

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 темы диссертационной работы

Ионотропные рецепторы, управляемые эндогенными лигандами, ацетилхолином (никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, nAChR) и гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК-А-рецепторы), несмотря на то что относятся к наиболее изученным каналобразующим рецепторам плазматической мембраны, продолжают оставаться объектом пристального внимания. Это обусловлено, прежде всего, тем, что их пространственная структура и динамика функционирования служат платформой для изучения свойств большого ряда других субъединичных канал-формирующих рецепторов. Не менее важно и то, что разнообразные биологически активных веществ, получаемые из животных совершенно разных таксонов (насекомых, моллюсков, пресмыкающихся, млекопитающих), оказываются чрезвычайно эффективными и полезными инструментами исследования тонких деталей структуры и механизмов функционирования nAChR- и ГАМК-А-рецепторов. В этой связи очевидна актуальность диссертационной работы Дмитрия Сергеевича Лебедева, посвященной выявлению и детальной характеристике активных по отношению к ГАМК-А-рецепторам компонентов кожных желёз земноводного (жабы), тестированию синтетических аналогов пептидных ингибиторов nAChR из яда моллюсков и синтетических аналогов эндогенных модуляторов nAChR семейства Lub/uPAR . Наконец, была проверена гипотеза о возможной ингибиторной способности нового класса лигандов, олигоаргининовых пептидов и пептидов смешанного $\text{W}_{1,2}\text{R}_{2,4}$ -состава по отношению к nAChR различной субъединичной композиции. Такой разносторонний, как по подбору испытанных объектов, так и по использованным методам подход, делает диссертационную работу Д.С.Лебедева актуальной в области фундаментальных молекулярно-биологических исследований и перспективной в прикладных медико-биологических направлениях.

Структура диссертации

Текст диссертационной работы построен по традиционной схеме. Он включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список сокращений и список литературы. Материал диссертации изложен на 117 страницах. Работа содержит 25 рисунков, 3 таблицы, а в список литературы включены ссылки на 217 источников.

В главе Введение диссертант в сжатой форме излагает содержание и актуальность выбранной им темы. Так же во введении автор компактно формулирует цели и задачи своей работы, говорит об особенностях методологии, перечисляет положения, выносимые им на защиту. В завершении этой главы приведён список публикаций, результаты которых вошли в диссертацию. Введение грамотно структурировано, оформлено в соответствии с рекомендациями ГОСТа и позволяет в сжатой форме получить представление о содержании работы.

Обзор литературы состоит из вводной части, трёх разделов и заключения. Первый раздел обзора (2.2) посвящён разбору принципов устройства и работы сус-петельных рецепторов на примере nAHP и ГАМК-А рецепторов. Здесь хочется отметить глубокое изложение автором механизма ионной селективности nAHP, актуальное представление механизмов его активации и десенситизации. Второй раздел (2.3) содержит информацию об известных лигандах nAHP, механизмах их действия на рецептор, а также их использовании в фундаментальных исследованиях и фармакологии. Особое внимание уделено описанию классификации лигандов на основании механизма их действия на рецептор. Раздел (2.4) продолжает тему терапевтического потенциала и фармакологии исследуемых рецепторов. В нём освещается участие различных подтипов nAHP в патологических процессах и особенности их фармакологии. Обзор даёт достаточно подробную информацию об объекте исследования диссертанта, позволяя лучше разобраться в логике его работы. Некоторые недостатки Обзора отмечены ниже в разделе Замечания.

Глава «Материалы и методы» разделена на две части. Первая из них включает список использованных диссертантом реактивов. Далее Дмитрий Сергеевич довольно обстоятельно описывает методы, применяемые им в ходе исследования.

В главе «Результаты и обсуждение» автор последовательно излагает результаты научных исследований, включённых в диссертационную работу. Очевидно, что логика представления материала соответствует хронологии исследования. В первых подразделах данной части диссертант описывает выделение и исследование лигандов сус-петельных рецепторов из природных источников: низкомолекулярные лиганды ГАМК-А секрета кожных желёз амфибий, «трёхпетельные» белковые нейротоксины из яда змей. Затем фокус исследования переключается на конструирование синтетических аналогов белков семейства Lu6/uPAR – эндогенных модуляторов nAHP, структурно близких вышеупомянутым «трёхпетельным» нейротоксинам. Следующий подраздел посвящён синтетическим аналогам конотоксинов, пептидных ингибиторов nAHP из яда моллюсков

семейства Conus. Именно анализ структуры конотоксинов (GEXIVA, RgIA) и их синтетических аналогов, приводит к синтезу нового семейства ингибиторов nAHP – олигоаргининовых пептидов и катионных полимеров, изучению которых посвящены последние подразделы «Результатов и обсуждения».

Выводы диссертационной работы сформулированы чётко и полностью отражают поставленные Лебедевым Д.С. цели и задачи. В Заключение диссертант подводит итог научным результатам своего исследования, обозначая их значение и перечисляя особенности проделанной работы.

Научные результаты работы

Без сомнения, главным научным достижением работы является открытие нового семейства ингибиторов nAHP – олигоаргининовых пептидов. Лебедевым Д.С. было обнаружено, что пептиды состава R6, R8, R16, а также пептид смешанного триптофан-аргининового состава W2R4 способны селективно связываться с различными подтипами nAHP. Методами двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки, а так же флуоресцентного кальциевого имиджинга на клетках Neuro2A им был продемонстрирован ингибирующий эффект данных соединений на nAHP мышечного, $\alpha 7$, $\alpha 9\alpha 10$ и $\alpha 3\beta 2$ типов. Исследуемые пептиды проявили некоторую селективность в отношении типа рецептора. Выраженность их ингибирующего эффекта продемонстрировала определённую зависимость от длины цепи и её аминокислотного состава. На основании данных электрофизиологии, флуоресцентного имиджинга и радиолигандного анализа автором было сделано предположение о двойственном механизме ингибирующего действия данной группы соединений – как за счёт конкурентного ингибирования ортостерического сайта рецептора, так и за счёт блокирования ионселективной поры. Для доказательства своей гипотезы автором была проведена серия оригинальных электрофизиологических опытов (сдвиг кривой силы ингибирования в зависимости от дозы, получение вольт-амперные характеристики). Результаты этой части работы несомненно имеют значение как со стороны фармакодизайна, так и со стороны фундаментальных исследований лиганд-рецепторных взаимодействий.

Другим интересным фундаментально-научным результатом работы является нахождение и изучение целого спектра новых лигандов никотинового ацетилхолинового и ГАМК-А рецепторов. Впервые из кожного секрета амфибий выделены агонисты ГАМКА-А рецептора. Продемонстрировано своеобразие ингибирующих свойств нового белкового нейротоксина – $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 из яда *Bungarus candidus*. Любопытно, что этот новый аналог классического, широко известного с 70-х годов прошлого века α -

бунгаротоксина, демонстрирует неожиданные свойства, обратимо ингибируя как гетеромерный нейрональный nAHP $\alpha 3\beta 2$ типа, так и мышечный nAHP.

Ещё одним весомым итогом работы стало изучение активности синтетических фрагментов петли II белков Lynx1 и SLURP1/2 семейства Ly6/uPAR. Диссертантом был показан ингибирующий эффект ряда подобных соединений на nAHP $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ типов. Такой результат свидетельствует о частичном воспроизведении сравнительно короткими синтетическими пептидами активности своих полноразмерных аналогов, имеющих несравнимо больший молекулярный вес. Низкий молекулярный вес будет способствовать потенциально большей биодоступности и лёгкости синтеза данных соединений, открывая перспективы дальнейших исследований, особенно в области фармакологии.

Практическую значимость имеет и обнаружение nAHP-ингибирующих свойств у катионных полимеров, давно считающихся перспективным инструментом доставки фармакологических субстанций. Обнаружение данного эффекта может иметь значение, как для снижения побочных эффектов данных препаратов, так и для придания им выраженного антихолинергического эффекта, если это потребуется.

В исследовании используется комбинация из методов радиолигандного анализа, методов электрофизиологии (локальная фиксация потенциала в конфигурации whole-cell на эукариотических клетках и двухэлектродная фиксация потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки) и флуоресцентного кальциевого имиджинга. Необходимо отметить, что именно успешная комбинация сразу нескольких методов позволила всесторонне оценить активность исследуемых соединений. Особенно ярко это проявляется в части работы, посвящённой полиаргининовым пептидам.

Достоверность полученных Дмитрием научных результатов не вызывает сомнения. Выводы диссертационной работы лаконичны, понятны, сформулированы на основании критической интерпретации экспериментальных данных и полностью отражают их суть. Все поставленные в начале исследования задачи успешно выполнены. Автореферат Лебедева Д.С. даёт исчерпывающее представление о новизне и актуальности его диссертационной работы, основных результатах и выводах.

Замечания

1. Непривычно то, что в списке литературы нет упоминаний публикаций в отечественных изданиях. Вместе с тем база данных РИНЦ показывает, что в одном только 2019 г. таких публикаций, причем с участием Руководителя диссертанта Виктора Ионовича Цетлина, было не менее четырех. Ссылка [65] в Разделе удивляет тем, что Дмитрий Сергеевич не привел гораздо более цитируемые обзоры своего Руководителя по этой же теме о структуре и свойствах трехпетельных нейротоксинов из яда змей.

2. В обзоре литературы автор ничего не рассказал о свойствах аргининовых олигопептидов, хотя отметил и в диссертации, и в автореферате то, что их довольно давно применяют для облегчения проницаемости клеточной мембраны для высокомолекулярных веществ.

3. Глава «Материалы и методы» была бы еще более полезной для читателя, если бы автор указал ссылки на работы откуда позаимствованы методы. Например, на статьи авторов флуоресцентного белкового сенсора ионов кальция Case12, в которых он был использован и охарактеризован.

4. Заметное место в полученных результатах принадлежит определению равновесных параметров связывания испытанных веществ по вытеснению радиоактивно меченых лигандов (токсинов), однако в главе «Материалы и методы» отсутствует даже упоминание об этом. Если причиной является то, что эта часть была выполнена не целиком автором диссертации, то следовало указать, в каком подразделении и кто помогал в выполнении указанной части исследования.

5. Глава «Материалы и методы» была бы более полноценной, если бы завершалась указанием на использованные методы статистики и программы обсчета. Результаты статистической обработки данных приведены в тексте и подписях к рисункам, но не достаточно подробно.

6. Измерения на плащечном ридере Hidex Sence не относятся к категории имиджинга, т.к. регистрируется не изображение клеток, а усредненный сигнал по всей клеточной популяции в каждой лунке планшета.

7. В разделе Результаты диссертации и автореферата сказано, что «...метод кальциевого имиджинга был использован для изучения лиганд-индуцированного ионного тока...». Если бы в методах Лебедев Д.С. рассмотрел свойства Case12, то возможно избежал бы этой ошибки. Кальциевый имиджинг отражает не ионный ток, а ионный баланс, динамическое равновесие между скоростью поступления Ca^{2+} в цитозоль и скоростью его удаления оттуда в результате откачивания во внеклеточный буфер и захват внутриклеточными Ca^{2+} депо.

Считаю необходимым подчеркнуть, что упомянутые замечания носят чисто технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не влияют на научную ценность диссертационной работы. В целом же, диссертационная работа Лебедева Д.С. представляет собой полноценное, грамотно спланированное и проведённое научное исследование, на актуальную тему, имеющую как практическое, так и фундаментально-научное значение.

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 нейробиологии и основ развития мозга,
Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский Центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор биологических наук.



Сурин Александр Михайлович

06.03.2020

119991, Москва, Ломоносовский проспект, д.2, стр.1,
Тел. (499)134-14-45, e-mail: surinam@nczd.ru

Подпись д.б.н. Сурина А.М.

«Удостоверяю»

Заместитель директора по научной работе
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России
доктор медицинских наук



Антонова Елена Вадимовна