

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **ПОЗДНЯКОВА ИЛЬИ АНДРЕЕВИЧА**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 23 декабря 2016 года № 215/394

О присуждении **ПОЗДНЯКОВУ ИЛЬЕ АНДРЕЕВИЧУ** (Россия) ученой степени
кандидата биологических наук

Диссертация «**КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ: ВЫЯВЛЕНИЕ
РАЗНООБРАЗИЯ И РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОДХОДА ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ**»

по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»

принята к защите 21.10.2016 г., протокол №213/392 Диссертационным советом
Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), адрес: 194064, Россия,
Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4. Утвержден приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от
11.04.2012 г.

Соискатель Поздняков Илья Андреевич, 1987 года рождения, в 2011 году окончил
биолого-почвенный факультет Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-
Петербургский государственный университет» по специальности «Биология» с
присуждением степени магистра. С **25.06.2012** по **24.06.2015** проходил очную аспирантуру
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии
Российской академии наук. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.
Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт
цитологии Российской академии наук с 2008 года в Лаборатории ионных каналов
клеточных мембран, а с 2012 года – в Лаборатории цитологии одноклеточных организмов,
с июля 2015 года по настоящее время Илья Андреевич является младшим научным
сотрудником этой лаборатории.

Диссертация выполнена в Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель – Скарлато Сергей Орестович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник с возложением обязанностей заведующего лабораторией цитологии одноклеточных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Крутецкая Зоя Иринарховна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург;

2. Фролов Александр Олегович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Лаборатории по изучению паразитических червей и протистов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический института Российской академии наук, Санкт-Петербург

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (Санкт-Петербург) в своем отзыве (заключение составлено заведующим лабораторией физиологии возбудимых мембран, д.б.н. (специальность 03.03.01 – физиология), профессором Б.В. Крыловым и утверждено директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук чл.-корр. РАН, д.б.н. Л.П. Филаретовой) указала, что диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, содержит новый подход к решению актуальной научной задачи – исследованию ионных каналов у динофлагеллят. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к кандидатской диссертации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология», и

дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ по теме диссертации, из них 3 статьи (объемом 2 печ. листа) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 10 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Pozdnyakov I., Skarlato S.** Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle. *Protistology*. – 2012. – V. 7. – N. 2. – P. 108–115.

В рамках данной статьи был проанализирован имеющийся на сегодняшний день в литературе материал о строении сложных покровов (амфиесмы) динофлагеллят и их смене в ходе жизненного цикла. Результатом работы стала модель перестройки амфиесмы на различных стадиях жизненного цикла динофлагеллят, а также выработка подходов для решения проблемы регистрации трансмембранных ионных токов с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране.

2. **Pozdnyakov I., Matantseva O., Negulyaeva Y., Skarlato S.** Obtaining spheroplasts of armored dinoflagellates and first single-channel recordings of their ion channels using patch-clamping. *Marine Drugs*. – 2014. – V. 12. – N. 9. – P. 4743–4755.

Статья посвящена разработке и характеристике нового метода получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят. Показано, что действие блокатора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила (ДХБ) приводит к образованию сферопластов, пригодных для применения метода локальной фиксации потенциала на мембране (пэтч-кламп). Данный подход впервые позволил зарегистрировать активность одиночных ионных каналов динофлагеллят. Показано, что максимальный выход сферопластов *Prorocentrum minimum* (9,5% ± 1,5%) достигался при воздействии 100–250 мкМ ДХБ и не зависел от времени инкубации в исследованных пределах 1–5 суток. Кроме того, в данной работе показано, что ДХБ является агентом, вызывающим экдизис (сброс старых покровов) у динофлагеллят. Таким образом, ДХБ вызывает сброс уже существующих покровов, содержащих слои целлюлозы, и в тоже время блокирует синтез новых целлюлозных слоев, что и приводит к образованию сферопласта.

3. **Поздняков И.А., Скарлато С.О.** Анализ транскриптома динофлагеллят *Prorocentrum minimum*: идентификация представителей суперсемейства потенциалуправляемых катионных каналов. *Цитология*. – 2015. – Т. 57. – № 7. – С. 533–543.

В этой статье выполнен анализ транслированных транскриптомов двух штаммов динофлагеллят *Prorocentrum minimum* с целью идентифицировать представителей

суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов. В результате были выявлены следующие семейства: калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}), потенциал-управляемые калиевые каналы (K_v), кальциеактивируемые кальциевые каналы (K_{Ca}), каналы, управляемые циклическими нуклеотидами (EAG и HCN/CNG), каналы TRPV и TRPP, двухпоровые кальциевые каналы TRP, четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (гомологи потенциал-управляемых натриевых Na_v и кальциевых Ca_v каналов), потенциал-управляемые протонные каналы (H_v).

4. **Pozdnyakov I., Skarlato S.** Ion channels in dinoflagellates revealed by patch-clamping and analysis of transcriptomes. Abstracts. – 2015. – P. 360.

VII European Congress of Protistology, Seville, Spain, 5–10 September, 2015.

В данной работе был использован разработанный ранее метод получения сферопластов динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, которые использовались для регистрации одиночных катионных каналов методом пэтч-кламп. Было продемонстрировано наличие у *P. minimum* ряда катионных каналов высокой проводимости, хорошо отличающихся друг от друга по своей кинетике и вольт-амперной характеристике. Было сделано сопоставление результатов, полученных в ходе электрофизиологических исследований с данными, полученными при анализе транскриптомных баз данных, и сделано предположение о том, что зарегистрированные катионные токи могли быть результатом активности потенциал-управляемых калиевых каналов, калиевых каналов входящего выпрямления и некоторых катион-неселективных каналов.

5. **Pozdnyakov I., Matantseva O., Skarlato S.** Chasing ion channels of dinoflagellates. Protistology. – 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 61–62.

Moscow Forum «Protist-2016», Moscow, Russia, 6–10 June, 2016.

В публикации представлены данные об электрофизиологических и биоинформатических исследованиях ионных каналов динофлагеллят. Показано наличие разнообразия катионных каналов сферопластов *Prorocentrum minimum*, выявленное с помощью метода пэтч-кламп, а также с помощью анализа транскриптомов десяти видов динофлагеллят. Особое внимание уделено анализу структурно-функциональных детерминант (селективный фильтр, сегменты S4, участок инактивационных ворот) четырехдоменных потенциал-управляемых каналов динофлагеллят.

6. **Pozdnyakov I., Skarlato S.** Phylogeny of protistan four-domain voltage-gated ion channels. Protistology. – 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 61–62.

Moscow Forum «Protist-2016», Moscow, Russia, 6–10 June, 2016.

В данной работе был произведен филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят с помощью метода максимального

правдоподобия и байесовского анализа. Было показано, что динофлагелляты обладают своими собственными кладами четырехдоменных каналов, которые не группируются ни с одним из известных подсемейств четырехдоменных каналов животных и грибов. Кроме того, были получены доказательства того, что динофлагелляты обладают по крайней мере четырьмя филогенетически обособленными группами этих каналов.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Руководителя группы молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, к.х.н. **Александра Александровича Василевского**. Отзыв положительный, имеются критические замечания и вопросы:

«...Сразу оговорюсь, что работа мне понравилась, и остановлюсь на замечаниях.

1. Словосочетание «неполярный негидрофобный» является в известной степени оксюмороном и нежелательно для употребления (так автор обозначает попросту остатки глицина; их не рекомендуется называть «неполярными» во избежание путаницы имеющей место в литературе).
2. Поскольку транскриптом *P. minimum* известен и анализирован автором, очевиден вопрос: какие каналы, с его точки зрения, могли наблюдаться в электрофизиологических экспериментах?
3. На мой взгляд, пятый вывод по результатам работы неудачен: большое разнообразие ионных каналов у динофлагеллят было обнаружено в транскриптом, но не с помощью методов клеточной биологии и электрофизиологии (с их помощью автор получил данные, на основании которых предположил существование только двух типов катионных каналов)

Вопросы, на которые, как мне кажется, очень любопытно получить ответы в дальнейшем:

Каковы электрофизиологические свойства обнаруженных в транскриптомах динофлагеллят ионных каналов. К примеру, соответствующие гены можно экспрессировать гетерологически и исследовать каналы методами двухэлектродной или локальной фиксации потенциала.

Устойчивы ли каналы динофлагеллят к собственным токсинам (сакситоксину, бреветоксину, цигуатоксину...)? Эти эксперименты, среди прочего, помогут прояснить биологическую функцию указанных токсинов».

2. Заведующей лабораторией алканотрофных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, профессора кафедры микробиологии и генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», академика РАН, д.б.н., профессора **Ирины Борисовны Ившиной**. Отзыв положительный, содержатся замечания:

«...В качестве замечания следует отметить недостаточное качество представленных в автореферате филограмм, что затрудняет визуальное восприятие полученных данных».

3. Ведущего научного сотрудника лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, д.б.н. **Владимира Ивановича Попенко**. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Доцента кафедры цитологии и гистологии Санкт-Петербургского государственного университета, к.б.н. **Елены Валентиновны Сабанесевой**. Отзыв положительный, без замечаний.

5. Заместителя директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, заведующего лабораторией сравнительной биохимии неорганических ионов, д.б.н. **Анатолия Александровича Никифорова**. Отзыв положительный, имеются критические замечания:

«...Признавая высокую значимость полученных результатов, должен отметить, что биоинформационный подход сам по себе явно недостаточен для заключений о функциональных свойствах выявленных каналов. Так, проводя анализ аминокислотных последовательностей четырехдоменных каналов с использованием в качестве последовательностей запроса базы данных человека и получив данные о наличии гомологичных последовательностей E/E/E/E/ в селективных фильтрах, автор отнес их к каналам, обладающим селективностью в отношении ионов кальция. Однако, такие последовательности обнаружены и в селективных фильтрах натриевых каналов прокариот. Это замечание несколько не умаляет достоинства работы И.А.Позднякова, тем более что он разработал и успешно применил оригинальный метод регистрации трансмембранных токов на уровне одиночных каналов у динофлагеллят, что дает хорошие перспективы для их фармакологического анализа.»

6. Профессора с возложенными обязанностями заведующего кафедрой микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета, д.б.н., проф. **Александра Васильевича Пиневи́ча**. Отзыв положительный, без замечаний.

7. Главного научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. **Нины Николаевны Немовой**. Отзыв положительный, имеются замечания:

«...Замечаний к автореферату нет, но, на наш взгляд, было бы нагляднее обозначить кластеры В, С, и D на самом рисунке 4, а не только в подписи к нему».

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук, профессор Е.С. Корнилова, член Диссертационного совета;
2. Доктор биологических наук, профессор Е.Р. Гагинская, член Диссертационного совета;
3. Доктор биологических наук, профессор С.Н. Борхсениус, член Диссертационного совета;
4. Доктор биологических наук, профессор Я.Ю. Комиссарчик, гл.н.с. ИНЦ РАН;
5. Доктор биологических наук, Ю.А. Негуляев, член Диссертационного совета;
6. Доктор биологических наук, Д.С. Боголюбов, член Диссертационного совета.

Выбор официальный оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии, в частности, в области изучения ионных каналов и клеточной биологии одноклеточных организмов, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан оригинальный метод получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят *Prorocentrum minimum* с помощью действия ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила;

предложен новый экспериментальный подход к регистрации ионных каналов динофлагеллят методом локальной фиксации потенциала на мембране с использованием сферопластов. Данный подход позволил впервые зарегистрировать активность одиночных ионных каналов динофлагеллят *in situ*;

доказано, что динофлагелляты обладают высоким разнообразием ионных каналов, входящих в состав суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов, среди них:

- 1) потенциал-управляемые калиевые каналы (K_v), 2) калиевые каналы входящего

выпрямления (K_{ir}), 3) двухпоровые калиевые каналы (K_{2p}), 4) кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}), 5) калиевые каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (EAG), 6) катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (HCN/CNG), 7) каналы TRP (TRPV и TRPP), 8) двухпоровые кальциевые каналы (TPC), 9) потенциал-управляемые протонные каналы (H_v), 10) четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК). Динофлагелляты обладают по крайней мере четырьмя филогенетически обособленными группами ЧД ПКК, характеризующимися разнообразием структурно-функциональных детерминант. Ингибирование синтеза целлюлозы у армированных динофлагеллят приводит к образованию сферопластов, пригодных для регистрации одиночных ионных каналов методом локальной фиксации потенциала на мембране, что делает возможным экспериментальное изучение ионных каналов у этих организмов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений о разнообразии катионных каналов динофлагеллят, а также состоятельность экспериментального подхода, предложенного для исследования их функциональной активности;

применительно к проблеме, изучаемой в диссертации, результативно использован комплекс современных методов биоинформатики (анализ баз данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, поиск гомологов, множественное выравнивание, предсказание вторичных структур), молекулярной филогении (метод максимального правдоподобия и байесовский анализ), клеточной биологии (флуоресцентная микроскопия) и электрофизиологии (метод локальной фиксации потенциала на мембране);

изложены новые данные о разнообразии катионных каналов динофлагеллят;

раскрыты существенные проявления теории об эволюции ионных каналов у эукариот;

изучено филогенетическое и структурно-функциональное разнообразие четырехдоменных-катионных каналов динофлагеллят;

проведена модернизация методов получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят, позволившая впервые применить метод локальной фиксации потенциала на мембране для исследования ионных каналов этих организмов *in situ*.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен в практику фундаментальных исследований новый метод получения сферопластов армированных динофлагеллят, пригодных для использования в электрофизиологических исследованиях активности ионных каналов;

определены перспективы экспериментальных исследований катионных каналов динофлагеллят;

создана экспериментальная и теоретическая база, на основе которой возможно дальнейшее определение физиологической роли катионных каналов у динофлагеллят;

представлены методические рекомендации по дальнейшему изучению физиологической роли катионных каналов у динофлагеллят.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании; выбор использованных методов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам; достоверность экспериментальных результатов и результатов, полученных в ходе биоинформатических исследований, оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

теория построена на известных, проверяемых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными результатами по теме диссертации и по смежным отраслям;

идея базируется на анализе данных современной литературы, а также на обобщении и анализе собственного материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассмотренной тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обосновано;

Использованы современные экспериментальные подходы (флуоресцентная микроскопия, метод локальной фиксации потенциала на мембране, анализ баз данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, множественное выравнивание последовательностей, предсказание вторичных структур, методы молекулярной филогении, такие как метод максимального правдоподобия и байесовский анализ) и адекватные методы статистической обработки результатов.

Личный вклад соискателя состоит в:

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации данных, полученных с помощью современных методов биоинформатики, клеточной биологии и электрофизиологии. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и зарубежных научных конференциях, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация, посвященная выявлению разнообразия катионных каналов у динофлагеллят и разработке экспериментального подхода для исследования их функциональной активности, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания эволюции и физиологической роли катионных каналов одноклеточных эукариот. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных И.А. Поздняковым работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

На заседании 23 декабря 2016 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Позднякову Илье Андреевичу** ученую степень **кандидата биологических наук** по специальности **03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»**.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве **18 человек**, из них **10 докторов по специальности** рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» – 18, «ПРОТИВ» – нет, недействительных бюллетеней нет.

Зам. председателя

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор



С.Н. Борхсениус

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

«26» декабря 2016 г.