

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГИИ имени В.В. ЗАКУСОВА»
(ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)**

Балтийская ул., д. 8, Москва, 125315
Тел.: +7(499) 151-18-81, +7(495) 601-23-62 Бухг.: +7(499) 151-12-07, +7(495) 601-22-92 Факс: +7(499) 151-12-61
E-mail: zakusovpharm@mail.ru www.academpharm.ru

ОКПО 01897340 ОГРН 1027739881179 ИНН 7712020313 КПП 774301001

10.02.2020 № 01-30

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова»,
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН,
Дурнев Андрей Дмитриевич



10 февраля 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию **Лебедева Дмитрия Сергеевича**
«Природные и синтетические лиганды никотиновых и ГАМК-А рецепторов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа Лебедева Д.С. посвящена изучению лигандов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) и рецепторов гамма-аминомасляной кислоты типа А (ГАМК-А). Оба этих рецептора являются хорошо известными объектами исследования и входят в семейство суз-петельных рецепторов. Все лиганд-активируемые ионные каналы этого суперсемейства организованы в виде кольца из пяти субъединиц, формирующих центральную пору. Связывание агониста приводит к открыванию ионной поры и прохождению потока ионов через плазматическую мембрану клетки, что приводит к падению трансмембранного потенциала.

Несмотря на долгую историю изучения нАХР и ГАМК-А рецептора, исследования этих ионных каналов всё ещё представляются крайне актуальными. В первую очередь, из-

за вовлечения данных рецепторов в колоссальное число разнообразных физиологических процессов и, как результат, их огромной фармакологической значимости. nAHR мышечного типа составляют функциональную основу нервно-мышечных синапсов, их нейрональные подтипы пресинаптически модулируют выброс нейромедиаторов, участвуют в формировании возбуждающих синапсов и в гуморальной регуляции активности иммунных клеток. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы – мишень действия миорелаксантов, перспективных обезболивающих и противовоспалительных, а также препаратов от деменции и когнитивных расстройств, ассоциированных с шизофренией. Лигандами ГАМК-А рецептора являются многие седативные препараты, включая такие известные как бензодиазепины и барбитураты. Поиск, направленный дизайн и синтез высокоафинных лигандов, обладающих селективным действием на отдельные подтипы перечисленных рецепторов до сих пор остаётся актуальным вопросом фармакологии. Фундаментальная наука также нуждается в веществах, способных стать инструментами селективной активации/блокирования и визуализации отдельных подтипов никотиновых и ГАМК-А рецепторов. Все перечисленные доводы лишь подтверждают актуальность выбранной диссертантом темы.

Диссертация Лебедева Д. С. построена по классическому образцу. Её текст состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список сокращений и список литературы. Материал диссертации изложен на 117 страницах. Работа включает 3 таблицы и 25 рисунков. Список литературы содержит ссылки на 217 источников.

Во введении диссертант кратко описывает тематику своей работы и её степень разработанности. Перечисляются цели и задачи исследования, разбирается вопрос новизны и практической значимости работы, упоминаются методы, использованные диссертантом. В конце введения перечисляются положения, выносимые на защиту и список научных публикаций, ставших материалом для текущей работы. Введение удачно предоставляет читателю краткий обзор предмета исследования и содержания диссертационной работы.

Обзор литературы имеет собственное введение и заключение, а также три тематических главы, посвящённые принципам организации сус-петельных рецепторов, разнообразию лигандов nAHR и, наконец, участию nAHR в патогенезе и его фармакологии. Объём, логика и степень проработанности обзора литературы заслуживают самой высокой оценки.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробный список реактивов, использованных Лебедевым Д.С. в ходе работы, после чего перед читателем предстаёт описание непосредственно методов работы. Описание методов, использованных в диссертационной работе, выглядит полным и подробным. Данный раздел позволяет составить исчерпывающее представление о методах работы.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из введения и шести частей, соответствующих логике работы и особенностям объектов изучения. Первая часть описывает выделение и электрофизиологическое исследование низкомолекулярных агонистов ГАМК-А рецептора из паротидных желёз жабы *Bufo bufo*. Объектом исследования диссертанта, описанного в следующем разделе, также становятся природных лиганды сус-петельных рецепторов, однако на этот раз уже белковые «трёхпетельные» нейротоксины. Методами электрофизиологии, автор описывает различия в действии нового $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 из *Bungarus candidus* и классического α -бунгаротоксина на НАХР различных подтипов.

Далее объектом исследования становятся короткие пептиды, повторяющие последовательность петли II белков семейства $Lyb/uPAR$ – близких гомологов упомянутых выше «трёхпетельных» токсинов. Затем в работе представлено исследование пептидных лигандов – синтетических фрагментов белков *Lynx1* и *SLURP1*, *SLURP2*, синтетических аналогов конотоксинов и полиаргининовых пептидов. Последняя часть «Результатов и обсуждения» посвящена изучению антихолинергических свойств ряда катионных полимеров.

Выводы диссертационной работы сформулированы чётко и внятно. Содержание выводов полностью соответствует поставленным целям и задачам.

Текст диссертации завершают заключение, список сокращений и перечень литературных источников.

Результаты диссертационной работы Лебедева Д.С. без сомнения имеют как прикладную, так и фундаментально-научную ценность. Среди преимущественно фундаментально-научных результатов стоит выделить открытие крайне любопытных свойств $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1, резко отличающих его от его близкого аналога – классического α -бунгаротоксина.

Скорее практическую значимость для методологии будущих исследований имеет изучение электрофизиологических свойств йодированных аналогов конотоксинов RgIA и GeXIVA.

Несомненно, ярким результатом работы является демонстрация ингибирующих свойств пептидов, производных петли II белков Lynx1, SLURP1 и SLURP2 на nAHP $\alpha 9\alpha 10$ и $\alpha 3\beta 2$ типа. Относительно короткие пептиды, воспроизводящие активность полноразмерных белков, но обладающие меньшим молекулярным весом, имеют значительный фармакологический потенциал. Исследование стоит считать хорошим примером направленного конструирования фармакологически-перспективных пептидных лигандов путём воспроизведения пептидом-аналогом «функционального ядра» белковой молекулы.

Одной из самых важных частей работы стало исследование ингибирующих свойств олигоаргининовых пептидов и катионных полимеров в отношении различных подтипов nAHP. На протяжении последних лет проникающие пептиды богатые остатками аргинина неоднократно предлагались в качестве средства направленной доставки фармакологически-активных веществ через клеточные мембраны. Их способность к эффективному проникновению через плазматические мембраны, а также к связыванию больших объёмов анионных субстанций сделали их идеальным кандидатом на роль средства доставки нуклеиновых кислот, в частности антисмысловых РНК, модулирующих трансляционную активность клеток. Аналогичными способностями к связыванию и транспорту РНК/ДНК обладают и катионные полимеры, способные так же к избирательному проникновению и накоплению в опухолевых тканях. В ходе работы, диссертанту удалось продемонстрировать ингибирующий эффект ряда олигоаргининовых (R6, R8, R16) и аргининсодержащих пептидов (W2R4) на nAHP $\alpha 7$, $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 3\beta 2$ и мышечного типов. Аналогичные антихолинергические свойства были обнаружены и у нескольких катионных полимеров. Все эти данные позволяют предположить возможность развития серьёзных побочных эффектов при применении упомянутых соединений в клинической практике, что является важнейшим научно-прикладным итогом работы.

Автореферат диссертации написан грамотным научным языком. Он содержит все основные научные результаты работы и позволяет составить полноценное представление о диссертационной работе автора.

Вместе с тем, при чтении работы возникли некоторые вопросы и замечания:

- 1) В первой части исследования автор использовал метод локальной фиксации потенциала («пэтч-кламп») на клетках НЕК293 для изучения действия компонентов секрета паротидных желёз серой жабы на ГАМК-А рецептор $\alpha 1\beta 3$ типа. Затем, в одной из завершающих частей работы, для исследования действия олигоаргининовых пептидов на ГАМК-А рецептор $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ типа, уже

был использован метод двухэлектродной фиксации на ооцитах шпорцевой лягушки. К сожалению, в работе не объясняется, почему для решения схожих задач были применены разные методы электрофизиологии.

- 2) Компактный размер некоторых рисунков автореферата затрудняет чтение подписей и названий осей на графиках (см. Рисунок 13). Некоторые графики выглядят загромождёнными в силу большого количества данных (см. Рисунок 9).
- 3) В тексте диссертационной работы имеется ряд неточностей и опечаток, не оказывающих существенного влияния на содержание работы.

Стоит заметить, что перечисленные замечания не умаляют научной ценности работы и имеют главным образом технический характер. Диссертационная работа Лебедева Дмитрия Сергеевича представляет собой грамотное, полноценное научное исследование, посвящённое актуальным проблемам изучения лигандов сус-петельных рецепторов. Достоверность результатов и обоснованность выводов диссертации не вызывает никаких сомнений.

Диссертационная работа Лебедева Дмитрия Сергеевича соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Отзыв обсуждён и утверждён на семинаре Отдела химии лекарственных соединений (протокол №1 от 10 февраля 2020 г.).

Руководитель Отдела химии лекарственных соединений
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»,
профессор, д.б.н., чл.-корр. РАН

Гудашева Татьяна Александровна

125315, Москва,
ул. Балтийская, д.8., т: (495) 601-2246,
gudasheva@academpharm.ru

Подпись Гудашевой Т. А. заверяю,
Ученый секретарь
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»
к.б.н.



Крайнева В.А.