

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Спировой Екатерины Николаевны «Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность темы диссертационной работы

Объектом исследования диссертационной работы Спировой Е.Н. являются нейрональные и мышечные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, дисфункция которых обуславливает развитие болезни Альцгеймера, шизофрении, хронической боли и миастений различных типов. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор представляет комплекс из пяти субъединиц, расположенных симметрично вокруг ионного канала. Комбинация субъединиц в составе пентамера определяет фармакологические свойства никотинового рецептора. Субъединицы никотиновых рецепторов имеют общее происхождение, однако фармакологические свойства рецепторов, состоящих из различных субъединиц, могут сильно отличаться, как например, в случае $\alpha 7$ и $\alpha 9$ гомопентамерных рецепторов. Выявление причин, обуславливающих такое различие между родственными субъединицами никотиновых рецепторов, возможно, прояснит некоторые новые аспекты функционирования никотиновых рецепторов, и эти знания помогут в разработке эффективных лекарственных средств.

Наряду с изучением структуры и механизмов функционирования самих никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, большое внимание уделяется поиску новых лигандов этих рецепторов. Цель такого поиска заключается в идентификации высокоаффинных и специфически действующих соединений, как из природных источников, так и синтезированных в лабораторных условиях. Знания о структурах этих соединений, в комбинации с изучением механизмов их действия на никотиновые рецепторы являются фундаментальной базой при разработке лекарственных препаратов.

Структура диссертации

Диссертационная работа Спировой Е.Н. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 293 наименования. Работа изложена на 118 страницах, включает 40 рисунков и 11 таблиц.

Во введении Спирова Е.Н. говорит об актуальности выбранной темы диссертационного исследования, в частности о важности изучения структурных особенностей никотиновых рецепторов, о необходимости поиска новых лигандов и

исследования механизмов их действия на рецепторы. Также во введении Екатерина говорит о возможности использования кальциевого имиджинга наряду с электрофизиологическим анализом для изучения функционирования никотиновых рецепторов. После автор переходит к формулированию цели и задач своего исследования.

Обзор литературы состоит из двух больших разделов, включающих несколько подразделов. В первом разделе литературного обзора (1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR)) Спирова Е.Н. достаточно подробно освещает современные знания о структуре, механизмах функционирования и биосинтезе никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (подразделы 1.1.1. – 1.1.3.). Далее Екатерина приводит информацию о известных лигандах никотиновых рецепторов: агонистов и антагонистов, и модуляторов, а также информирует читателя о конкурентном и неконкурентном механизмах связывания лигандов с рецепторами и формулирует критерии поиска новых лигандов (подраздел 1.1.4.). Особое внимание Екатерина уделяет вопросу о методах изучения различных лигандов и механизмов действия на никотиновые рецепторы. Она подробно излагает фундаментальную основу метода кальциевого имиджинга, т.к. в настоящее время данный метод рассматривается как альтернативный электрофизиологическому анализу метод тестирования никотиновых рецепторов (подраздел 1.1.5.).

Второй раздел обзора литературы (1.2. Отдельные представители nAChR) Спирова Е.Н. посвящает описанию структурных, функциональных и фармакологических особенностей мышечного (подраздел 1.2.1.), гомопентамерного $\alpha 7$ (подраздел 1.2.2.), гомопентамерного $\alpha 9$ и гетеропентамерного $\alpha 9\alpha 10$ (подраздел 1.2.3.).

В главе "Материалы и методы" Екатерина перечисляет все использованные ею материалы и оборудование (раздел 2.1) и обстоятельно описывает методы своего исследования (раздел 2.2.).

В главе "Результаты и обсуждение" Спирова Е.Н. последовательно излагает полученные результаты. Екатерина начинает с представления разработанной ею вариации метода кальциевого имиджинга с использованием генетически-кодируемого сенсора Case12. Автор доказывает применимость данной методики для изучения специфичности мышечного $\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$ и нейронального $\alpha 7$ никотиновых рецепторов (раздел 3.1.). Далее, «вооружившись» методом кальциевого имиджинга с Case12, Екатерина переходит к исследованию специфичности мутантных форм нейронального $\alpha 7$ никотинового рецептора для того, чтобы идентифицировать аминокислотные остатки, важные для связывания рецептором ацетилхолина и эпibatидина (раздел 3.2.).

Затем при помощи комбинации методов кальциевого имиджинга с Case12, электрофизиологического и радиолигандного анализов Екатерина тестирует новые

лиганды никотиновых рецепторов, как природного, так и синтетического происхождения (раздел 3.3.).

В Заключении Спирина Е.Н. кратко излагает свои достижения. Выводы диссертационной работы сформулированы подробно и полностью соответствуют поставленным цели и задачам. В конце диссертационной работы представлены списки сокращений и используемых литературных источников.

Подводя итог, диссертационная работа Спириной Е.Н. производит благоприятное впечатление. Выбранная область исследования является актуальной, результаты получены при помощи современных методов, экспериментальный материал полон и статистически обработан верно, а сформулированные выводы полностью отражают результаты работы.

Научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования

Одним из главных достижений Спириной Е.Н., представленных в ее диссертационной работе, является разработка метода кальциевого имиджинга с использованием генетически-кодируемого кальциевого сенсора Case12 для тестирования специфичности мышечного $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ и нейронального $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Данный метод имеет ряд преимуществ перед классическими методами изучения никотиновых рецепторов: радиолигандного анализа и электрофизиологических методов. Метод кальциевого имиджинга с Case12 может использоваться как для изучения функционирования как самих никотиновых рецепторов, так и для скрининга потенциальных лигандов рецепторов и изучения механизмов их действия. Все вышеперечисленные области применения были представлены в диссертационной работе Спириной Е.Н. Думаю, что предложенный метод кальциевого имиджинга с Case12 несомненно будет востребован в научном сообществе, т.к. данный метод характеризуется относительной простотой и высокой скоростью получения экспериментальных данных.

Разработанный метод кальциевого имиджинга с Case12 позволил Екатерине идентифицировать аминокислотный остаток в последовательности лиганд-связывающего сайта $\alpha 7$ субъединицы, замена которого на соответствующий остаток в последовательности $\alpha 9$ субъединицы приводит к значительному снижению способности никотинового рецептора активироваться под действием ацетилхолина и особенно эпibatидина. В своей диссертационной работе, Спирина Е.Н. предполагает, что эта аминокислотная замена является одной из возможных причин, объясняющих различие фармакологических свойств гомопентамерных $\alpha 7$ и $\alpha 9$ никотиновых рецепторов. Т.к. подтипы никотиновых рецепторов являются перспективными мишенями для лечения ряда заболеваний, несомненно важным является определение структурных особенностей

рецепторов, объясняющих различия в фармакологических свойствах рецепторов разных подтипов. Выявление таких структурных детерминант рецептора вместе с анализом химических формул высоко специфических лигандов позволят достичь лучшего результата при разработке лекарств для направленной терапии.

Весьма интересные результаты были получены Екатериной при исследовании природных структурных аналогов *d*-тубокуарина, бисбензилтетрагидроизохинолиновых алкалоидов ВВІQA1 и ВВІQA2, в качестве лигандов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Оба соединения, как и *d*-тубокуарин, эффективно блокируют большинство подтипов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, однако значительно хуже ингибируют серотониновый рецептор и рецептор γ -аминомасляной кислоты, других представителей семейства цис-петельных рецепторов. Большая специфичность действия алкалоидов ВВІQA1 и ВВІQA2 в отношении никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, по сравнению с *d*-тубокуарином, позволяет рассматривать их структуры как перспективные при разработке лекарственных препаратов, например, миорелаксантов.

Екатерина также продемонстрировала, что пептидно-белковые соединения баптид 2 из яда шумящей гадюки *Bitis arietans* и панкреатическая фосфолипаза A₂ свиньи выступают в роли эффективных антагонистов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, а также установлены механизмы их ингибирующего действия на рецепторы. Обнаруженный эффект панкреатической фосфолипазы A₂ на нейрональный $\alpha 9\alpha 10$ никотиновый рецептор чрезвычайно интересен, т.к. в организме человека данный подтип рецепторов вовлечен в процесс передачи болевого сигнала.

Помимо природных соединений в диссертационной работе Спировой Е.Н. изучены новые агонисты $\alpha 7$ никотинового рецептора, полученные в ходе химического синтеза: аналоги хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амина. Данная часть исследования подтверждает то, что знания о структурных особенностях соединений, необходимых для проявления активности в отношении никотиновых рецепторов, могут быть применены на практике для лабораторного синтеза эффективных лигандов никотиновых рецепторов.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Использованные Спировой Е.Н. в ее диссертационном исследовании методы современны и широко известны. Объем экспериментальных данных достаточен, для данных выполнен статистический анализ, вид анализа указан в подписях к рисункам, где также указано число биологических или технических повторов, поэтому представленные результаты не вызывают сомнений. При разработке кальциевого имиджинга с Case12 как

альтернативного метода тестирования выполнены все необходимые контрольные эксперименты, поэтому достоверность результатов, полученных в ходе кальциевого имиджинга также неоспорима. Часть результатов подтверждается ссылками на литературные данные.

Выводы диссертационной работы Спириной Е.Н. сформулированы четко, они полностью соответствуют полученным результатам работы. Текст автореферата в полной мере отражает суть диссертационной работы, в нем также представлены основные результаты и выводы.

Замечания к диссертационной работе. Несмотря на общий высокий уровень работы, имеется ряд замечаний и вопросов.

1. При анализе концентрационных зависимостей совершенно игнорируется такой параметр как коэффициент Хилла. Значения параметра приводятся в некоторых случаях (Таблицы 10 и 11). Изменения значительны и достоверны. Однако выявленные различия никак не обсуждаются. В других случаях (Рисунки 22, 24, 28) различия в наклоне ясно видны, но значения не приводятся и никак не обсуждаются. Необходимы пояснения. Как автор трактует наблюдаемые различия в коэффициентах Хилла?
2. В работе описан большой набор различных экспериментов и связанный с этим большой набор экспериментальных и теоретических методик. Что из этого было сделано лично и самостоятельно автором, а что – с участием многочисленных соавторов публикаций по теме работы?
3. Общее заключение написано излишне кратко. Хотя текст заключения дает полное представление о диссертационной работе и важности представленных в ней результатов, отсутствует сопоставление полученных данных с современными исследованиями в данной области.

Данные замечания носят дискуссионный характер и не умаляют достоинств представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Спириной Е.Н. является актуальным и полным научным исследованием, выполненным на высоком методическом и научном уровне.

Диссертационная работа Спириной Екатерины Николаевны «Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и

электрофизиологии» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Заведующий лабораторией
биофизики синаптических процессов,
заместитель директора по научной работе
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, д.б.н.

Тихонов Денис Борисович

194223, Санкт-Петербург,
проспект Тореза, дом 44
Тел. (812) 552-31-38. E-mail: denistikhonov2002@yahoo.com

Подпись д.б.н. Тихонова Д.Б.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИЭФБ РАН

к.б.н. Гальперина Е.И.



МП