



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России)

119991, Москва  
Ломоносовский проспект, д.2, стр.1  
ИНН 7736182930  
КПП 773601001

Телефон: 8 499 134-30-83  
Факс: 8 499 134-04-88  
e-mail: info@nczd.ru  
www.nczd.ru

Исх. № \_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_ г.

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор Федерального государственного  
автономного учреждения  
"Национальный медицинский исследовательский  
Центр Здоровья Детей"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ  
Фисенко Андрей Петрович



2019 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию **Спировой Екатерины Николаевны** «Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Для фундаментальной и практической медицины чрезвычайно важно то, что нарушения функционирования мышечных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов приводят к развитию миастений, а нарушения в работе нейрональных никотиновых рецепторов – к таким тяжким заболеваниям, как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, шизофрения и другим заболеваниям. Несмотря на многочисленные исследования, еще не выявлены все причины перечисленных заболеваний, однако несомненным остается то, что ионотропные ацетилхолиновые (никотиновые) рецепторы играют в них далеко не последнюю роль. Изучение структуры никотиновых рецепторов, их функционирования и роли в патологических процессах, а также анализ взаимодействия с различными лигандами, является необходимым условием понимания причин, вызывающих развитие заболеваний, и

установлению путей их лечения. Разнообразие субъединиц никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (установлено 17 типов), а также паттерн их экспрессии в клетках и органах чрезвычайно разнообразен, что значительно усложняет изучение функционирования этих рецепторов, а также поиск соединений, способных послужить селективными модуляторами активности никотиновых рецепторов и, потенциально, лекарственными веществами.

Наиболее оригинальная часть диссертационной работы Спировой Екатерины Николаевны посвящена оптимизации условий одновременной гетерологической экспрессии генов субъединиц никотиновых рецепторов совместно с генетически кодируемым кальциевым сенсором Case12. Успешное сочетание экспрессии цитозольного белкового  $Ca^{2+}$ -сенсора и локализованных в плазматической мембране субъединиц ацетилхолинового рецептора в клетках линии Neuro2a позволило разработать Екатерине Николаевне метод быстрого скрининга новых соединений, потенциальных лигандов для мышечного ( $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ ) и нейронального ( $\alpha 7$ ) типов этого рецептора. Результаты, полученные на трансфицированных Neuro2a клетках методами оптической микроскопии и флуориметрии, были подкреплены данными, полученными с помощью электрофизиологического анализа. Следует подчеркнуть, что диссертанту удалось добиться экспрессии не только субъединиц дикого типа, но и получить клетки Neuro2a, экспрессирующие мутантные формы  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  и  $\alpha 7$ .

Диссертационное исследование Спировой Е.Н. подходит к вопросу изучения никотиновых ацетилхолиновых рецепторов с разных сторон. Часть результатов представленной диссертационной работы раскрывает структурные особенности нейрональных  $\alpha 7$  и  $\alpha 9$  никотиновых рецепторов, отражающиеся на их способности взаимодействовать с лигандами, тогда как в другой части исследования испытаны новые агонисты нейронального  $\alpha 7$  (производные хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин) и антагонисты мышечных и нейрональных (аналоги *d*-тубокурарина ВВ1QA1 и ВВ1QA2; баптид 2; панкреатическая фосфолипаза А<sub>2</sub>) никотиновых рецепторов. Среди новых лигандов особое внимание в диссертационной работе Спировой Е.Н. уделено природным структурным аналогам *d*-тубокурарина ВВ1QA1 и ВВ1QA2. Эти новые соединения также эффективно ингибируют мышечный  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  и целый ряд нейрональных ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  и  $\alpha 9\alpha 10$ ) никотиновых рецепторов, как и широко используемый в этих целях *d*-тубокурарин, но значительно хуже, чем *d*-тубокурарин, ингибируют серотониновый 5-НТ<sub>3А</sub> и ГАМК<sub>А</sub> рецепторы. Ранее *d*-тубокурарин рассматривался в качестве миорелаксанта при анестезии, однако, вследствие большого числа побочных эффектов, использование *d*-тубокурарина в хирургической практике стало невозможным. Большая селективность действия ВВ1QA1 и ВВ1QA2 на никотиновые

рецепторы, по сравнению с *d*-тубокурарином, является несомненным преимуществом этих новых соединений. Можно надеяться, что анализ структурных особенностей и действия ВВІQA1 и ВВІQA2, выполненный Екатериной Николаевной, позволит обнаружить особенности этих лигандов, важные для повышения селективности действия на никотиновые рецепторы.

На примере производных хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин Спирова Е.Н. демонстрирует, что не только природные низкомолекулярные соединения являются эффективными лигандами никотиновых рецепторов, но и рациональный химический синтез также может быть достаточно успешным. С позиции лабораторного синтеза особый интерес представляет баптид 2, пептид, не содержащий дисульфидных связей, полученный из яда щумящей гадюки *Bitis arietans*. Диссертант показала, что данный пептид неконкурентным образом ингибирует мышечный и нейрональный никотиновые рецепторы, потенциально позволяя более тонко регулировать их работу.

Текст диссертационной работы построен по классическому плану, он состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 293 наименования. Работа изложена на 118 страницах, включает 40 рисунков и 11 таблиц.

Во Введении Спирова Е.Н. кратко изложила предысторию проблемы и практической значимости регуляции никотиновых рецепторов для функционирования нейромышечной и межнейронной передачи сигналов в организме. Это позволило, в сочетании с анализом литературы сформулировать Цель и задачи исследования

Обзор литературы построен логически верно. Материал достаточно лаконично изложен хорошим научным языком. В обзоре литературы уделяется внимание различным подтипам никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, тонкостям их строения и функционирования, характеристике их лигандов и болезням, связанным с дисфункцией рецепторов. Также в литературном обзоре представлены фундаментальные основы метода кальциевого имиджинга, дана краткая историческая справка развития метода и описаны наиболее популярные кальциевые сенсоры. Обзор литературы удачно иллюстрирован схемами с хорошо сформулированными пояснениями и ссылками на первоисточники.

В разделе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны используемые методики, перечислены все используемые в работе реактивы, оборудование и их источники, дан состав буферов и смесей. Таким образом, если возникнет необходимость повторить эксперименты, выполненные Спировой Е.Н., не должно возникнуть проблем с воспроизведением представленных методик.

В разделе «Результаты и обсуждение» последовательно изложены полученные экспериментальные данные и дана их интерпретация. Описание большей части результатов сопровождается графиками, рисунками и таблицами. Выводы сформулированы на основе полученных результатов и кратко отражают их суть. Все поставленные в начале диссертационного исследования задачи были успешно выполнены. Автореферат Спировой Е.Н. содержит всю необходимую информацию об актуальности и новине диссертационного исследования, основных результатах проделанной работы, изложены выводы.

### **Замечания**

1. Екатерина Николаевна слишком сильно сэкономила место, делая рисунки в Обзоре литературы настолько компактными, что затрудняет чтение подписей внутри схем или обозначения осей на графиках (см., например, рисунки 3, 5, 8, 10, 11).
2. Утверждение о том, что синтетические флуоресцентные индикаторы внутриклеточной концентрации ионов кальция значительно уступают флуоресцентным белковым сенсорам слишком категорично. Получение клеточных культур, экспрессирующих генетически кодируемые сенсоры, занимает больше времени, чем окрашивание химическими индикаторами, требует не менее тщательного подбора условий и практически никогда не достигает 100% экспрессии (см., например, Рис. 18 и 19). Окрашивание всех клеток при использовании синтетических индикаторов является нормой в подавляющем количестве случаев и практически для всех типов клеток.
3. В разделе Методы при описании трансфекции автор забыла указать какой тип липофектамина был использован (Lipofectamine-2000 или -3000, или какой иной).
4. Не очень понятно, каким образом удавалось провести измерения изменений флуоресценции индикатора Fluo-4 во всех лунках 96-луночной плашки со скоростью 2 сек/лунку, если концентрации  $Ca^{2+}$  падала до базального уровня через 30-40 сек после добавления агониста, даже в присутствии ингибитора десенситизации рецептора PNU120596 (см., Рис. 21Б)

Высказанные замечания имеют технический характер и не принижают практической и теоретической ценности диссертационного исследования.

Таким образом, диссертационная работа Спировой Екатерины Николаевны представляет грамотно спланированное, полноценное научное исследование, которое посвящено актуальным проблемам в области изучения никотиновых рецепторов.

Представленная работа служит примером того, как комбинация биофизических и молекулярно-биологических методов позволяет довольно детально изучить процесс взаимодействия никотинового рецептора с лигандом и может быть успешно распространена на структурно-функциональные исследования других ионотропных рецепторов, подобного типа, таких, как ГАМКа, серотониновые, глициновые и другие.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов не вызывают сомнений. Все результаты данной работы были опубликованы в международных рецензируемых журналах, относящихся к 1-2 квартилям, что свидетельствует о востребованности научным сообществом результатов, представленных в диссертации.

По актуальности, новизне, научному и методологическому уровню, достоверности и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Спириной Екатерины Николаевны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология".

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Лаборатории нейробиологии и основ развития мозга (протокол №1 от 22 августа 2019 г.).

Заведующий лабораторией нейробиологии и основ развития мозга  
Федерального государственного автономного учреждения  
"Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор биологических наук

 Сурин Александр Михайлович

119991 Москва,  
Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1  
Тел. (499)134-14-45. E-mail: surinam@nczd.ru

Подпись Сурина А.М. заверяю  
Ученый секретарь ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" Минздрава России,  
к.м.н. Тимофеева А.Г.



