

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 23 сентября 2020 г. № 26

О присуждении **Шелухиной Ирине Валерьевне**, гражданке РФ, ученой степени
доктора химических наук.

Диссертация **«Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов: механизмы функциональной активности и новые лиганды»** по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия принята к защите 20 ноября 2019 г., протокол №21 диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10) и действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель, Шелухина Ирина Валерьевна 1983 г. рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Разработка методов детекции нейрональных $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология защитила в 2011 г. в диссертационном совете Д 002.019.01, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (диплом кандидата наук ДКН №139573), работает старшим научным сотрудником и выполнила диссертацию в лаборатории молекулярной токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный консультант – д.х.н., чл.-корр. РАН Цетлин Виктор Ионович, заведующий Отделом молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Пинелис Всеволод Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения Национального медицинского исследовательского Центра Здоровья Детей Минздрава России;

Кочетков Сергей Николаевич – доктор химических наук, академик РАН, заведующий

Лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук;

Гудашева Татьяна Александровна – доктор биологических наук, чл.-корр. РАН, заведующая Отделом химии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук в своем положительном заключении, подготовленном д.х.н., проф., зав. лабораторией фотосенсибилизации Кузьминым Владимиром Александровичем и утвержденном директором, д.х.н., проф. Курочкиным Ильей Николаевичем, указала, что диссертация представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу на актуальную тему, новые научные результаты вносят существенный вклад в развитие не только биоорганической химии, но и молекулярной биологии, нейрохимии, нейробиологии и медицины, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» (отзыв рассмотрен и одобрен на семинаре лаборатории процессов фотосенсибилизации 14 февраля 2020 г., протокол № 2).

Соискатель имеет 41 опубликованную работу, в том числе по теме диссертации 23 работы общим объемом 19 печатных листов, опубликованных в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, из них – 1 обзор, кроме того, имеется 3 патента и 1 монография. Результаты диссертационной работы неоднократно докладывались и публиковались в материалах российских и международных конференций и симпозиумов. Во всех опубликованных работах соискатель принимал активное участие на стадии экспериментальной работы, обсуждения полученных результатов, подготовки статей к печати. Шелухина И.В. является первым автором в 4 и вторым автором в 9 статьях, опубликованных по теме диссертации. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. Наиболее значимые рецензируемые научные работы, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

- 1) **Shelukhina I.V.**, Zhmak M.N., Lobanov A.V., Ivanov I.A., Garifulina A.I., Kravchenko I.N., Rasskazova E.A., Salmova M.A., Tukhovskaya E.A., Rykov V.A., Slashcheva G.A., Egorova N.S., Muzyka I.S., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Azemiopsin, a selective peptide antagonist of muscle nicotinic acetylcholine receptor: preclinical evaluation as a local muscle relaxant. *Toxins (Basel)*, 2018. 10(1).

- 2) Durek T., **Shelukhina I.V.**, Tae H.S., Thongyoo P., Spirova E.N., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Faure G., Corringier P.J., Craik D.J., Adams D.J., Tsetlin V.I. Interaction of synthetic human slurp-1 with the nicotinic acetylcholine receptors. *Sci Rep.*, 2017. 7(1):16606.
- 3) **Shelukhina I.**, Spirova E, Kudryavtsev D, Ojomoko L, Werner M, Methfessel C, Hollmann M, Tsetlin V. Calcium imaging with genetically encoded sensor Case12: facile analysis of $\alpha 7/\alpha 9$ nAChR mutants. *PLoS One*, 2017. 12(8):e0181936.
- 4) **Shelukhina I.**, Mikhailov N., Abushik P., Nurullin L., Nikolsky E.E., Giniatullin R. Cholinergic nociceptive mechanisms in rat meninges and trigeminal ganglia: potential implications for migraine pain. *Front Neurol.*, 2017. 8:163.
- 5) Крюкова Е.В., **Шелухина И.В.**, Колачева А.А., Алиева А.Х., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Угрюмов М.В., Цетлин В.И. Возможное участие нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в компенсаторных механизмах мозга на ранних стадиях болезни Паркинсона. *Биомедицинская химия*, 2017. 63(3): 241-247.
- 6) Фауре Г., **Шелухина И. В.**, Поровинска Д., Шулепко М. А., Люкманова Е. Н., Долгих Д. А., Спирова Е. Н., Кашеверов И. Е., Уткин Ю. Н., Корринжер П.-Ж., Цетлин В. И. Взаимодействие трехпетельных белков из яда змей и из мозга млекопитающих с CYS-петельными рецепторами и их моделями. *ДАН*, 2016. 468 (2): 232–5.
- 7) Malca Garcia G., Hennig L., **Shelukhina I.**, Kudryavtsev D., Bussmann R.W., Tsetlin V., Giannis A. Curare alkaloids: constituents of a Matis dart poison. *J. Natural Products*, 2015. 78(11):2537-44.
- 8) Kudryavtsev DS, **Shelukhina IV**, Son LV, Ojomoko LO, Kryukova EV, Lyukmanova EN, Zhmak MN, Dolgikh DA, Ivanov IA, Kasheverov IE, Starkov VG, Ramerstorfer J, Sieghart W, Tsetlin VI, Utkin YN. Neurotoxins from snake venoms and α -conotoxin ImI inhibit functionally active ionotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptors. *JBC*, 2015. 290(37):22747-58.
- 9) **Shelukhina I.**, Paddenber R, Kummer W, Tsetlin V. Functional expression and axonal transport of $\alpha 7$ nAChRs by peptidergic nociceptors of rat dorsal root ganglion. *Brain Struct Funct.*, 2015. 220:1885–1899.
- 10) Kudryavtsev D, **Shelukhina I**, Vulfius C, Makarieva T, Stonik V, Zhmak M, Ivanov I, Kasheverov I, Utkin Y, Tsetlin V. Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: from low-molecular weight ones to peptides and proteins. *Toxins (Basel)*, 2015. 7(5):1683-1701.
- 11) John D., **Shelukhina I.**, Yanagawa Y., Deuchars J. and Henderson Z. Functional alpha7 nicotinic receptors are expressed on immature granule cells of the postnatal dentate gyrus. *Brain Res.*, 2015. 1601:15-30.
- 12) Kasheverov I., **Shelukhina I.**, Kudryavtsev D., Makarieva T., Spirova E., Guzii A., Stonik V. and Tsetlin V. 6-Bromohypaphorine from marine nudibranch mollusk *Hermisenda crassicornis* is a specific agonist of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Marine Drugs*, 2015. 13(3):1255-66.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента проф. Пинелиса В.Г. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «1) Замечена ли зависимость агонист-индуцированного кальциевого сигнала от удельной проницаемости подтипов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) для Ca^{2+} ? 2) Можно ли при активации nAChR оценить вклад в величину кальциевого сигнала проникновения Ca^{2+} через потенциалзависимые кальциевые каналы и выхода Ca^{2+} из «внутренних депо» клетки? 3) Перспективно ли применение сайт-направленного мутагенеза ионного фильтра канала $\alpha 7$ nAChR для существенного снижения доли кальция в трансмембранном токе? 4) Возможен ли метаботропный эффект соединений при действии на nAChR? 5) С чем связана гетерогенность Ca^{2+} сигнала в нейтрофилах? Есть ли связь со степенью воспаления? 6) Каково физиологическое значение средства α -нейротоксинов к ГАМК_A-рецепторам? 7) Какова роль стволовых клеток в нейрогенезе у взрослых животных?».

2. Отзыв официального оппонента академика РАН Кочеткова С.Н. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «1) Предполагается ли посадка α -кобратоксина в отличный от ортостерического сайта связывания лигандов при действии на обнаруженную новую природную мишень – ГАМК_A-рецепторы? 2) В диссертации недостаточно подробно поясняется физиологическое значение выявленной локализации холинэстераз в нервных волокнах твердой мозговой оболочки. 3) Представляется целесообразным привести общую схему, наглядно демонстрирующую результаты по аксональному транспорту $\alpha 7$ nAХР. 4) В работе проведены доклинические исследования нового пептидного миорелаксанта. Какова ожидаемая продолжительность его действия для человека? И, соответственно, какие перспективы его применения могут быть?».

3. Отзыв официального оппонента чл.-корр. РАН Гудашевой Т.А. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «1) В диссертационной работе было выявлено влияние ряда агонистов и антагонистов nAХР на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами в ответ на воздействие бактериального трипептида fMLF. В работе не указан механизм его действия и не обсуждается его возможное прямое связывание с nAХР. 2) Представляется, что включение в работу тестирования биологической активности открытых «молчащих» агонистов $\alpha 7$ nAХР не только на молекулярном, но и на клеточно-тканевом и организменном уровнях повысило бы фармакологическую ценность работы. 3) Чем можно объяснить антагонистическую активность производного хинолина №7 в отличие от близких к нему по структуре «молчащих» агонистов $\alpha 7$ nAХР (производные №11, 13, 14)? 4) При тестировании субхронической токсичности нового пептидного миорелаксанта необходимо более подробно пояснить выбор временного интервала. 5) Также требуется пояснить, как удалось избежать смертности животных при изучении его фармакокинетических параметров с использованием довольно высоких доз (0,25 и 0,5 мг/кг) препарата».

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания: «1) Разработанная модификация кальциевого имиджинга активности nAХР могла бы стать еще более простой и быстрой при получении соответствующей стабильной клеточной линии. Проводились ли подобные работы? 2) Выявлено взаимное влияние активности nAХР и нейропептида CGRP при рецепции боли, однако не обсуждается известное прямое действие CGRP на nAХР. 3) Обнаружено, что активация никотиновых и мускариновых АХР приводит к усилению болевой сигнализации в оболочках головного мозга, однако не проведено типирования рецепторов. 4) Обнаружено предпочтительное ингибиторное действие трехпетельного белка человека SLURP-1 на определенные гетеромерные nAХР, но в недостаточной мере обсуждается функциональное значение

такого его дифференцированного действия. 5) Проводились ли попытки кристаллизовать комплекс рецепторов с какими-то из их обнаруженных лигандов?»).

5. Отзыв на автореферат главного научного сотрудника лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» д.б.н. Сурина А.М. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

6. Отзыв на автореферат зав. кафедрой хирургической стоматологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, д.м.н., профессора Тарасенко С.В. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области биоорганической химии, что подтверждается наличием значительного количества публикаций в данной сфере исследований в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН является известным научным центром, где ведутся фундаментальные исследования в области физико-химической биологии, биохимии, биоорганической химии, нейрохимии и нейробиологии. Профессор Пинелис В.Г. является признанным экспертом в нейробиологии, вопросах нейропротекции и нейрорегенерации, нейрональной внутриклеточной кальциевой сигнализации. Академик РАН Кочетков С.Н. является одним из ведущих специалистов в области физико-химической биологии, биохимии и молекулярной биологии. Чл.-корр. РАН Гудашева Т.А. – ведущий специалист в области создания инновационных лекарственных препаратов на основе структур эндогенных нейромедиаторов и нейромодуляторов. Их высокая квалификация в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан уникальный комплексный подход для визуализации и изучения функциональных характеристик Cys-петельных рецепторов; впервые обнаружена альтернативная природная мишень действия длинных α -нейротоксинов; впервые показано предпочтительное ингибирование гетеромерных nAHR трехпетельным белком человека SLURP-1; впервые установлена усиливающая роль холинергической иннервации при болевой сигнализации в оболочках мозга, основном месте зарождения головных болей; впервые определены подтипы nAHR, ответственные за регуляцию защитных реакций нейтрофилов при воспалении; впервые показано, что функциональная активность nAHR критична для таких механизмов нейропластичности, как нейрогенез во взрослом организме и компенсаторные процессы в нигростриатной системе при моделировании болезни Паркинсона; открыт ряд новых низкомолекулярных лигандов Cys-петельных

рецепторов; проведены доклинические исследования нового пептидного миорелаксанта.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что был получен ряд новых фундаментальных знаний о роли Cys-петельных рецепторов в нервной и иммунной системах и о молекулярных механизмах, вовлеченных в эти процессы. Также была пересмотрены представления о селективности и механизме связывания их известных белковых ингибиторов, а также выявлены неизвестные ранее структурные черты, определяющие селективность и характер действия их низкомолекулярных лигандов.

Практическая ценность работы состоит в расширении нейрохимической методологической базы, в обнаружении ранее неизвестных аспектов функционирования Cys-петельных рецепторов при патологических состояниях, открытии их новых фармакологически-перспективных лигандов, а также успешных доклинических испытаниях нового пептидного миорелаксанта.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что идея работы базируется на тщательном анализе современных научных данных о свойствах Cys-петельных рецепторов как лиганд-управляемых ионных каналов, их физиологической роли в организме и о специфичности их лиганд-рецепторных реакций. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов анализа и сертифицированного оборудования. Достоверность результатов и обоснованность выводов не вызывают сомнений. Работа дает развитие новому направлению в области нейронаук.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах исследования: в разработке гипотезы, постановке цели и задач исследования, выборе методов, планировании и проведении экспериментов, интерпретации результатов. Все экспериментальные результаты работы были получены лично автором либо под его непосредственным руководством, за исключением следующих совместных работ: радиолигандный анализ и электрофизиологические измерения активности nAHP человека, ГАМК_A-рецепторов и $\alpha 7$ nAHP/ГлиР проводились в лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН, а также в Университете Вуллонгонга в Австралии к.б.н. Тае Х.-Ш. и в Флорентийском университете в Италии под руководством проф. Романелли М.Н. Окрашивание холинэстераз проводилось в Казанском Федеральном Университете под руководством акад. РАН Никольского Е.Е. Эксперименты с нейронами тройничного ганглия и тучными клетками проводились в Институте молекулярных исследований имени А.И. Виртанена Университета Восточной Финляндии под руководством проф. Гиниатуллина Р.А. Кальциевый имиджинг нейтрофилов, их клеточная адгезия и выработка активных форм кислорода изучались в Институте биофизики клетки РАН под руководством к.б.н. Сафроновой В.Г. Электрофизиология активности $\alpha 7$ nAHP в гиппокампе изучалась в

Университете г. Лидса в Великобритании под руководством к.б.н. Хендерсон З. Доклинические испытания проводились в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН под руководством проф. Мурашева А.Н. Анализ полученных данных и подготовка научных публикаций и патентов выполнены лично автором или при активном участии автора.

На основании всего вышеизложенного Диссертационный совет Д 002.019.01 заключает, что диссертационная работа Шелухиной Ирины Валерьевны является законченной научно-квалификационной работой в области биоорганической химии, в которой решена важная научная проблема определения роли Gys-петельных рецепторов в процессах ноцицепции, воспаления и нейропластичности мозга и обнаружения их специфических терапевтически-перспективных лигандов, что вносит существенный вклад в развитие таких областей знаний как биоорганическая химия, молекулярная биология, нейрохимия, биомедицина, а также создает предпосылки для практического применения полученных результатов. По своему содержанию работа соответствует паспорту специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, личному вкладу и полноте изложения результатов диссертация отвечает требованиям пп. 9-14 "Положения 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

На заседании 23 сентября 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Шелухиной Ирине Валерьевне ученую степень доктора химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 9 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 02.00.10 – биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель
диссертационного совета



(Handwritten signature of V.T. Ivanov)

академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

(Handwritten signature of V.A. Oleinikov)

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

24 сентября 2020 г.

МП