

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА  
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от «19» мая 2016 г. № 7о присуждении  
Макаровой Яне Владиславовне, гражданство Российская Федерация, учёной степени  
кандидата химических наук.

Диссертация «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток РС12» по специальности 03.01.04 Биохимия, принята к защите 25 февраля 2016 г. (протокол № 2) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. №74/нк и от 10.02.2014г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Макарова Яна Владиславовна, 1980 года рождения, в июне 2002 г. окончила Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет по специальности «микробиология». В октябре 2002 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук, где проходила обучение по октябрь 2005 г. Диссертационную работу соискатель Макарова Я.В. выполняла в Отделе молекулярных основ нейросигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - Уткин Юрий Николаевич, доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярной токсикологии, Отдела молекулярных основ нейросигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Чеботарева Наталья Александровна, доктор биологических наук Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии бска;

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук в своем положительном заключении, указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённом Постановлением Правительством Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области биохимии. Так, доктор биологических наук, Чеботарева Наталья Александровна известна своими исследованиями структуры белков и механизмов белок-белковых взаимодействий. В сфере интересов другого оппонента Хомутова Алексея Радиевича лежат исследования таких биологических процессов как клеточная пролиферация, метаболизм и дифференцировка клеток в норме и при патологии. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в Институте биологии клетки РАН проводятся нейробиологические и электрофизиологические исследования, тесно связанные с тематикой представленной диссертационной работы, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

В ходе диссертационной работы был получен 1 патент Российской Федерации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 4 статьях рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842:

1. **Макарова Я.В.**, Осипов А.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Влияние фосфолипаз A2 из ядов змей на рост нейритов и выживаемость клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы, Биохимия 71 (2006) 838-846.
2. Osipov A.V., Kasheverov I.E., **Makarova Y.V.**, Starkov V.G., Vorontsova O.V., Ziganshin R.K., Andreeva T.V., Serebryakova M.V., Benoit A., Hogg R.C., Bertrand D., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification, J. Biol. Chem. 283 (2008) 14571-14580.
3. Osipov A.V., Filkin S.Y., **Makarova Y.V.**, Tsetlin V.I., Utkin Y.N., A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the Najahaje cobra venom, Toxicon 55 (2010) 186-194.
4. Tsai I.H., Wang Y.M., Cheng A.C., Starkov V., Osipov A., Nikitin I., **Makarova Y.**, Ziganshin R., Utkin Y., cDNA cloning, structural, and functional analyses of venom phospholipases A<sub>2</sub> and a Kunitz-type protease inhibitor from steppe viper *Viperaursiniirenardii*. Toxicon 57 (2011) 332-341.

Результаты работы также были представлены на 6 отечественных и 5 зарубежных конференциях:

Международной конференции по физико-химической биологии, посвященной 70-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова (Москва, 2004), научной конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005), конференции "Рецепция и клеточная сигнализация" (Пушино, 2005), VIII чтениях, посвященных памяти академика Ю.А.Овчинникова (Москва-Пушино, 2006), 15th WorldCongressonAnimal, PlantandMicrobialtoxins (Glasgow, 2006), 16th EuropeanSectionMeetingoftheInternationalSocietyonToxinology (Leuven, 2008), 8th IST-AsiaPacificMeetingonAnimal, Plant&MicrobialToxins (Hanoi, 2008), XX зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва-Пушино, 2008), 16th WorldCongressoftheInternationalSocietyonToxinology (Recife 2009). V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск 2011), 9th IST-AsiaPacificMeetingonAnimal, Plant&MicrobialToxins, (Vladivostok 2011).

#### **Патент:**

Патент РФ № 2369615 от 10.10.2009 Прямой ингибитор тромбина, обладающий антипролиферативным действием. Осипов А.В., Филькин С.Ю., **Макарова Я.В.**, Уткин Ю.Н.

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

#### **На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Чеботаревой Н.А.** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- В связи с большой по объему информативной составляющей данного исследования и широким спектром изучаемых компонентов охватить в полной мере данную проблематику представлялось трудной задачей. На мой взгляд, в работе очень большой литературный обзор, который занимает более 50% объема диссертации. Автор увлекался деталями: так, например, предположительному механизму действия цитотоксинов уделено слишком много внимания. Также, возможно, чересчур много написано про фосфолипазы А2 не змеиного происхождения.
- При исследовании гетеродимерных трехпетельных токсинов, цитотоксичность измеряли с помощью МТТ-теста. Для чего клетки подсчитывали еще и методом окрашивания трипановым синим?
- При исследовании фосфолипаз А2 можно заметить, что цитотоксичность и ферментативная активность не коррелируют между собой. Так у СМ2 и битанарина близкая ферментативная активность, но при равных высоких концентрациях цитотоксичность у битанарина отсутствует. Есть ли этому объяснение?
- Гипотеза о неферментативном нейритогенном воздействии некоторых фосфолипаз А2 интересна и требует тщательной верификации и дополнительных исследований.

**Отзыв официального оппонента доктора химических наук Хомутова А.Р.** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- разделе «2.5.1. Общепринятая классификация» литературного обзора, по – видимому, содержит избыточную информацию о фосфолипазах А2 - такое подробное описание не представляется необходимым.
- в разделе «4.2 Новые трехпетельные токсины» на стр.75-79 большое число заимствованных рисунков и результатов.
- данные табл.7 («Результаты и обсуждения») можно было объединить с данными табл.8.
- на рис.20 стр. 91 у фосфолипазы СМ2 нейритогенная активность ниже, чем у нее же в рис.23 стр. 97. С чем это связано?

**Отзыв Ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биофизики клетки Российской академии наук**(положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- На стр. 89 и рис 20 приводятся данные по колоколообразной концентрационной зависимости действия ФГД1 на рост отростков. Предположительное объяснение: более сильное цитотоксическое действие в отношении дифференцированных клеток. Эта гипотеза интересна и заслуживает экспериментальной проверки.
- Непонятно, почему битанарин, обладая высокой фосфолиполитической активностью (значительно выше, чем ФГД1 и ФГД-2), не цитотоксичен вообще, а фосфолипазы из яда *Viperaursiniirenardii*, еще более активные ферменты, проявляют цитотоксический эффект только в концентрации 10 мкМ. Что мешает этим белкам гидролизовать фосфатидилхолин или почему в этих условиях нарушение структуры мембраны не приводит к гибели клеток? Крайне желательно продолжение работы в этом направлении.
- В таблице 8 на стр. 107 нейритогенез под действием разных фосфолипаз представлен для слишком широкого диапазона концентраций – больше трех порядков. Это не слишком удачно, т.к. скрадывает большую разницу в дифференцирующей активности ФЛА2.

- Есть некоторое количественное расхождение фосфолипазной активности (VurPL2, CM2 > ФГД1Ф > ФГД2Ф > ФГД1 > ФГД2) и цитотоксичности (ФГД2Ф ≥ ФГД1Ф > ФГД2 > ФГД1 > CM2 >> VurPL2). Как это можно было бы объяснить?
- Выяснение причины отсутствия цитотоксичности у гетеродимеров α-кобратоксина и цитотоксинов тоже представляется достойной задачей последующих исследований.

**На автореферат поступили положительные отзывы от:**

главного научного сотрудника лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» доктора биологических наук Сурина А.М., замечаний нет;

старшего научного сотрудника лаборатории клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук кандидата биологических наук Свирцевской Е.В., замечаний нет.

**В дискуссии приняли участие:**

**Дзюбинская Елена Валерьевна.** Научный сотрудник кафедры иммунологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:**

- Исследовано влияние белков, впервые выделенных из ядов змей и принадлежащих трем различным структурно-функциональным семействам на пролиферацию клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы. Выявлены два основных эффекта – цитотоксический и дифференцирующий, величина которых зависела от типа и аминокислотной последовательности исследованных белков.
- Под действием металлопротеиназы из яда кобры *Naja oxiana* клетки PC12 открепляются от подложки и экстрацеллюлярного матрикса, кластеризуются и теряют жизнеспособность.
- Цитотоксины из яда кобры *Naja kaouthia* утрачивают цитотоксическую активность при образовании дисульфид-связанных гетеродимеров с участием альфа-кобратоксина.
- Секретируемые фосфолипазы A2 из ядов кобр *Naja kaouthia* и *Naja haje*, а также гадюк *Viperanikolskii*, *Vipera ursiniirenerdi* и *Bitis arietans* стимулируют рост нейритов у недифференцированных нейроэндокринных клеток PC12, то есть приводят к их дифференцировке.
- Сравнительный анализ цитотоксической и дифференцирующей активности фосфолипаз выявил, что из всех испытанных в работе фосфолипаз A2 наибольшей нейритогенной активностью обладает битанарин, практически не проявляющий цитотоксичности.

- Полученные данные указывают на возможность существования двух механизмов дифференцировки, вызываемой фосфолипазами A2: для первого (вероятно, с участием лизофосфатидилхолина) необходима фосфолиполитическая активность, а второй, в котором, возможно, участвуют протеинкиназы, не зависит от ферментативной активности фосфолипаз A2.

**Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:**

Исследования механизмов токсического, антипролиферативного и дифференцирующего действия белковых компонентов змеиных ядов крайне важно для дальнейшего развития исследований в области биохимии и биологии клетки, что может способствовать более глубокому пониманию механизмов клеточной гибели и дифференцировки.

**Практическая значимость работы заключается в том, что:**

- При изучении металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* впервые обнаружена способность протеиназ этого типа откреплять клетки PC12 от субстрата с последующей их кластеризацией. Взаимоотношения между клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза. Имеющиеся в литературе данные для родственных металлопротеиназ свидетельствуют, что эти белки селективно ингибируют клеточную адгезию опухолевых клеток. Таким образом, оксиагин может представлять интерес для исследований в области онкологии.
- Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и альфа-кобротоксин, показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Это необычное свойство, очевидно возникшее вследствие димеризации, наряду со способностями димеров связываться с нейрональными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами делает их уникальными инструментами при изучении никотиновых рецепторов и исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий.
- При изучении фосфолипаз A2 (ФЛА2) змеиных ядов была установлена их способность вызывать дифференцировку клеток PC12 феохромоцитомы крысы. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало наличие двух путей, посредством которых ФЛА2 инициируют рост нейритов. Один из них

включает ферментативный гидролиз липидов и проявляется в случае ФЛА2 с высокой ферментативной активностью. Второй путь не зависит от ферментативной активности ФЛА2 и, возможно, включает участие протеинкиназ. В практическом плане полученные для ФЛА2 данные могут являться предпосылками для более детального изучения механизмов, приводящих к дифференцировке опухолевых клеток, и послужить фундаментальной основой для создания лекарственных препаратов, направленных на подавление роста опухоли, для использования дифференцирующей способности ФЛА2 при лечении нейрональных повреждений или нейродегенеративных заболеваний.

#### **Оценка достоверности результатов выявила, что:**

- использованные методики исследования корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- полученные экспериментальные закономерности являются статистически достоверными;
- выводы, представленные в данной работе, логичны и полностью соответствуют результатам проведенного исследования.

#### **Личный вклад соискателя состоит в:**

- получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов.
- обработке, интерпретации и анализе результатов исследований;
- оформлении и публикации полученных данных.

Диссертация Макаровой Я.В. является законченной научно – квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов.

На заседании 19 мая 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Макаровой Яне Владиславовне учёную степень кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 18 докторов наук, 12 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали «за» 19, «против» нет, «недействительных бюллетеней» нет.

Заместитель председателя

диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор химических наук,

профессор

  
Дзантиев Б.Б.

Ученый секретарь

диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук



  
Орловский А.Ф.

«19» мая 2016 г.