

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

9 октября 2019 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Спировой Екатерины Николаевны

**Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов
сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии**

Специальность: 03.01.03 – молекулярная биология

Москва – 2019

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 9 октября 2019 года.

Председатель диссертационного совета д.х.н., академик РАН **Иванов В.Т.**
Ученый секретарь диссертационного совета д.физ.-мат.н., проф. **Олейников В.А.**

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации – 4.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
7.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
8.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
10.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
11.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
12.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
13.	Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
14.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
15.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
16.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
19.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
20.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
21.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
22.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов Вадим Тихонович: Защита на кандидата биологических наук, Спирова Екатерина Николаевна, материалы личного дела пожалуйста.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя.)

Так, ну опять же...Российская Федерация. Окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени Ломоносова по специальности «Биохимия», это 2015 год. С 2015 по 2017 – инженер, с 2018 по 2019...а, это просто разные лаборатории: инженер лаборатории молекулярной токсикологии, потом лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий. С 2019 года по настоящее время м.н.с. (младший научный сотрудник) лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации нашего института. Кандидатский экзамен по специальности «молекулярная биология» – «отлично». Работа выполнена в нашем институте в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации. Ну, в общем, руководитель диссертационной работы – Шелухина Ирина Валерьевна. И по теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 6 статей и 3 тезисов конференций. Объявление о защите и автореферат размещены на сайте ВАК вовремя 10 июля 2019 года, и все необходимые документы в деле имеются.

Иванов Вадим Тихонович: Какие-то вопросы, замечания? Обычно все бывает спокойно, без таковых. Данный случай не исключение. Екатерина Николаевна, 20 минут для доклада.

Спирова Екатерина Николаевна:

(Излагает основные положения диссертационной работы.)

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо за четкий доклад. Есть ли у присутствующих вопросы к докладчику? Да, прошу.

Козлов Сергей Александрович: Спасибо, хороший доклад. В принципе очень интересная методологическая работа, и реально заслуживающая присвоения кандидатской степени. Но у меня немножко такой вопрос, вот, мне кажется, возможно одна из частей, вот, где вы делали моделирование альфа₉альфа₁₀, ну вот оно как-то подвисает. Т.е., ради чего вот в глобальном смысле была задумана эта работа? Мне кажется она, ну вот то, что нашли две аминокислоты, это какая-то немного незаконченность и какое-то должно развитие дальше из этого быть. Ваши мысли по этому поводу...

Спирова Екатерина Николаевна: Спасибо за вопрос! Нам эта работа показалась интересной с той точки зрения, что альфа₇ и альфа₉ субъединицы, они являются высоко гомологичными субъединицами, а также обе способны образовывать гомопентамерные рецепторы. И нас крайне удивляло то, что такие агонисты как никотин и эпитатидин, способны активировать один подтип – альфа₇, но блокировать альфа₉ подтип. И мы, поэтому, предположили, что это именно связано со строением их ортостерических участков. И, собственно говоря, проводили мутагенез, и выясняли важность этих положений. Результатом нашей работы стало то, что мы сказали о важности остатка в положении 119. Далее, в замечаниях, т.е. к ответам на замечания оппонентов я скажу о том, что в связывании в ортостерическом участке молекулы агониста принимает участие не один аминокислотный остаток, а несколько. И важно изучить этот ряд взаимодействующих аминокислотных остатков для того, чтобы сделать какие-то полные окончательные выводы. Поэтому мы рассматриваем данную работу только как первый этап, на котором мы показали важность одного остатка, но, вполне возможно, что будут и последующие работы, которые докажут важность и каких-то других.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Есть ли еще вопросы? Вопросы иссякли. Вы можете пока ненадолго отдохнуть, присесть. Далее у нас заслушивание отзыва ведущей организации.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).

Так, отзыв ведущей организации – это автономное учреждение национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава Российской Федерации, вот, это ведущая организация. Отзыв полностью положительный, поэтому я, так сказать, опять же сделаю некий...некую вытяжку по этому отзыву. Ну, вот что пишут...Для фундаментальной и практической медицины чрезвычайно важно то, что нарушения функционирования мышечных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов или нейрональных никотиновых рецепторов приводят к ряду очень серьезных заболеваний. Изучение структуры рецепторов, их функционирования и роли в патологических процессах, а также анализ взаимодействия с различными лигандами являются необходимым условием понимания причин, вызывающих развитие таких заболеваний.

Ну вот интересно....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 сенсора (кальциевого сенсора) и локализованных в плазматической мембране субъединиц ацетилхолинового рецептора в клетках линии Neuro2a позволила разработать Екатерине Николаевне метод быстрого скрининга новых соединений потенциальных лигандов для мышечного и нейронального типов этого рецептора. Ну и далее, тут, так сказать, здесь достаточно подробно изложены суть и достижения диссертации. То, что мы в общем-то слышали сейчас. Далее...о важном... на примере производных хинолина Спирова Е.Н. демонстрирует, что не только природные низкомолекулярные соединения являются эффективными лигандами никотиновых рецепторов, но и рациональный химический синтез тоже может быть достаточно успешным. С позиции лабораторного синтеза особый интерес представляет баптид 2, пептид, не содержащий дисульфидных связей, полученный из яда шумящей гадюки. 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. Обзор литературы построен логически верно, материал достаточно лаконично изложен хорошим научным языком. Обзор удачно иллюстрирован схемами с хорошо-сформулированными пояснениями и ссылками на первоисточники. Раздел материалы и методы достаточно подробно описывает реализуемые методики. Результаты и обсуждение: последовательно изложены полученные экспериментальные данные и дана их интерпретация. Однако есть некие замечания. Замечания:

1. Екатерина Николаевна слишком сильно сэкономила место, делая рисунки в обзоре литературы настолько компактными, что это затрудняет чтение подписей внутри схем или обозначений осей на графиках.
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 (смотри, например, Рисунок 18, 19). Окрашивание всех клеток при использовании синтетических индикаторов

является нормой и 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 (липофектамин 2000 или 3000, или какой иной)

4. Не очень понятно, каким образом удавалось провести измерения изменений флуоресценции индикатора Fluo4 во всех лунках 96-луночной плашки со скоростью 2 секунды на лунку. Если концентрация кальция...кальция двухзарядного падала до базального уровня через 30-40 секунд после добавления агониста даже в присутствии ингибитора десенситизации рецептора.

Но высказанные замечания имеют технический характер, не принижают практической и теоретической ценности диссертационного исследования. А в целом, диссертационная работа Спириной 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. Да, ну достоверность не вызывает сомнения...актуальность...по актуальности, новизне, научному и методологическому уровню работа соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней. А сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Значит, обсуждено на семинаре лаборатории нейробиологии и основ развития мозга...ну это подписано...ну, опять же, я повторяю... Национальный медико-исследовательский центр здоровья детей, подписано доктором биологических наук Суриным Александром Михайловичем. Ну, и утверждено директором этого центра.

Иванов Вадим Тихопович: Екатерина Николаевна, там были замечания. Просьба на них ответить.

Спирова Екатерина Николаевна: Большое спасибо представителям ведущей организации и, в частности, Александру Михайловичу Сурину за то, что предоставили положительный отзыв. И сейчас позвольте ответить на ряд замечаний.

Значит, первое замечание было посвящено тому, что я не очень удачно оформила некоторые рисунки в обзоре литературы. Как правило работа в наши дни с текстом происходит на электронных устройствах, и всегда есть возможность увеличить изображение, если это необходимо. Поэтому не всегда является очевидным то, что в печатном варианте текста диссертации какие-то детали изображения могут быть трудночитаемыми. Для Рисунков 3, 5, 8 и 11, на которые ссылается представитель ведущей организации, в тексте диссертации приведены ссылки на первоисточники литературы. А на рисунке 10 была изображена структура молекулы тубокурарина, она также присутствует в статье PLoSOne, в которой были опубликованы результаты по аналогам тубокурарина, а также я надеюсь, что сегодня изображение структуры этой молекулы было достаточно крупным в презентации.

Второе замечание, оно о том..., об использовании флуоресцентных индикаторов внутриклеточной концентрации ионов кальция. Да, безусловно, в некоторых ситуациях использовать низкомолекулярные кальциевые сенсоры удобно. Например, в ситуациях, когда мы работаем с клеточной линией, в которой присутствует эндогенный синтез ацетилхолиновых рецепторов. В нашей же работе мы сфокусировались на том, чтобы гетерологически экспрессировать конкретные подтипы никотиновых рецепторов или же мутантные формы в клеточной линии Neuro2a, в которой нет эндогенного синтеза никотиновых рецепторов. При этом при проведении временной трансфекции для нас не

составило никакой дополнительной сложности проводить коэкспрессию вместе с генами шаперона. Трансфецирующая смесь одновременно содержала плазмиды с геном, кодирующим субъединицы никотиновых рецепторов, а также плазмиды с геном, кодирующий кальциевый сенсор. Зато непосредственно перед проведением кальциевого имиджинга у нас не было необходимости проводить стадию нагрузки клеток. Это сократило время проведения экспериментов, а также сократило наши расходы на такие реагенты, как Fluo4 , например, как низкомолекулярный индикатор концентрации ионов кальция, или на пробенецид, который используется в стадии нагрузки клеток. Несомненным преимуществом использования генетически кодируемых сенсоров, как в нашем случае Case12, является то, что более 90% Case12-экспрессирующих клеток являются живыми, согласно окраске по маркерам живых, либо мертвых клеток. Поэтому в нашем случае нам было действительно удобно использовать генетически кодируемый сенсор.

Третье замечание: я использована липофектами 2000, правда, забыла указать это в Разделе методы.

И четвертое замечание посвящено техническому вопросу о том, как удавалось проводить измерения интенсивности флуоресценции. В тексте диссертации я говорю о том, что метод кальциевого имиджинга с Case12 был разработан в двух модификациях. В одной из них регистрация интенсивности флуоресценции сенсора проходила при помощи флуоресцентного микроскопа, во второй из них регистрация проходила при помощи планшетного флуориметра. Результаты, представленные на Рисунке 21, на который ссылается представитель ведущей организации, были получены в ходе кальциевого имиджинга с использованием флуоресцентного микроскопа. За время эксперимента нам удавалось проводить непрерывную видео фиксацию, в ходе которой мы наблюдали увеличение и последующее снижение интенсивности флуоресценции сенсора. Если же говорить о модификации метода с использованием планшетного флуориметра, то в Разделе методы я правда забыла указать о том, что одновременно раствор агониста добавлялся только в шесть из 96 лунок, и сначала измерение флуоресценции проходило только в этих 6 лунках. Измерение в одной лунке проходило каждые 2 секунды, и таких измерений всего было 80. Такой темп измерений также позволял наблюдать нам увеличение и последующее снижение интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора, однако, снижение было более медленным, т.к. в данной модификации отсутствует стадия отмыва клеток. Но все же мы наблюдали снижение уровня флуоресценции сенсора вплоть до базового значения.

Надеюсь, я ответила на все замечания представителей ведущей организации.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Дальше научный руководитель имеет право охарактеризовать диссертанта. Это Ирина Валерьевна Шелухина. Прошу.

Шелухина Ирина Валерьевна: Здравствуйте, коллеги! Мне очень приятно говорить о Кате, она пришла в нашу лабораторию еще будучи студенткой второго курса кафедры биоорганической химии и сразу зарекомендовала себя как очень способный, трудолюбивый, инициативный студент, коим и оставалась на протяжении всех последующих лет обучения как в МГУ, так и здесь, уже у нас, в аспирантуре ИБХ. Под моим научным руководством Катя сначала защитила с отличием бакалаврский диплом, затем получила диплом специалиста, после чего она поступила в нашу аспирантуру ИБХ РАН. Стоит отметить, что ее научные успехи, уже учась в аспирантуре, были отмечены отделом аспирантуры и в числе лучших аспирантов она была выдвинута на получение стипендии Президента Российской Федерации. Я думаю, лучше всего научные достижения Кати характеризует ее внушительный объем опубликованных статей, а именно 17 статей в основном в иностранных журналах, шесть из которых вошли в кандидатскую диссертацию, как вы можете видеть. На протяжении обучения в

аспирантуре Катя как освоила, так и усовершенствовала многие методы. Она использовала в своей работе как молекулярно-биологические методы, клеточные, электрофизиологию, кальциевый имиджинг и многие другие. Кроме того, что Катя является очень ярким научным работником, она еще является очень позитивным, открытым, дружелюбным человеком, что отмечают не только все члены нашего отдела, но и коллабораторы, как российские, так и зарубежные. За время обучения в аспирантуре Катя дважды была на стажировке в городе Бохуме, в университете города Бохума в Германии, и для чего она получила стипендию DAAD. Стоит также отметить, что среди поданных в тот год стипендий, вернее, как... заявок на стипендию, ее была отмечена одной из лучших. И каждый раз наши коллеги зарубежные отмечали, что с Катей очень приятно работать, и они готовы ее видеть еще много раз. И я думаю, что, безусловно, она за время обучения в аспирантуре сделала очень впечатляющий объем научной работы и, безусловно, достойна звания кандидата биологических наук. Спасибо!

Иванов Вадим Тихонович: Это уже решит голосование. Спасибо. Значит, мне говорят, что есть отзывы на автореферат, которые мы обязаны заслушать.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает отзывы, отзывы положительные, отзывы прилагаются).

Да, ну отзывы полностью положительные. Ну, вот в одном: выводы сформулированы полно, соответствуют заявленным задачам. Метод может быть использован в аналогичных работах данной области. Результаты имеют очевидную научную значимость и практическую ценность. Это первый. Подписано кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории регенеративной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика Кулакова» Минздрав, Российская Федерация. Значит, кандидат наук, Вишнякова Полина Александровна.

И в общем, другой отзыв, тоже на автореферат, тоже полностью положительный. Ну вот здесь отмечается, что написан автореферат хорошим научным языком, имеет много иллюстративного материала, в тексте автореферата я не нашла опечаток, думаю, что внимательное прочтение автореферата дает полное представление о диссертации. Подписано Сеферян Карина Рубеновна, кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры биохимии биофака МГУ имени Ломоносова. Т.е. без замечаний.

Иванов Вадим Тихонович: Ну что же, мы учтем эти отзывы. А сейчас давайте заслушаем официальных оппонентов. Член-корреспондент Тихонов Денис Борисович, Институт эволюционной физиологии и биохимии имени Сеченова.

Тихонов Денис Борисович:

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).

Добрый день, уважаемые коллеги! Спасибо за приглашение выступить оппонентом этой работы. Значит, никотиновый холинорецептор – это настолько классический объект нейрофизиологии, наверное, вообще, один из первых исследованных. Тому в свое время было две причины: во-первых, это нервно-мышечный синапс, т.е. было очень удобно работать на этом препарате, когда еще не было никаких patch-clamp технологий и мышечное волокно можно было клэмпировать обычным двухэлектродным способом; второе, это огромная концентрация никотиновых холинорецепторов в электрических органах рыб, что обеспечивало, значит вот, быстрый и ранний прогресс в изучении биохимии этого рецептора. Я это к чему, что в такой вот области, которой ученые занимаются уже многие десятилетия, вот сделать новую актуальную работу – это очень непростая задача: когда объект мало исследован, ну там...ну все, что ни делай, все будет

новое, а здесь, вот, найти что-то, найти какие-то моменты, которые недостаточно исследованы, где можно серьезно продвинуться вперед, где можно сделать работу новую, ценную, актуальную – это непростая задача, поэтому, вот то, что с точки зрения актуальности работы, постановки...формулировки цели работы и задач, здесь, в этой работе, вот, все очень хорошо, я бы сказал. Просто потому, что это не такая была простая задача именно для холинорецепторов. Значит, что касается методики, то, ну как вы все видели, я бы сказал, что это очень редкий для кандидатских работ набор методик и по разнообразию, и по усовершенствованию еще... ну, вы видите, вот там, кальциевый имиджинг, причем и с классическим красителем, и, значит, новый подход к имиджингу. Есть электрофизиология, есть, значит, изучение мутаций, есть компьютерное моделирование, есть, значит, исследования новых лигандов. Т.е. по набору используемых методик, я бы сказал, что не во всякой докторской диссертации такое можно увидеть. Результаты, полученные, никаких сомнений не вызывают, в смысле их надежность, новизна, достоверность потому, что ну вы видели и слышали, значит, какой фундаментальный набор публикаций стоит в основании представленной диссертационной работы, значит, ну и читая диссертацию, я тоже вот никаких сомнений в надежности полученных результатов...у меня не возникло. Значит, что касается самой диссертации, вот в отзыве ведущего учреждения, который был зачитан, в принципе все нужные слова сказаны, у меня в отзыве письменном, конечно, тоже все это, значит, есть, как положено. Я, вот если говорить кратко, вот так охарактеризовать эту диссертацию, как ее текст, то это хорошая диссертация, за которой чувствуется хорошая школа, т.е. вот там вот есть все, что нужно, все сделано грамотно, правильно, все сделано по уму, все ну вот... т.е. так, как и должна, собственно говоря, выглядеть хорошая диссертация. Ну если это, так сказать, не золотой может быть стандарт для диссертационных работ, то весьма недалеко, я бы сказал, от него. Т.е., вот нет никаких сомнений, что это, так сказать, состоявшаяся диссертационная работа состоявшегося исследователя, т.е. никаких таких вот претензий, которые могли бы, значит, вызвать какие-то сомнения, значит, у меня нет. Ну поскольку работа, значит, оппонента еще и... не только за здравие сказать слова, но и покритиковать, то вот у меня есть такие три замечания...ну, вопросы-замечания, дискуссионного достаточно характера.

Значит, вопрос первый. Ну вот тут даже уже включен слайд для ответа на этот первый вопрос. Первый вопрос – по науке. Во многих концентрационных...ну, концентрационные кривые аппроксимируются естественно уравнением Хилла, что и сделано, но собственно говоря, в уравнении Хилла один из важных параметров это есть собственно и коэффициент Хилла, отражающий кооперативность действия лиганда. Вот ни в диссертации, ни в автореферате этот вопрос не обсуждается вообще. Т.е. в некоторых местах диссертации там вот упомянут, что вот он есть, но вот никакого обсуждения, значит, этого нет. Хотя вот из тех картинок, которые вы вот сейчас видите – вот просто даже глазом видно, что некоторые...что в разных случаях наклон кривой совершенно разный, вот некоторые кривые, что называется, просто ложатся. Вот, хотелось бы...опять же, это не недостаток, но, как мне представляется, это некоторая дополнительная информация, которую можно было бы использовать, чтобы получить, вот, какие-то дополнительные вещи. Или есть какие-то, может быть, методические особенности, которые как бы этому препятствовали. Вот, хотелось бы естественно получить комментарий по этому вопросу.

Значит, второй вопрос касается диссертации, вот единственное такое, что...чего мне не хватало, вот, при чтении этой диссертации, значит, ну, обзор литературы, методы, результаты, а потом автор переходит к заключению, и выводам, т.е. того, что называется общее обсуждение результатов, ну, обычный discussion, как в любой статье, вот оно как-то потерялось. Ну, вот хотелось бы увидеть или услышать теперь, поскольку в диссертации это не очень прозвучало, как полученные результаты вписываются в общую картину вот

исследований никотиновых холинорецепторов: что-то дополняют, что-то меняют, задают какие-то там новые....т.е. вот как бы вписать свою работу в общую картину.

Значит, и третий вопрос состоит в том, что действительно очень много методов, очень большая работа, очень много статей, и в них, соответственно, много соавторов. Понятно, что такие работы в одиночку не делаются, это не грех ни в коем случае, но вот, опять же, хотелось бы получить некоторые комментарии, более развернутые относительно личного вклада автора. Вот что делала она сама, в чем она участвовала, в чем, какие вещи в этой работе делались ее соавторами. Хотя понятно, что не излагать этого она не могла ни в диссертации, ни в докладе, потому что иначе было бы...результаты выглядели бы просто фрагментарно. Ну, вот хотелось бы получить уточнения по этому вопросу.

Ну, а в целом, значит, как это там положено...Диссертационная работа является актуальным научным исследованием, выполненным на высоком методическом и научном уровне, полностью соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, а сама диссертант, несомненно, на мой взгляд, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, Денис Борисович. Несмотря на Ваше положительное заключение, хотелось бы послушать ответы диссертанта на замечания.

Спирова Екатерина Николаевна: Большое спасибо Денису Борисовичу за столько высокую оценку моей диссертационной работы и за вопрос именно с коэффициентом Хилла, т.к. такой параметр, конечно же, важно анализировать при взаимодействии с лигандом.

На слайде я привела средние значения Хилла, полученные в ходе кальциевого имиджинга мутантных форм как мышечного, так и альфа7 рецептора, и соответствующие концентрационные кривые. Что удалось...какие выводы сделать из значений коэффициентов Хилла: я напому, что значения коэффициента Хилла сравниваются с единицей, в случаях, если он больше 1, то при связывании лигандов наблюдается положительный кооперативный эффект, в случаях, если он меньше 1 – отрицательный кооперативный эффект, и в случаях, если он равен 1 – наблюдаемый эффект связывания лигандов является независимым. Значит, выводы, которые мы можем сделать на основании средних значений Хилла для кальциевого имиджинга мутантных форм следующие: во-первых, для рецепторов дикого типа, как мышечного, так и альфа7, мы наблюдали положительную кооперативность связывания ацетилхолина, либо же ацетилхолина и эпibatидина. Эти результаты хорошо согласуются как между методами кальциевого имиджинга с Case12 и Fluo4 и электрофизиологией, а также хорошо согласуются с литературными данными о положительном кооперативном эффекте связывания агонистов.

Во-вторых, при исследовании специфичности мутантных форм мышечного и альфа7 рецепторов мы не наблюдали изменений в положительном кооперативном эффекте связывания ацетилхолина или ацетилхолина и эпibatидина. Для некоторых мутантных форм мы наблюдали, что коэффициент Хилла, средние его значения начинают стремиться к единице, что говорит о возможной тенденции к более независимому характеру связывания, как в случае мутанта, например, 153 мышечного рецептора и мутанта 187 нейронального альфа7. Но мы предполагаем, что данные выводы являются скорее недостоверными, т.к. были получены на основе объединений нескольких результатов, точнее нескольких концентрационных кривых, в ходе которых, среди них немного варьировало значение параметра EC50, что отразилось на том, что резульативная кривая является более полой и значения коэффициента Хила при этом уменьшаются. В случае же мутанта 153 подобное поведение мы обнаружили только при использовании сенсора

Fluo4, однако при тестированиях с Case12 нам не удалось обнаружить различий в кооперативности связывания с рецептором дикого типа. В случае же, например, мутанта 187 подобный эффект был обнаружен для ацетилхолина, но мы также предполагаем, что это артефактный вывод и можем сослаться на вывод...полученного результата среднего значения Хилла для эпибатидина, который также свидетельствует о положительном кооперативном эффекте связывания. Также я хочу отметить, что в случае альфа7 рецептора интерпретация средних значений коэффициента Хилла усложняется еще тем, что в экспериментах используется позитивный аллостерический модулятор PNU120596, который способен в значительной степени изменять количественные характеристики лиганд-рецепторного взаимодействия. Наиболее интересный мутант с точки зрения изменения специфичности – мутант 119 в опытах по кальциевому имиджингу также продемонстрировал, что данный рецептор имеет положительный кооперативный эффект связывания ацетилхолина и эпибатидина. Притом данные результаты были подтверждены результатами электрофизиологического анализа, в котором, я напомним, не используется позитивный аллостерический модулятор. Средние значения Хилла, полученные для структурных аналогов тубокурарина A1 и A2 немного более противоречивы. Однако, мы можем сказать, что, например, для тубокурарина, мы видим более или менее положительный кооперативный эффект, однако, не можем сделать однозначных выводов для A1 и A2, т.к. значения коэффициентов Хилла варьируют от метода к методу. Возможной причиной этого является, во-первых, как мы показали в диссертации, смешанный механизм ингибирования тубокурарином мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов, а также в случае альфа7 рецептора, использование позитивного аллостерического модулятора PNU120596. Однако, в экспериментах, доказывающих смешанный характер ингибирования тубокурарином и его аналогов в присутствии антагонистов не наблюдаем каких-то серьезных изменений в кооперативности связывания рецептором дикого типа, мышечного дикого типа, связывания ацетилхолина. А в случае электрофизиологического анализа с серотониновым рецептором мы наблюдаем скорее положительный кооперативный эффект связывания для A2 и скорее независимый кооперативный эффект связывания, ой, независимый эффект связывания для тубокурарина и A1.

Следующее замечание по поводу краткости моего заключения в тексте диссертации. Сегодня я постаралась изложить заключение в полном объеме, а в тексте диссертации попыталась сказать о современном положении дел в науке в Разделе результаты и обсуждение, где в каждой группе результатов приводила непосредственно последние достижения науки, известные по литературе. Но повторю заключение, первое достижение в сравнении с современным положением дел в науке изучения никотиновых рецепторов является разработка метода кальциевого имиджинга с Case12, который обладает явными некоторыми преимуществами над уже известными методами кальциевого имиджинга с Fluo4 и с генетически кодируемыми сенсорами на основе FRET. Также он имеет преимущества и над радиолигандным анализом, и над электрофизиологией. Второе большое преимущество моей диссертационной работы является комплексное изучение лиганд-рецепторного взаимодействия. Во-первых, мы изучаем ортостерические участки, какие-то структурные аспекты этого участка, важные для связывания лигандов, а также мы изучаем и новые лиганды, и механизмы их действия с никотиновыми рецепторами как в орто, так и в аллостерических участках. Т.к. многие работы в настоящий момент посвящены просто только тому, чтобы идентифицировать эффективные лиганды, но ничего не говорят о механизмах связывания, я считаю, что такое разностороннее представление полученных результатов является несомненным преимуществом.

И, наконец, вопрос об авторстве результатов. В докладе сегодня я сказала, что результаты по компьютерному моделированию и радиолигандному анализу, которые я представила в тексте и докладе диссертации были получены моими коллегами, также это упомянуто в

проекте заключения диссертационного совета. На слайдах презентации я упомянула, в какую статью вошли данные представленные результаты, как например, тестирование аналогов тубокурарина вошло в статью PLoSOne 2019 года. Повторюсь, что все результаты, кроме компьютерного моделирования и радиолигандного анализа, были получены мной лично. Спасибо!

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Мы продвигаемся вперед. Нам предстоит заслушать еще одного официального оппонента. Петр Владимирович Сергиев, представляющий МГУ в двух ипостасях: профессор химфака и директор недавно организованного Института функциональной геномики.

Сергиев Петр Владимирович:

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).

Дорогие коллеги, ну, во-первых, не вызывает сомнений актуальность работы, ее интерес с точки зрения фундаментальной науки, разумеется, потому что ацетилхолиновые рецепторы являются важнейшими и в передаче сигнала между нервными клетками и между нервами и мышцами, как мы сегодня узнали, и на других типах клеток они есть, так что фундаментальная значимость тут очевидна. Очевидна и практическая значимость, в первую очередь потому что есть болезни, обусловленные мутациями в различных подобного рода рецепторах, и их нужно изучать и искать методы лечения, а также, естественно, эти рецепторы являются мишенями лекарств, и поиск лекарств тоже очень важен. Литобзор мне чрезвычайно понравился, он очень подробный. Я считаю, что его нужно опубликовать, я, честно сказать, не являюсь специалистом в нейрофизиологии, поэтому для меня он был полезен, и я надеюсь, что, если его опубликовать, он будет полезен и другим ученым, чтобы ознакомиться с этой проблемой. Он прекрасно вводит, предваряет, так сказать, работу. Собственно, содержание работы было прекрасно доложено здесь и освящено предыдущим оппонентом, я не буду перечислять все, что было сделано. Остановлюсь на том, что мне чрезвычайно понравилось, но, может быть вы знаете, я тоже питаю слабость к репортерным системам на основе флуоресцентных белков потому, что это очень удобно, это позволяет тестировать много различных вариантов, например, мутантов, например, соединений, это ускоряет работу и позволяет сделать большой объем работы, это удобно и изящно. И мы с вами все видели сегодня, какой объем работы проделан, и какие результаты были получены. Собственно, применение этой системы тоже было проиллюстрировано, она была создана и была применена как для анализа мутаций: и мутаций, вызывающих болезни, они были использованы как бы для валидации системы, и мутаций, которые были призваны определить в чем же различие изоформ рецепторов. В чем их различие, ну, например, вот, в действии никотина и, значит, эпibatидина. Ну и наконец, естественно были протестированы потенциальные лиганды новые, новые химические соединения, все это было сделано изящно и очень убедительно. Ну и, естественно, поражает список публикаций. Замечательно, что так много статей в хороших журналах, это вызывает большое уважение. Ну, и по долгу рецензента, по долгу оппонента я все-таки должен остановиться на некоторых замечаниях, они у меня есть.

Ну, наверное, самое первое, на чем хотелось бы остановиться, это то, что мне кажется было не очень удобно использовать систему временной трансфекции, потому что, ну, это нужно делать всякий раз перед тем, как вы планируете эксперимент, это во-первых. Во-вторых, она все-таки не на 100% идет, в-третьих, когда нужно трансфецировать несколько конструкций, а в данном случае нужно было трансфецировать клетки плазмидой с сенсором и собственно плазмидой, которая кодирует компоненты рецептора. Это не очень удобно, потому что в итоге доля клеток, которые получили оба...обе плазмиды, экспрессируют и тот, и другой компонент, они, ну в ряде случаев, достаточно малы. Вот, чтобы не ошибиться, там в каких-то случаях там порядка 7% клеток содержали целевые

белки, это снижает чувствительность метода, более того особенно, наверное, неприятно, что некоторые клетки получали и экспрессировали сенсор, но не синтезировали рецептор. Это просто повышает бэкграунд (фон) флуоресценции, ну, и немножко просто мешает работе. Мне кажется, что сейчас есть достаточно много систем для получения стабильных клеточных линий и достаточно удобных, ну, вот есть лентивирусы, мы вот любим в своей работе использовать векторы на основе транспозазы *sleeping beauty*. Можно получить стабильную клеточную линию, это еще и хорошо тем, что я все-таки вижу продолжение работы в создании системы высокопроизводительного скрининга. Потому что сейчас высокопроизводительные методы скрининга, в общем, являются передовым краем поиска лекарств и, сделав стабильный репортер, можно масштабировать скрининг на, так сказать, до проверки тысяч, десятков тысяч соединений. Это было бы удобно.

Дальше, ну, есть некоторая придирка, опять же, наверное, она связана с тем, что я имею малое отношение к нейрофизиологии, мне показалось, что несочасливо, что клеточная линия, которая была использована, она нейронального происхождения, что в ней самой нет соответствующих рецепторов, но может быть это из-за того, что у меня не хватает знаний, но было бы лучше использовать контроль: те же самые клетки, трансфицированные плазмидой с сенсором, но без рецептора и показать, что там такого эффекта нет.

Да, ну два замечания, которые просто придирки, естественно, там ссылка на один рисунок приведена за 6 страниц до самого рисунка, но это в общем ерунда, естественно, вот. И также, ну все мы используем англицизмы, никуда от них не деться, и я тоже, никакая работа этого не лишена. Сейчас понятно, что вся терминология на английском, но тоже можно было для некоторых терминов, там «экстрацеллюлярный» – ну, «внеклеточный» можно было бы использовать, но это, конечно же, не критично.

Еще мне показалось, что при сравнении двух изоформ, а конкретно альфа7 и альфа9, задача была сформулирована очень интересно и правильно, собственно, как аминокислотная последовательность этих изоформ определяет их различие в отношении действия никотина и эпibatидина, да. Что, какие именно замены, да, вызывают...приводят к различию, да, являются ли эти соединениями агонистами или антагонистами. Вот мне кажется, что эта задача была решена, скажем так, не совсем полностью, да. Вот, были найдены остатки, которые действительно важны для различия, но вот полного обращения действия этих двух соединений не было продемонстрировано, ну, наверное, разумно сказать, что... разумно как-то обсудить это, сказать, как все-таки оставшиеся аминокислотные остатки, которые различные влияют на вот эту специфичность.

Ну и последнее, мне показалось достаточно интересным наблюдением, что фосфолипаза может влиять на рецептор, и, возможно, было бы интересно определить все-таки, нужно ли для этого влияние ферментативной активности фосфолипазы: делает ли она что-то с мембраной, чтобы менять свойство рецептора, который в мембране находится. Или же действительно напрямую белок-белковое взаимодействие, и ферментативная активность не нужна.

Но, в любом случае, как вы видите, это в общем замечания достаточно незначительные, касаются каких-то деталей работы. В целом же работа, мне кажется, просто потрясающая, список публикаций достоин всяких похвал. И объем работы, и спектр методик, которые применяются абсолютно соответствуют всем требованиям и..., так, соответствуют критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней, из чего следует, что соискательница в полной мере заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, Петр Владимирович. Заслушаем ответы Екатерины Николаевны на Ваши замечания.

Спирова Екатерина Николаевна: Большое спасибо Петру Владимировичу, что дали столь высокую оценку моей диссертационной работе. Надеюсь, что я смогу ответить на высказанные замечания.

Так, первое замечание было посвящено тому, что, возможно, было бы более удобно использовать клеточную линию со стабильной экспрессией сенсора и никотиновых рецепторов. Да, я думаю, действительно, в каких-то случаях, например, при тестировании потенциальных лигандов такие репортерные системы были бы действительно удобны. Но репортерные системы, существующие сейчас, судя по данным литературы, о которых я упоминала во введении своего доклада, они построены на использовании сенсоров на основе FRET, что усложняет детекцию (детекцию флуоресценции кальциевого сенсора), т.к. требует более сложного оборудования детекции. Поэтому, использование клеточных линий со стабильной экспрессией никотиновых рецепторов и одновременно с одноволновым сенсором, для меня кажется, было бы более перспективным. Почему же мы не использовали клеточную линию со стабильной экспрессией никотиновых рецепторов – мы не использовали ее потому, что одной из задач диссертационной работы было исследование специфичности мутантных форм как мышечного, так и альфа7 рецептора. И в этом случае потребовалось бы получать стабильные клеточные линии для многих мутантных форм. Также в защиту представленного в диссертации метода кальциевого имиджинга я хочу сказать, что доля клеток, экспрессирующих одновременно и альфа7 рецептор, и Case12 была больше, чем указанные оппонентов 7%. Она достигала 68% в случае мышечного и 21% в случае альфа7 рецептора. Рисунок 19Ж, на который в своем замечании ссылается Петр Владимирович, результаты, представленные здесь, говорят нам о том, что интенсивность флуоресценции сенсора Case12 выше у клеток, также окрашенных бунгаротоксином, выше у клеток, чем фоновый уровень, и чем уровень флуоресценции Case12 во всей клеточной популяции. Однако, мы не обнаружили какой-то строгой корреляции между интенсивностью флуоресценции Case12 и интенсивностью окраски бунгаротоксином, т.к. мы предполагаем, что уровень флуоресценции Case12 зависит не только от эффективности его экспрессии, но также и от содержания ионов кальция внутри клетки.

Второй вопрос тоже методологический, заключается в том, что на Рисунке 21 не представлен контроль...не представлены результаты контроля, заключающегося в том, чтобы регистрировать агонист-индуцированное повышение уровня флуоресценции сенсора у клеток, которые бы экспрессировали сенсор, но не ген никотиновых рецепторов. Подобный контроль был проведен на стадии разработки кальциевого имиджинга, однако, не нашел отражения на данном рисунке. Также я хочу упомянуть о том, что, на мой взгляд, эквивалентным контролем в данном случае является отрицательный контроль с использованием специфического блокатора мышечного и альфа7 рецептора, альфа-кобратоксина. В присутствии кобратоксина мы не наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции сенсора, вызванное действием агонистов.

Замечания по поводу оформления, про шесть...рисунок, расположенный на шести страницах впереди, прежде чем приведена ссылка. Я могу объяснить, почему я сделала так. На странице 67 я привожу кривые, показывающие изменения специфичности мутантных форм альфа7 рецептора, в результате проведенного метода кальциевого имиджинга с Case12. Анализ кривых для мутантных форм должен быть...должен проводиться с непосредственным анализом кривой для рецептора дикого типа. На странице 61 я упоминаю о том, что данные, полученные для рецептора дикого типа хорошо согласуются с литературой. И поэтому сочла неуместным дублировать результаты

для дикого типа два раза. И заменить термин «экстрацеллюлярный» на «внеклеточный» я учла в докладе сегодня.

Пятое замечание, оно касается того, что при связывании молекулы лиганда в ортостерическом участке, возможно имеет место взаимодействие не с одной аминокислотой, а сразу с несколькими. И в подтверждение данных слов рецензента я хочу привести результаты одного из последних достижений рентгенструктурного анализа в области изучения никотиновых рецепторов. Эта работа посвящена детальному...детализации строения кармана связывания никотина альфа4бета2 рецептора. И даже в этой работе авторы говорят о важности остатка лейцина121, в нашей нумерации это лейцин119, о котором я говорила в своей диссертации, о важности этой молекулы при связывании молекулы никотина. Т.к. лейцин участвует в формировании системы водородных связей с акцептором водородной связи никотина (у молекулы никотина), а также аспарагином107. Дополнительно авторы этой работы предполагают о том, что в случае альфа4бета2 рецептора, у которого такая необычная стехиометрия, что в качестве комплементарной субъединицы находится не бета2, а альфа4, в данном положении вместо лейцина находится остаток треонина, что также является одной из возможных причин того, что рецептор с такой стехиометрией хуже активируется под действием никотина. Я считаю, что данные результаты этой статьи очень хорошо согласуются с моими результатами о том, что замена в этом положении аминокислоты на аминокислоту с не неполярным боковым радикалом отражается на способности рецептора связывать классические никотиновые агонисты: никотин и эпibatидин. Поэтому, безусловно, в связывании молекулы лиганда принимает участие сразу несколько аминокислот ортостерического участка. Но, в защиту остатка 119, хочу сказать, что он играет далеко не самую последнюю роль, как было показано в моей работе и в работе под руководством Morales-Perez CL.

Так, и последний вопрос о ферментативной активности панкреатической фосфолипазы А2. Действительно, ферментативная активность панкреатической фосфолипазы А2 способна вызывать повреждения плазматической мембраны. Но в нашем случае эксперименты по тестированию панкреатической фосфолипазы А2 проводились в буферах, не содержащих ионы кальция, т.к. наличие ионов кальция важно для проявления фосфолипазами активности, ферментативной активности. Также я хочу сказать, что ферментативная активность фосфолипаз из ядов змей, она очень важна для проявления у этих фосфолипаз нейротоксического эффекта, который заключается в том, что фосфолипаза каким-то образом связывается со специфическими белками мембраны, как например, с никотиновыми рецепторами, дальше инициирует местное фермент-зависимое повреждение плазматической мембраны, что приводит к выбросу больших запасов ацетилхолина из синаптических бляшек и, в конце концов, к его истощению. В этом заключается нейротоксический эффект фосфолипаз, выделенных из ядов змей. В нашем же случае мы работали с панкреатической фосфолипазой, и такой эффект для панкреатической фосфолипазы еще не изучен. А, возможно, связывание панкреатической фосфолипазы с никотиновыми рецепторами запускает не нейротоксический какой-то эффект, а запускает различные другие сигнальные клеточные каскады, что, конечно же, нужно еще изучить. Надеюсь, я ответила на все замечания. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. У нас есть все основания перейти к общей дискуссии. Высказываться могут все, кроме научного руководителя, в том числе оппоненты, если они хотят продолжить дискуссию с диссертантом, либо все-все присутствующие. Прошу.

Румш Лев Давыдович: Уважаемые коллеги, мы сегодня заслушали исключительно интересную работу. О которой так много тут сказано было хорошего, что как-то нечего даже добавить. Что я скажу: работа мне, безусловно, очень понравилась, в работе

использованы, ну, по-моему, все возможные методы молекулярной биологии, уже не говорю о молекулярном имиджинге, который не просто использован (то, что было в литературе), он модифицирован именно так, чтобы диссертант могла его использовать для своих задач. Ну, что я только добавлю: работу бессмысленно пересказывать, все тут хорошо было изложено. Работа очень красивая: красиво и элегантно задумана, написана, изложена, представлены ответы на вопросы и ответы на замечания оппонентов, ну и уже о самом авторе я не могу ничего не сказать, да, красив автор. Хочу поздравить диссертанта, руководителей, Шелухину Ирину Валерьевну и Виктора Ионовича Цетлина. Голосовать я буду, конечно, за, я думаю, ни у кого никаких вопросов нет, и все меня поддержат. Спасибо за внимание. Интересная была защита.

Иванов Вадим Тихонович: Принимаем к сведениям. Виктор Ионович, прошу.

Цетлин Виктор Ионович: Татьяна была раньше

Овчинникова Татьяна Владимировна: Нет-нет, давайте...

Цетлин Виктор Ионович: Нет Татьяна, Ladies first...

Иванов Вадим Тихонович: Хорошо.

Овчинникова Татьяна Владимировна: Спасибо. Уважаемые коллеги, я не буду говорить о самой работе, Катя очень ярко представила ее, и все мы видели впечатляющий список публикаций. Оппоненты детально проанализировали работу, и она очень лаконично и четко и по делу ответила на все замечания, на все вопросы, поэтому с точки зрения самой работы понятно, что она не только соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, но во многом превосходит эти требования. Я знаю Катю по учебному процессу, Катя еще не закончила аспирантуру, поэтому я хотела бы сказать несколько слов о соискателе. Трудолюбие, ответственность, собранность, умение ценить свое время и неизменная доброжелательность Кати – это образец для подражания аспирантов. Она полностью выполнила учебный план, получила два гранта немецкого фонда академических обменов, прошла дважды стажировку очень успешно. При этом она выходит на государственную итоговую аттестацию уже фактически с защищенной диссертацией. Повторяю, это образец для подражания для других аспирантов. Я понимаю, что такими аспирантами не рождаются, за этим стоит большая воспитательная работа научного руководителя Ирины Валерьевны Шелухиной, чью докторскую диссертацию, я думаю, мы будем иметь удовольствие в ближайшее время слушать, Виктора Ионовича Цетлина. Я хочу поблагодарить научных руководителей за это, а Катю за то, что она очень хорошо, неизменно доброжелательно, очень ответственно взаимодействовала со своими научными руководителями и с теми, кто занимается учебным процессом. Поэтому я хочу пожелать, чтобы Катя успешно, и я в этом не сомневаюсь, защитила эту диссертацию, продолжала работать в институте, пожелать дальнейших больших успехов Кате и призвать всех присутствующих проголосовать за Катину диссертацию, за присуждение ей искомой степени. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Принято. Виктор Ионович...

Цетлин Виктор Ионович: Спасибо большое. Меня по ошибке дважды называли научным руководителем, если это было бы так, то я не имел бы право здесь выступать, как Вадим Тихонович отметил. Так что я не научный руководитель, но я не могу удержаться сказать хорошие слова. Вообще говоря, если бы 8 марта можно было бы защищать диссертацию, то я хотел бы, чтобы 8 марта защищались бы две диссертации – Катина и Ирины Шелухиной, потому что это вот такие два явления, совершенно связанные, что, Татьяна упомянула, Катя на втором курсе пришла в институт, пришла в нашу лабораторию, это и в значительной степени этот тандем (Ирина и Катя) – это не просто тандем человеческий. Вот, скажем до сравнительно недавнего времени (лет 6 это будет, 5-6 назад, наверное) у

нас любимый метод был радиолигандный анализ, у нас не было электрофизиологии, не было кальциевого имиджинга, и вот это появилось, понимаете, и вот этот вот союз, он значительно расширил возможности работы. Ну и, честно сказать, я восхищен дотошностью, четкостью Катиных ответов на все, даже мельчайшие, даже почти что хвальные замечания рецензентов, это крепкий человек в науке. И, ну в различное время нам без этой крепости было бы очень трудно, так что я надеюсь, что за эту диссертацию проголосуют хорошо. И я надеюсь, что упомянутое мной, хоть гипотетическое, 8 марта мы услышим защиту Ирины Шелухиной до 8 марта. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, но это уже отдельный вопрос. Кто-то еще хотел бы поучаствовать в дискуссии? Да, прошу.

Сурий Александр Михайлович: Возможно, я с этой трибуны уже говорил о том, что хорошая работа заканчивается четким ответом на поставленный вопрос, но, главное, она должна порождать новые, еще более интересные. В докладе прозвучало, может быть немножко этого коснулся второй оппонент, о том, что как удивительно свойство клеток, если клетка трансфецирована, точнее лучше сказать так: если клетка экспрессирует какой-нибудь белок, который попал в нее...который, экспрессия которого началась благодаря попаданию в клетку плазмиды, если вы добавляете две совершенно разных плазмиды, то клетка, почему-то, экспрессирует сразу оба белка. Вот в таких линиях, в которых, ну раковые линии, например, да, самый худший вариант вот продемонстрировали, 7%, а лучший, там, в 10 раз лучше того. Если вы работаете с нейрональными культурами, терминально дифференцированными, то там ситуация, по сравнению с тем, что было доложено, просто катастрофическая. Если вы добились экспрессии 0,1%, то это замечательно. Но и даже там получается такая ситуация: если вы смешиваете плазмиды двух белков, зеленого и красного, то они обе всегда экспрессируются в этих случаях, когда экспрессия 0,1% - то это просто радость большая, а 0,01% - это норма. Вот, мне кажется, что работа с такими вот системами может быть открыт нам секрет, почему клетка, если экспрессирует, то сразу все, что в нее попадает, а если не экспрессирует, то ничего. За этим какие-то особенности взаимодействия, вот, генного материала, поступающего снаружи (обработкой генного материала), с тем, который в клетке присутствует, есть. И я просто надеюсь на то, что, продолжая работать в этом направлении, Катя, ее руководители и другие сотрудники лаборатории раскроют этот очень важный момент, который, мне кажется, достаточно фундаментальный: почему клетка, если экспрессирует, то все, а, если не экспрессирует одного, то она не экспрессирует ничего остального, я имею в виду доставляемого внешне. И поэтому по этому параметру, что работа интересна не только тем, что она поставила совершенно многосторонний и исчерпывающий фактический ответ на то, что было сформулировано как задачи, она еще и генерирует еще другие, на мой взгляд, не менее интересные вопросы. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. У нас сегодня активное обсуждение, может кто-то еще хочет поделиться соображениями? Или мы уже созрели для голосования? Скорее второе... Действительно, мы уже в принципе готовы голосовать, но у меня есть пожелание: нам после подсчета итогового голосования предстоит голосовать за тот проект заключения, который наш диссертант предоставил. Голосовать-то мы будем после, но хотелось бы предварительно обсудить сейчас, чтобы дальше не терять время на обсуждение. Есть ли какие-то замечания по поводу проекта заключения данной работы? Да, Николай Владимирович, традиционно участвует в вопросе.

Бовин Николай Владимирович: Есть, оно заключается в том, что как мне представляется, заключения должны писаться в относительно популярном виде. Конечно, не так, чтобы археологи поняли, но все биохимики понимали, о чем идет речь. Вот данный вариант он чрезвычайно специализированный, и его могут понять только узкие

специалисты. А конкретно, я могу привести пример, что здесь раз пятнадцать применяются сокращения нАХР, ой, извините, н-А-Х-Р, а объяснения, что такое н-А-Х-Р нет. И вообще там сокращений безумное количество, и не приводится расшифровка.

Иванов Вадим Тихонович: Ваше предложение какое? Ваше предложение?

Румш Лев Давыдович: Аббревиатуры расшифровать.

Иванов Вадим Тихонович: где-то упомянуть, что это такое? Или более подробные какие-то изменения?

Бовин Николай Владимирович: Как-то облегчить чтение.

Иванов Вадим Тихонович: Давайте так: я просто думаю о формулировке, с которой будем принимать...Мы одобряем данный проект заключения?

Бовин Николай Владимирович: Одобряем после некоторого редактирования.

Иванов Вадим Тихонович: Одобряем после исправления той ситуации, которую вы описали. Правильно? Вы готовы помочь автору в этом действии?

Бовин Николай Владимирович: Да.

Иванов Вадим Тихонович: Ну что, в таком случае я объявляю перерыв на голосование. Счетная комиссия...

Члены диссертационного совета (из зала): А заключительное слово?

Иванов Вадим Тихонович: Да, слово диссертанту. Я прошу прощения. Да, Екатерина Николаевна...еще один этап.

Спирова Екатерина Николаевна: Большое спасибо моим оппонентам: Сергиеву Петру Владимировичу и Тихонову Денису Борисовичу за то, что предоставили столь положительные отзывы на мою диссертацию и высказали какие-то замечания, пожелания, комментарии. Также я хочу высказать благодарность представителю ведущей организации, Сурину Александру Михайловичу, также за очень конструктивные комментарии и дополнения. Спасибо Вишняковой Полине Александровне и Сеферян Карине Рубеновне за то, что предоставили положительные отзывы на автореферат. Также я благодарю своего научного руководителя Шелухину Ирину и, конечно же, руководителя нашего отдела, Цетлина Виктора Ионовича, за то, что помогали мне в оформлении диссертационной работы, обучили меня всему и вообще за курирование моего диссертационного исследования. Большое спасибо!

Также хочу высказать благодарность всем моим коллегам из отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации за то, что всегда поддерживали меня, были готовы оказать помощь, за их терпение. Большое спасибо Татьяне Игоревне Яковлевой и Наталье Борисовне Нигматулиной за то, что помогали мне в оформлении документов для диссертационного совета. Я признательна Вульфус Екатерине Анатольевне и Уткину Юрию Николаевичу за возможность поучаствовать в проектах, посвященных баптиду 2 и фосфолипазе А2. Спасибо большое группе Холльманна из университета города Бохум. В составе этой группы я проходила стажировку, где обучалась двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов. Также спасибо группам ученым из города Лейпцига и университета Флоренции за то, что предоставили нам аналоги тубокурарина, а также новые синтетические производные хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов. И спасибо Саре Ламмис из университета Кембриджа за то, что предоставила плазмиду с геном серотонинового рецептора и помогала в написании текста статьи по аналогам тубокурарина.

Благодарю всех членов диссертационного совета за слушание моего доклада и проявленный интерес, большое спасибо!

Иванов Вадим Тихонович: Ну что, мы принимаем Ваши благодарности. И, возвращаясь к тому, что я предложил. Объявляю перерыв на голосование. Придется подождать подсчета голосов. Надеюсь, счетная комиссия сработает профессионально и не заставит нас долго ждать.

(Перерыв – проводится тайное голосование).

(Вносятся редакционные правки в проект заключения Диссертационного совета).

Олейников Владимир Александрович: Да, мы готовы. Пригласите там, наверняка кто-то ждет.

Иванов Вадим Тихонович: Коллеги, прошу оставшихся особо заинтересованных членов ученого совета занимать места. Может быть, диссертанта пригласить.

Олейников Владимир Александрович: Давайте, приглашайте там всех, пожалуйста.

(Все собираются).

Олейников Владимир Александрович: Значит, счетная комиссия отработала. Спирова Екатерина Николаевна: присутствовало на заседании – 22, роздано бюллетеней – 22, оказалось в урне – 22, за – 22, против и недействительных нет.

Иванов Вадим Тихонович: Кто за то, чтобы утвердить то, что мы слышали? Кто против?

(Проходит голосование. Результаты работы счетной комиссии утверждены единогласно).

Иванов Вадим Тихонович: Поздравим диссертанта. Сегодня был хороший день. Мы должны еще один шаг сделать, об этом я уже говорил. У нас проект заключения есть, уже открытым голосованием мы должны проголосовать, что я и предлагаю сделать, с учетом тех поправок, которые мы уже обсудили. Кто за то, чтобы принять этот итоговый проект заключения? Кто против?

(Проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета. Проект заключения принимается единогласно).

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо! За успешную работу, мы сделали хорошее дело.

Председатель диссертационного совета
академик РАН, д.х.н.


Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь диссертационного совета
д.физ.-мат.н.


Олейников Владимир Александрович

