подходит для моделирования ГЭБ, мы окрасили bEnd.3 с помощью антител на белки плотных контактов клаудин-5, окклюдин и ZO-1. Как видно на слайде, окрашивание подтвердило наличие этих белков и их правильную локализацию в местах контактов клеток, что свидетельствует о том, что плотные контакты сформированы, и данные клетки в принципе могут использоваться для моделирования. Для церебральных эндотелиоцитов ГЭБ также характерен низкий уровень трансклеточного транспорта. Это обеспечивается в том числе высокой экспрессией гликопротеина Р. Гликопротеин Р - транспортер, который удаляет из клетки попавшие в нее вещества. В случае эндотелиоцитов ГЭБ гликопротеин Р не позволяет этим веществам проникать из крови в нервную ткань. Для изучения интенсивности трансклеточного транспорта использовался анализ захвата родамина 123, который является субстратом для гликопротеина Р. Как видно из рисунка, эндотелиоциты bEnd.3 действительно демонстрируют низкий уровень захвата родамина 123 по сравнению с астроцитами и HEK293TN.

Далее мы сконструировали модель ГЭБ и оценили ее барьерные свойства путем измерения коэффициента проницаемости для флуоресцентного красителя Люцифер желтый. Мы наблюдали, что коэффициент проницаемости уменьшается и выходит на плато примерно на 5 день культивации модели и сохраняет свои значения примерно до 20 дня культивирования. Для всех дальнейших экспериментов модели использовали именно в этот временной интервал. Значения коэффициентов проницаемости примерно соответствуют тем, что описаны в литературе для данного типа модели с использованием таких же типов клеток. Таким образом, мы подтвердили, что сконструированная модель демонстрирует барьерные свойства и может использоваться для дальнейшей работы.

Чтобы сравнить эффекты, возникающие при хомогенетической генерации перекиси

водорода и её экзогенном добавлении, была исследована динамика ответа сенсора *NuPer7* в различных типах клеток при использовании разных концентраций H_2O_2 и D-норвалина. Таким образом, несмотря на то, что установить точную внутриклеточную концентрацию H_2O_2 имеющимися методами не представляется возможным, можно заключить, что во всех используемых клеточных типах изменённый редокс-статус сохраняется длительное время (по крайней мере, 9 часов), а также что сравнение эффектов 50 мкМ экзогенного пероксида и 5 мМ D-норвалина в последующих экспериментах является правомерным.

Убедившись, что полученная *in vitro* модель ГЭБ функциональна, мы приступили к исследованию влияния генерации H_2O_2 , а также экзогенного H_2O_2 на ее проницаемость. Генерацию H_2O_2 проводили отдельно в эндотелиоцитах и астроцитах модели. Для этого при сборке модели высевали астроциты или эндотелиоциты, экспрессирующие гены *NuPer7-DAAO*. Как видно из полученных данных, во всех случаях наблюдается повышение проницаемости модели ГЭБ по сравнению с контролем, причем эффект обратим.

В связи с полученными данными представляло большой интерес установить молекулярные механизмы влияния пероксида водорода на проницаемость ГЭБ. Мы заметили, что генерация H_2O_2 приводит к изменению формы клетки, в частности, к ее сокращению. В связи с этим была выдвинута гипотеза, что генерация H_2O_2 ведет к сокращению актинового цитоскелета эндотелиоцитов, что, в свою очередь, обуславливает нарушение барьерных свойств эндотелиального монослоя. Активность миозина II непосредственно регулируется фосфорилированием с помощью редокс-зависимой киназы легких цепей миозина (MLCK). Редокс-зависимая активация MLCK приводит к фосфорилированию легких цепей миозина, увеличению АТФ-азной активности головок миозина и активации сократительного аппарата клетки. Было предположено, что именно активация MLCK приводит к наблюдаемым эффектам АФК на проницаемость ГЭБ.

Чтобы подтвердить или опровергнуть это предположение, исследовали изменение формы эндотелиальных клеток в ответ на экзогенное добавление H_2O_2 , хемогенетическую генерацию H_2O_2 , а также в ответ на вещества, которые, как было показано ранее, вызывают редокс-ответ в церебральных эндотелиоцитах. В качестве ингибитора MLCK использовали ML7. Как видно из рисунка, ингибирование MLCK с помощью ML7 эффективно снижает воздействие H_2O_2 на изменение формы клеток. Таким образом, предположение о роли MLCK в редокс-зависимом сокращении клеток нашло подтверждение.

Далее исследовали, влияет ли добавление прооксидативных факторов на форму эндотелиоцитов и на проницаемость ГЭБ по редокс-зависимому механизму активации MLCK. Мы изучали этанол, глутамат, некоторые интерлейкины и факторы роста. Также изучали изменение формы эндотелиоцитов при добавлении этих веществ в присутствии и отсутствии ингибитора ML7. Как видно из рисунка, вещества, которые вызывают повышение уровня H_2O_2 в эндотелиоцитах, также вызывают изменение их формы. Этот эффект снимается в присутствии ингибитора ML7, что указывает на участие MLCK в данном процессе. Примечателен факт, что человеческий VEGF, не вызывающий редокс-ответ в клетках мышинового эндотелия bEnd.3, и также не вызывает изменение их формы, в то

время как в человеческих эндотелицитах линии НВЕС5i генерация H₂O₂ происходит, и эффект на форму клетки наблюдается.

Таким образом, нам удалось выяснить, что активация MLCK играет важную роль в редокс-зависимом увеличении проницаемости ГЭБ *in vitro*. Схема этого воздействия представлена на слайде. Действительно, ранее было показано, что ингибирование MLCK может снижать негативный эффект от окислительного стресса, вызванного гипоксией, на проницаемость ГЭБ. В связи с этим ингибиторы MLCK могут иметь потенциал при терапии заболеваний, ассоциированных с нарушением его барьерных функций. К сожалению, сам по себе ML7 токсичен и не может применяться в качестве терапевтического агента, в связи с чем представляет интерес поиск подходящих аналогов

В контексте неврологических заболеваний важно учитывать не только общее снижение барьерных свойств ГЭБ, но и его способность пропускать клетки. К клеткам, способным преодолеть ГЭБ, относятся иммунные клетки и метастазирующие опухолевые клетки. В то время как механизмы, позволяющие иммунным клеткам пересекать ГЭБ, активно исследуются, информация о процессе экстравазации опухолевых клеток значительно ограничена. В связи с этим в данной части работы рассматриваются этапы миграции опухолевых клеток через ГЭБ и влияние АФК на этот процесс. Мы изучали миграцию клеток MDA-MB-231.

Оценивали характеристики таких этапов, как адгезия, миграция по монослою, трансмиграция через монослой. H₂O₂ приводит к повышению доли адгезированных раковых клеток в течении первого часа как при экзогенном внесении H₂O₂, так и при его хемогенетической генерации. Спустя 12 часов инкубации эффективность адгезии возрастает во всех группах до 52-61% и не различается между группами. Общее увеличение уровня H₂O₂ в раковых клетках — как вследствие эндогенной генерации, так и экзогенного внесения H₂O₂ — приводит к менее эффективному распространению раковых клеток по эндотелию. Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что продукция H₂O₂ в эндотелии способствует более быстрому установлению адгезии раковых клеток к поверхности и переходу к трансмиграции.

Генерация H₂O₂ в раковых клетках, а также добавление 50 мкМ H₂O₂ не оказывают влияния на эффективность трансмиграции. В то же время, генерация H₂O₂ в bEnd.3 увеличивает эффективность трансмиграции.

ГЭБ - структура, состоящая из тесно взаимодействующих клеток различных типов. Возникает вопрос, может ли происходить трансклеточная передача АФК между разными клеточными компонентами ГЭБ. После того, как удалось установить принципиальную возможность передачи АФК между клетками в модельной системе с использованием НЕК293ТН, исследовали передачу между клеточными компонентами ГЭБ. Для начала исследовали передачу АФК между астроцитами. Межклеточной передачи АФК между астроцитами не наблюдалось. Ингибирование антиоксидантных систем не привело к повышению сигнала НуРег7 при добавлении субстрата для ДААО. Таким образом, ни одна

из этих антиоксидантных систем не отвечает полностью за отсутствие эффекта.

Далее рассматривали возможность передачи H₂O₂ между церебральными эндотелиоцитами. Межклеточная передача H₂O₂ между этими клетками происходит эффективно.

Далее была исследована возможность межклеточной передачи H₂O₂ не только в при его хемогенетической генерации, но и при его образовании в ходе редокс-сигналинга. Действительно, индуцированный EGF редокс-сигналинг в эндотелии вызывает окислительный ответ в адгезированных на нем раковых клетках MDA-MB-231, в то время как его добавление к MDA-MB-231, культивируемым отдельно, такого эффекта не оказывает. Наблюдаемое явление мы назвали “опосредованный редокс-сигналинг”.

Далее мы представили модель ГЭБ, основанную на сфероидах. В данной части работы был разработан новый метод конструирования моделей ГЭБ на основе сфероидов - “ГЭБойды”, который не требует специализированной среды или факторов роста, что повышает доступность и экономическую эффективность. Ядро ГЭБойдов состоит из астроцитов, в то время как клетки bEnd.3 покрывают поверхность, формируя барьер.

Позвольте зачитать выводы.

Установлено, что пероксид водорода как при экзогенном введении, так и при эндогенной генерации вызывает изменение формы эндотелиоцитов, что, в свою очередь, приводит к нарушению барьерных свойств эндотелиального монослоя. Показана генерация пероксида водорода и изменение формы эндотелиоцитов в ответ на соединения, увеличивающие проницаемость ГЭБ. Показано, что увеличение проницаемости ГЭБ в ответ на генерацию пероксида водорода происходит путем сокращения актинового цитоскелета эндотелиальных клеток, зависящего от киназы легких цепей миозина. Ингибирование киназы легких цепей миозина ингибитором ML7 ведет к нейтрализации эффекта генерации пероксида водорода на проницаемость ГЭБ. Показана возможность трансклеточной передачи пероксида водорода в церебральных эндотелиоцитах ГЭБ, в то время как передача между астроцитами не наблюдалась даже в условиях ингибирования антиоксидантных систем. Показана возможность опосредованного редокс-сигналинга между эндотелиоцитами и раковыми клетками MDA-MB-231 при участии EGF. Исследована роль пероксида водорода в адгезии, миграции и трансмиграции раковых клеток через ГЭБ. Экзогенный и эндогенный пероксид водорода увеличивает эффективность адгезии раковых клеток MDA-MB-231 и снижает скорость миграции по поверхности эндотелия. Снижение скорости миграции при генерации H₂O₂ в раковых клетках и при экзогенном добавлении H₂O₂ связано со снижением направленности движения, в то время как при генерации в эндотелии эффект связан с более выраженной направленностью движения и более быстрым переходом к трансмиграции. Эффективность трансмиграции при генерации H₂O₂ в эндотелии увеличивается. Разработана и протестирована *in vitro* модель ГЭБ на основе сфероидов (“ГЭБойды”), состоящая из церебральных эндотелиоцитов линии bEnd.3 и астроцитов мыши, позволяющая осуществлять мониторинг ее проницаемости в режиме

реального времени.

Спасибо за внимание, готова ответить на ваши вопросы.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо за доклад. Пожалуйста, вопросы.

Билан Дмитрий Сергеевич, д.б.н.: Какие недостатки у представленной модели ГЭБ на основе сфероидов?

Шувалова М.Л.: по-первых, она на основе мышинных, а не человеческих клеток. Конечно, для трансляционных исследований предпочтительнее иметь из человеческих, но в таком случае пришлось бы использовать специализированную среду для эндотелия, что снижало бы экономическую доступность. И, во-вторых, она имеет инвертированную по сравнению с мозгом структуру.

Билан Дмитрий Сергеевич, д.б.н.: И еще хотелось бы уточнить, что на том рисунке, где стрелками показаны эффекты от пероксида и других веществ на эндотелий, показано, что редокс-сигналинг является главным игроком в регуляции ГЭБ. Однако известно, что при воздействии данных веществ также происходит изменения транскрипции и трансляции. Вы как-то это учитываете?

Шувалова М.Л.: данная схема отражает воздействие АФК на коротких промежутках времени — минутах или даже секундах. За столь короткое время синтетические процессы еще не успевают измениться. Поэтому да, мы считаем редокс-сигналинг ключевым по крайней мере на коротких отрезках времени после того или иного воздействия.

Лукьянов Сергей Анатольевич, д.б.н.: Спасибо за ваш доклад. Скажите, при моделировании ГЭБ для доставки терапевтических средств, насколько может быть полезны модели? Насколько адекватно они отражают функции *in vivo*?

Шувалова М.Л.: существует наблюдение, что если вещество не может проникать через модель, то через ГЭБ оно точно не пройдет. Таким образом мы можем сразу отсеять те вещества, которые точно не могут попасть в мозг, и сэкономить на доклинических исследованиях. Если же вещество может преодолеть модель, то это уже требует дальнейших *in vivo* исследований. Таким образом, модели позволяют не тратить ресурсы для изучения веществ, которые точно не попадут в мозг.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо. Вопросов больше не вижу. В таком случае предоставляем слово научному руководителю.

Белоусов Всеволод Вадимович, д.б.н.: Я хочу сказать только хорошее. Естественно, я хотел бы прежде всего подчеркнуть высокий уровень экспериментальной работы. Маргарита тот редкий случай, когда получается всё очень хорошо. Всё, что она показала в своём отчёте, по сути, она делала впервые. То есть, помимо сенсора и оксидазы аминокислот, которые на тот момент были, всё остальное было совершенно новым, то есть у нас в лаборатории не было модели ГЭБ, у нас не было большинства культур тех клеток, которые там используются, эндотелиальных и так далее, то есть это было впервые. Все эксперименты она планировала сама, обсуждая их со мной. Большинство идей в этой работе предложены самой Маргаритой. Я лишь поправлял, если было необходимо. Также отмечу высокий уровень независимости исследователя. Это привело к таким качественным результатам. Такие люди, которые могут генерировать идеи, очень ценны. Маргарита показала, что является зрелым и самостоятельным исследователем, и, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо, мы вас услышали. Теперь позвольте зачитать заключение организации, в которой выполнялась работа. Работа велась в нашем институте, ГНЦ ИБХ РАН. Заключение содержит биографические данные. Соискатель имеет степень магистра биологических наук, полученную в 2020 году. Тема диссертации была утверждена в ноябре 2021 года и скорректирована в апреле 2025. Доклад был презентован на выступлении семинара Отдела метаболизма и редокс-биологии в июне 2025 года. В заключении отмечается, что это представляет из себя законченную научную работу. Отмечается, что актуальность темы не подлежит сомнению, так как роль АФК в функционировании ГЭБ до сих пор была слабо изучена. Персональный вклад в работу не вызывает сомнений. Данные были получены и проанализированы корректно и не вызывают сомнений. Теоретическая значимость заключается в расширении знаний о редокс-сигналинге в функционировании ЦНС и развитии ее заболеваний. Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных журналах и представлены на всероссийских и международных конференциях. Соответственно, работа отвечает всем требованиям для присуждения научной специальности 1.5.3. Таким образом, соискатель, выполнивший данную работу, рекомендован к присуждению степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Результаты анонимного голосования подписаны старшим научным сотрудником Отдела метаболизма и редокс-биологии Подгорным, главой отдела аспирантуры Захарянц и заверены директором института академиком Габитовым.

Далее следует отзыв ведущей организации. Ведущая организация - Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина. Отзыв полностью положительный. Отмечается актуальность исследования в связи с ролью АФК в нарушениях ГЭБ. Подчеркивается теоретическая значимость работы в области редокс-сигнализации. Практическая значимость заключается в изучении роли АФК и антиоксидантной терапии при лечении заболеваний. Отмечается, что структура работы соответствует стандарту. Введение посвящено описанию функций АФК в клетках, а также

структуре и функциям гемато-энцефалического интерфейса. Используемые источники не вызывают сомнений. Секция материалы и методы содержит исчерпывающую информацию. В секции «Результаты и выводы» автор представляет полученные данные и их интерпретацию. Секция «Выводы» содержит 6 утверждений, которые не вызывают критических возражений. Во всех публикациях по диссертационной работе Шувалова является первым автором, что указывает на ее значительный личный вклад. Все работы опубликованы в рецензируемых научных журналах. Согласно комментариям, работа выполнена на высоком уровне. Однако имеется замечание, что в некоторых местах подписи к рисункам сделаны на английском, что, впрочем, не умаляет значимость работы. Таким образом, работа Маргариты Шуваловой полностью отвечает критериям ВАК, а соискатель заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Отзыв подписан заведующим лабораторией трансляционной биомедицины, к.б.н. А.В. Еремеевым, и утвержден генеральным директором, чл.-корр. РАН, д.б.н. Лагарьковой Марией Андреевной.

На автореферат поступили два отзыва. Отзыв на автореферат Серебряной Дарьи Владимировны, к.б.н., доцента кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова Серебряной Дарьи Владимировны. Отзыв положительный, замечаний высказано не было. Отмечается, что соискатель заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Второй отзыв поступил от Кухарского Михаила Сергеевича, д.б.н., заведующего лабораторией молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института физиологически активных веществ» Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук. Отзыв положительный, есть замечание о том, что в тексте присутствуют небольшие опечатки, что, впрочем, не влияет на восприятие работы. Также отмечается, что соискатель заслуживает искомой степени. В отзыве спрашивается, могут ли быть наблюдаемые эффекты на адгезию раковых клеток к эндотелию быть вызваны повреждениями мембраны в ходе окислительного стресса? Маргарита Львовна, ответьте, пожалуйста, на вопрос.

Шувалова М.Л.: для того, чтобы быть уверенными, что мы видим какой-то специфический эффект, а не последствие гибели клеток, мы тестировали клетки на жизнеспособность МТТ тестом. Мы использовали разные концентрации пероксида и D-норвалина и показали, что используемые в данной работе концентрации не влияют на жизнеспособность клеток. Таким образом есть все основания полагать, что влияние на адгезию, а также все остальные эффекты, обнаруженные в работе, не связаны напрямую с клеточной гибелью.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо. Далее следует отзыв официального оппонента Абрамова Андрея Юрьевича. Андрей Юрьевич, мы вас слушаем.

Абрамов Андрей Юрьевич, д.б.н., официальный оппонент: позвольте мне высказать некоторое мнение по данной работе. Я начну с того, что мозг, который, в принципе, составляет около 2% нашей массы, то есть 1-2%, в то же время потребляет около 20% кислорода и 20% глюкозы от общей массы тела. Это означает, что мозг должен активно и быстро потреблять кислород и другие вещества из крови. Однако многие вещества, которые мы потребляем и которые нормальны для наших других тканей, могут быть токсичными для мозга. Поэтому, учитывая активность и эффективность гематоэнцефалического барьера, его работа безусловно важна. В этом смысле работа является как новой, так и интересной. Более того, могу сказать, что люди, занимающиеся подобными исследованиями, обычно очень востребованы, например, в фармацевтических компаниях. Почему? Потому что оценка любого соединения, используемого в неврологии, должна проходить такие исследования. На протяжении долгого времени любое окислительное действие, включая ферментативное или неферментативное, считалось окислительным стрессом. В этой работе новизна заключается в том, что предпринята попытка оценить окислительно-восстановительную сигнализацию, или редокс-сигнализацию, для проницаемости и активности этого гематоэнцефалического барьера. С моей точки зрения, несомненным преимуществом является использование этих молекулярных инструментов, включая зонд специально для гидроперикозы, а также очень удобный и довольно точный инструмент для доставки и производства гидроперикозы. Единственное, что с моей точки зрения, учитывая такую специфику, что гидроперекись все же была произведена, можно было бы избежать упоминания активных форм кислорода повсеместно, потому что на самом деле вы определенно произвели ее. В данном случае невозможно было не воспользоваться вашим преимуществом, когда вы можете говорить более четко и точно о влиянии конкретной гидроперикиси, которая, по сути, является самой долгоживущей активной формой кислорода. Возможно, еще раз новизна работы совершенно очевидна. Невозможно создать какую-то идеальную модель; эта модель гематоэнцефалического барьера не может быть идеальной, но тем не менее она уже хороша хотя бы тем, что работает и позволяет оценить ее проницаемость. Как говорится, всегда хочется большего, поэтому я остановлюсь на тех комментариях, которые абсолютно не умаляют целостности и полноты этой работы и всех норм. Практически все эти работы указывают на то, что переносчиком является аквапорин. И в этом случае особенно интересны все эти эффекты на от гидроперекиси в разных клетках; это практически не упоминается. Второй комментарий уже был озвучен сегодня; он скорее орфографический. В этом случае я не хочу упоминать никаких деталей, потому что на самом деле это действительно мелочи. Но подскажите, чем отличаются термины «окислительный стресс» и «оксидативный стресс»?

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо. Маргарита Львовна, пожалуйста, ответьте на вопрос.

Шувалова М.Л.: Первый комментарий касался роли аквапоринов в межклеточном переносе. Да, действительно, мы пытались ингибировать аквапорины. Однако ингибирование подразумевает некоторую инкубацию с конкретными ингибиторами. И, к

сожалению, когда мы это сделали, мы увидели, что клетки, которые мы уже принесли под микроскоп, имеют очень высокую окисленность цитоплазмы, то есть эти ингибиторы сами влияют на состояние клетки. Поэтому нам не удалось найти какой-либо эффект, потому что клетка уже была окислена, и мы ничего не могли увидеть. Это особенность этих ингибиторов. Но в других работах, которые были проведены, например, на НЕК-293, аквапорины были выбиты, и да, действительно, мы увидели, что перекись практически не проникала в клетку, и сенсор не давал ответа. Это действительно очень хорошая ремарка о том, что, скорее всего, аквапорины играют здесь очень важную роль. Второй вопрос касается разницы между окислительным стрессом и окислительным состоянием. Да, действительно, я указал оба термина в своей работе. Это абсолютно синонимичные названия, просто разные прочтения. Наверное, мне следовало бы остановиться на каком-то одном из них. К сожалению, иногда я использую то одно, то другое.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: по уважительным причинам второй официальный оппонент, Тарабыкин Виктор Степанович отсутствует, поэтому позвольте зачитать его отзыв. Была подчеркнута актуальность, структура диссертации, а также научная новизна, практическая значимость. Обоснование, достоверность и выводы подтверждаются совокупностью представленных данных, статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, и достоверность не вызывает сомнений. Полученные данные и их интерпретация представлены в разделе обсуждения, выводы содержат 6 утверждений, которые были озвучены сегодня. В общем, после прочтения рукописи нет сомнений в научной значимости диссертационной работы, а также в её потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований. В качестве замечания к данной работе оппонент обращает внимание на иллюстрации к главе литературного обзора. Не совсем понятно, являются ли они авторскими, поскольку ни одна из них не имеет ссылки на литературный источник. Если они все авторские, то почему автор не подписал их на русском языке, как в остальной части диссертации? Если иллюстрации из литературы взяты за основу, даже если они имеют собственное авторство, они должны быть процитированы. Однако отмеченные недостатки не имеют принципиального характера и никоим образом не отражают значимость и ценность диссертационной работы, не влияют на её основные результаты и выводы. И в заключении написано, что диссертационная работа Шуваловой Маргариты Львовны полностью соответствует критериям, сформулированным в положении ВАК, и сама соискательница безусловно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Маргарита Львовна, ответьте, пожалуйста, на замечание.

Шувалова М.Л.: Да, действительно, абсолютно все рисунки во введении — моего личного авторства. Некоторые из них уже были опубликованы в соответствующих статьях, некоторые я нарисовал заново. И да, это действительно моя оплошность, что я не указала, к какой статье относится тот или иной рисунок. Ну да, и, наверное, их тоже стоило бы перевести. Я абсолютно согласна с этим комментарием.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо. На этом предлагаю перейти к дискуссии. Пожалуйста, Сергей Анатольевич.

Лукиянов Сергей Анатольевич, д.б.н.:

Уважаемые коллеги, мне было очень приятно ознакомиться с этой работой. Я очень рад, что инструменты, созданные в стенах этого института, очень долго использовались в рамках моей лаборатории. Они продолжают использоваться, но на совершенно новом уровне, когда изучают работу клеточных ансамблей. И это видение, что, конечно же, пироксид — это не просто вредная молекула, это еще и сигнальная молекула, и тот факт, что такие разные, в зависимости от своей биологической сущности и воздействия, могут опосредоваться через единый центр, позволяет нам интегрировать знания и прогнозировать. Но я особенно рад, что у нас есть модель в руках. Возможно, мы обсудим это позже, потому что у нас есть свои разработки, которые затрагивают пироксид и требуют прохождения GEB. Поэтому я призываю всех поддержать эту работу. Более того, как сказал руководитель, значительная её часть была создана самими диссертационцами. Это тоже очень хорошо. Спасибо.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Спасибо. Есть ли еще желающие высказаться? Желающих больше нет. Маргарита Львовна, тогда вам слово.

Шувалова М.Л.: Спасибо всем большое за внимание. Во-первых, я бы хотела поблагодарить моего научного руководителя Всеволода Вадимовича, что поверил в меня и позволил работать под своим руководством. Спасибо за его мудрые советы и интересные идеи. Большое спасибо Георгию Носову за то, что работал со мной все это время. Спасибо Анастасии Дмитриевой за ее помощь во многих экспериментах. Спасибо Андрею Юрьевичу и Виктору Степановичу за то, что согласились вникнуть в мою работу и сделали ценные замечания. И огромное спасибо нашему огромному коллективу, Отделу метаболизма и редокс-биологии и Федерального центра мозга и нейротехнологий. Спасибо большое за теплую атмосферу и за готовность прийти на помощь. Спасибо большое моим друзьям и моей семье за терпение и моральную поддержку.

Мирошников Анатолий Иванович: Спасибо. Переходим к выбору счетной комиссии. Я предлагаю Безуглова, Мирошникова Константина и Олейникова. Есть возражения? Возражений нет. Комиссия может приступить к работе.

(Проходит тайное голосование)

Мирошников Анатолий Иванович: Слово предоставляется председателю комиссии Олейникову Владимиру Александровичу.

Ученый секретарь, Олейников Владимир Александрович: Итак, позвольте перейти к объявлению результатов тайного голосования по диссертации Шуваловой Маргариты Львовны. Члены диссертационного совета присутствовали в количестве 21 человека. Роздано бюллетеней 21. В урне оказались 21. За проголосовали 21, против и недействительных бюллетеней не было.

Мирошников Анатолий Иванович: Уважаемые коллеги, кто за то, чтобы утвердить результаты голосования? Кто против? Воздержавшиеся? Нет. Спасибо. Коллеги, переходим к обсуждению проекта заключения.

(Проходит обсуждение проекта заключения диссертационного совета. Д.х.н. Бовин Н.В. предлагает внести корректировки в некоторые формулировки. С учетом этого заключение принято единогласно)

Мирошников Анатолий Иванович: Всем спасибо.

Председатель
Диссертационного совета
академик РАН

Ученый секретарь
Диссертационного совета
д.ф.-м.н.



Мирошников А.И.

Олейников В.А.