

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу 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

Актуальность исследования. Ионотропные рецепторы ацетилхолина и ГАМК являются классическими объектами физиологических, фармакологических и биофизических исследований. К настоящему времени их роль, строение и способы модуляции достаточно хорошо изучены. Особое значение в последнее время представляют собой структурные исследования – рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия, которые позволили определить детали молекулярной организации и механизмы работы этих ионных каналов. Однако поиск новых лигандов никотиновых холинорецепторов и рецепторов ГАМК продолжает оставаться актуальной задачей нейрофармакологии. Особенно перспективным является поиск лигандов, обладающих специфичностью относительно разных подтипов рецепторов. Использование таких лигандов позволяет тонко регулировать работу рецепторов, что важно как для медицинской практики, так и для физиологических исследований конкретной роли конкретных подтипов. Именно такая задача по поиску новых лигандов и была поставлена в данной работе.

Научные результаты работы и их новизна. Автором в ходе работы проведен ряд исследований по обнаружению и характеристике новых лигандов. Основой для поиска послужили природные яды. Такие яды являются своеобразными библиотеками биологически активных соединений. Для многих природных токсинов мишенями являются как раз ионные каналы, обеспечивающие проведение и передачу сигналов нервной системе, поскольку поражение нервной системы является одной из оптимальных стратегий для быстрого действия ядов. В работе обнаружено, что аргининовые производные дикарбоновых кислот из секрета паротидных желёз жабы *Bufo bufo* являются агонистами ГАМК-А рецепторов. Также выявлен новый аналог классического α -бунгаротоксина - $\alpha\delta$ -бунгаротоксин-1 из яда *Bungarus candidus*. Кроме этого показано, что синтетические фрагменты центральной петли белков Lynx1 и SLURP1 являются антагонистами nAChR, частично воспроизводя активность полноразмерных белков. Также установлено, что полиаргининовые пептиды представляют собой новое семейство антагонистов nAChR. Наконец, автором выявлено ингибирующее действие клинически перспективных векторы доставки нуклеиновых кислот – катионных полимеров.

Исследования выполнены при помощи электрофизиологических отведений активности рекомбинантных рецепторов, экспрессированных в клетках HEK293 и ооцитах *Xenopus laevis*. Также использовался кальциевый имиджинг на клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP. Данные методики являются надежными и адекватными поставленным задачам по поиску новых лигандов ионотропных рецепторов. Все полученные в ходе работы результаты являются новыми. Достоверность и значимость не вызывают сомнений. Высокое качество работы подтверждается публикациями автора в международных журналах с высоким рейтингом. Biochemical Journal, Frontiers in Pharmacology и Molecular Pharmacology относятся к изданиям рейтинга Q1.

Научное и практическое значение результатов работы. Основное значение работы состоит в обнаружении новых лигандов. Так, впервые продемонстрировано наличие агонистов ГАМКАР в секрете паротидных желёз земноводных, а также установлена их химическая структура. Охарактеризован неклассический $\alpha\delta$ -бунгаротоксин-1 из яда малайского крайта *Bungarus candidus*, и сделаны выводы о структурных детерминантах его кинетики и специфичности. Изучены свойства синтетических фрагментов белков семейства Lуб/uPAR и продемонстрирован их потенциал в качестве ингибиторов nAHP. Еще одним важным достижением данной работы является открытие нового класса ингибиторов nAHP – полиаргининовых пептидов. Исследованные вещества могут стать прототипами новых классов лигандов ионных каналов рецепторов ГАМК и ацетилхолина.

Практически значимым результатом исследования является открытие холинергического действия катионных полимеров. Эти соединения являются перспективными векторами доставки нуклеиновых кислот и анионных терапевтических субстанций. Таким образом, результаты работы позволяют в дальнейшем определить побочные эффекты применения этих веществ в медицинской практике

Содержание работы. Диссертационная работа Д.С. Лебедева построена по классической схеме, состоит из 117 страниц, содержит 217 литературных источников. Диссертация включает все необходимые разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение. В целом, диссертационная работа адекватно отражает полученные результаты и дает полное представление о проделанной работе. Диссертация хорошо проиллюстрирована – содержит 25 рисунков высокого качества, что существенно облегчает понимание текста. Результаты хорошо структурированы. Выводы

диссертации отлично сформулированы, то есть не являются кратким повторением результатов, а содержат обобщающие положения, наглядно показывающие значимость полученных результатов. Автореферат написан четко и содержательно. В нем достаточно подробно приведены наиболее значимые результаты.

Замечания

Несмотря на общую высокую оценку работы, необходимо высказать ряд замечаний и вопросов.

1. В диссертации регулярно используются выражения «нами было проведено исследование», «наша гипотеза» и т.д. В таких формулировках личный вклад автора в проведенные исследования нельзя оценить однозначно. Тем более, что все работы опубликованы в соавторстве с целым рядом других исследований. Хотелось бы услышать, что было сделано автором лично и каков вклад других соавторов в опубликованные работы.
2. Хотя литературный обзор дает общее представление о проблематике, на мой взгляд он недостаточно сфокусирован на тематике исследований, то есть содержит главным образом общую информацию.
3. Методы написаны так, как их обычно описывают в статьях. В научно-квалификационной работе, какой является диссертация хотелось бы видеть более развернутое описание с обоснованием использования конкретных подходов, а также суть самих методов.
4. В работе много концентрационных кривых, которые очевидно аппроксимировались уравнением Хилла для определения полуэффективных концентраций. Однако коэффициенты Хилла, получаемые при аппроксимациях, не приведены. Между тем даже на глаз видно, что в ряде случаев наблюдаются значимые различия в наклоне концентрационных зависимостей, что отражает различную кооперативность действия лигандов. Кооперативность эффектов не обсуждается совсем.

Данные замечания не умаляют несомненных достоинств диссертационной работы Д.С. Лебедева.

Заключение

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.

Официальный оппонент, 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., чл.-корр.

Тихонов Денис Борисович

94223, Россия, г. Санкт-Петербург,
проспект Тореза, д. 44,
denistikhonov2002@yahoo.com
Тел.: (812)-552-31-38

Подпись д.б.н. Тихонова Д.Б.
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ИЭФБ РАН
кандидат биологических наук

4 марта 2020 г.



Гальперина Елизавета Иосифовна