

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 (ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 9 октября 2019 г. № 13

О присуждении **Спировой Екатерине Николаевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология принята к защите 19 июня 2019 г., протокол № 9, 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 (ИБХ РАН; 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 г.

Соискатель Спирова Екатерина Николаевна, 1993 года рождения. В 2015 г. соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «Биохимия». С 2015 по 2019 г. обучается в аспирантуре ИБХ РАН. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН. Диссертация выполнена в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Шелухина Ирина Валерьевна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Тихонов Денис Борисович, д.б.н., чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН);

Сергиев Петр Владимирович, д.х.н., профессор РАН, профессор химического факультета и директор Института функциональной геномики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное автономное учреждение "Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном д.б.н. Суриным Александром Михайловичем, заведующим лабораторией нейробиологии и основ развития мозга, и утвержденном директором Федерального государственного автономного учреждения "Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н., профессором, заслуженным врачом РФ Фисенко Андреем Петровичем, указала, что диссертационная работа представляет грамотно спланированное, полноценное научное исследование, которое посвящено актуальным проблемам в области изучения никотиновых рецепторов; по новизне, научному и методологическому уровню, достоверности и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Спировой 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 заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Соискатель имеет 17 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 6 работ общим объемом 9 печатных листов, опубликованных в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов

диссертаций, и индексируемых базами данных Scopus и Web of Science, в которые автор внес основной или существенный вклад:

1. Spirova E. N., Ivanov I. A., Kasheverov I. E., Kudryavtsev D. S., Shelukhina I. V., Garifulina A. I., Son L. V., Lummis S. C. R., Malca-Garcia G. R., Bussmann R. W., Hennig L., Giannis A., Tsetlin V. I. Curare alkaloids from Matis Dart Poison: Comparison with d-tubocurarine in interactions with nicotinic, 5-HT₃ serotonin and GABA_A receptors // PLoS One. – 2019 – Т. 14. – № 1. – С. e0210182.
2. Manetti D., Garifulina A., Bartolucci G., Bazzicalupi C., Bellucci C., Chiaramonte N., Dei S., Di Cesare Mannelli L., Ghelardini C., Gratteri P., Spirova E., Shelukhina I., Teodori E., Varani K., Tsetlin V., Romanelli M. N. New Rigid Nicotine Analogues, Carrying a Norbornane Moiety, Are Potent Agonists of alpha₇ and alpha₃* Nicotinic Receptors // J Med Chem. – 2019 – Т. 62. – № 4. – С. 1887-1901.
3. Vulfius C. A., Kasheverov I. E., Kryukova E. V., Spirova E. N., Shelukhina I. V., Starkov V. G., Andreeva T. V., Faure G., Zouridakis M., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Pancreatic and snake venom presynaptically active phospholipases A₂ inhibit nicotinic acetylcholine receptors // PLoS One. – 2017 – Т. 12. – № 10. – С. e0186206.
4. 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 alpha₇/alpha₉ nAChR mutants // PLoS One. – 2017 – Т. 12. – № 8. – С. e0181936. * Равный вклад авторов в работу
5. Vulfius C. A., Spirova E. N., Serebryakova M. V., Shelukhina I. V., Kudryavtsev D. S., Kryukova E. V., Starkov V. G., Kopylova N. V., Zhmak M. N., Ivanov I. A., Kudryashova K. S., Andreeva T. V., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Peptides from puff adder Bitis arietans venom, novel inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors // Toxicon. – 2016 – Т. 121. – С. 70-76.
6. Manetti D., Bellucci C., Dei S., Teodori E., Varani K., Spirova E., Kudryavtsev D., Shelukhina I., Tsetlin V., Romanelli M. N. New quinoline derivatives as nicotinic receptor modulators // Eur J Med Chem. – 2016 – Т. 110. – С. 246-258.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н., чл.-корр. РАН Тихонова Дениса Борисовича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1) не приведены значения коэффициентов Хилла для Рис. 22, 24, 28; не представлен анализ различий в значениях коэффициента Хилла; 2) отсутствуют пояснения, какая часть экспериментальных данных была получена автором или соавторами публикаций; 3) в тексте заключения отсутствует сопоставление полученных данных с современными исследованиями в данной области.

Отзыв официального оппонента д.х.н., профессора РАН Сергиева Петра Владимировича. Отзыв положительный, содержит следующие комментарии: 1) метод кальциевого имиджинга с сенсором Case12 может быть улучшен, если использовать стабильную клеточную репортерную линию; 2) для Рис. 21 и в

экспериментах по тестированию агонистов отсутствует контроль, заключающийся в регистрации агонист-индуцированных ответов клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей сенсор Case12, но не $\alpha 7$ никотиновый рецептор; 3) мутация L119D $\alpha 7$ рецептора не приводит к обращению действия эписбатидина, т.к., возможно, важен «ансамбль» аминокислот лиганд-связывающего участка; 4) важна ли ферментативная активность панкреатической фосфолипазы A_2 для ингибирования $\alpha 9\alpha 10$ никотинового рецептора?; 5) замечания к оформлению текста диссертации: заменить термин «экстрацеллюлярный» на «внеклеточный»; на стр. 61 приведена ссылка на рисунок, расположенный на 6 страниц позже.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания: 1) утверждение о том, что синтетические флуоресцентные индикаторы внутриклеточной концентрации Ca^{2+} значительно уступают белковым сенсорам слишком категорично; 2) не очень понятно, как удавалось провести измерения изменений флуоресценции кальциевого индикатора во всех лунках 96-л. плашки со скоростью 2 сек/лунку, если концентрации Ca^{2+} падала до базального уровня через 30-40 сек после добавления агониста, даже в присутствии PNU120596 (Рис. 21Б); 3) замечания к оформлению текста диссертации: Рис. 3, 5, 8, 10, 11 Обзора литературы слишком мелкие; в разделе Методы при описании трансфекции не указан тип используемого липофектамина.

Отзыв на автореферат к.б.н., с.н.с. лаборатории регенеративной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Вишняковой Полины Александровны. Отзыв положительный, замечаний нет.

Отзыв на автореферат к.б.н., н.с. кафедры биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» Сеферян Карины Рубеновны. Отзыв положительный, замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях молекулярной биологии, связанных с

исследованием функционирования белков, в т.ч. рецепторов, а также механизмов ингибирования белковых молекул, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан метод кальциевого имиджинга с сенсором Case12 для тестирования специфичности мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и нейронального $\alpha 7$ никотиновых рецепторов. Показано, что новый метод позволяет проводить быстрый скрининг потенциальных лигандов, а также изучать фармакологические свойства мутантных рецепторов. Продемонстрировано, что комбинация методов электрофизиологии и кальциевого имиджинга позволяет изучать структурные особенности, фармакологические свойства, а также механизмы взаимодействия с лигандами мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что получены новые структурные данные об ортостерическом участке связывания лигандов $\alpha 7$ никотинового рецептора; а также выявлены механизмы действия новых лигандов из числа низкомолекулярных (аналогов *d*-тубокурарина; производных хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин) и пептидно-белковых соединений (баптида 2; панкреатической фосфолипазы A_2) на мышечные и нейрональные никотиновые рецепторы. Эти знания расширяют представления о структурно-функциональных особенностях никотиновых рецепторов разных подтипов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработан и успешно внедрен в лабораторную практику метод кальциевого имиджинга с сенсором Case12 для тестирования специфичности мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и нейронального $\alpha 7$ никотиновых рецепторов. Выявлены эффективные агонисты и антагонисты никотиновых рецепторов из числа природных и синтетических молекул, анализ их структур является фундаментальной базой при разработке лекарств, применяемых при нарушениях

функционирования никотиновых рецепторов.

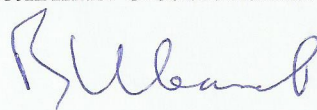
Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты экспериментальных работ были получены на сертифицированном оборудовании, проведены контрольные эксперименты, показана воспроизводимость результатов. Исследования проведены в полном объеме, проведен верный статистический анализ полученных данных. Значения EC_{50} классических агонистов для никотиновых рецепторов дикого типа и смешанный механизм ингибирования *d*-тубокурарином мышечного рецептора подтверждаются литературными данными.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и выполнении экспериментов, анализе и представлении данных. Все результаты, изложенные в диссертации, получены лично Спировой Е.Н., за исключением компьютерного моделирования, электрофизиологии *d*-тубокурарина и его аналогов с рецептором γ -аминомасляной кислоты (выполнены н.с. лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий к.б.н. Кудрявцевым Д.С.) и радиолигандного анализа (выполнен зав. лабораторией лиганд-рецепторных взаимодействий д.х.н. Кашеверовым И.Е). Спирова Е.Н. лично представляла результаты работы на научных конференциях и принимала активное участие в подготовке научных публикаций.

На заседании 9 октября 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Спировой Екатерине Николаевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 4 доктора наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 22, против 0, недействительных бюллетеней 0.

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



Иванов Вадим Тихонович

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



Олейников Владимир Александрович