

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ МАРИИ
АНДРЕЕВНЫ РЯЗАНЦЕВОЙ НА СОСКИДЕНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 22 декабря 2017 года, № 229/407

О присуждении **МАРИИ АНДРЕЕВНЕ РЯЗАНЦЕВОЙ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «**НАРУШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**»

По специальности 03.03.04 – «Клеточная биологи, цитологи, гистологи»

Принята к защите 19.10.2017 протокол заседания № 226/404

Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4, утвержден приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Мария Андреевна Рязанцева, 1987 года рождения, в 2011 закончила магистратуру кафедры «Цитологии и гистологии» биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного Университета. В 2011 году поступила в очную аспирантуру ИНЦ РАН под руководство д.б.н. Казначеевой Елены Валентиновны.

С 2008 года работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук, с 2014 г. по настоящее время находится на должности младшего научного сотрудника Лаборатории ионных каналов клеточных мембран.

Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры в Лаборатории ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель:

Казначеева Елена Валентиновна, доктор биологических наук (специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология), заведующая Лабораторией ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальный оппоненты:

1. **Савватеева-Попова Елена Владимировна**, доктор биологических наук (по специальности 03.02.07. – Генетика) заведующая Лабораторией нейрогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург.
 2. **Фирсов Михаил Леонидович**, доктор биологических наук (по специальности 03.03.01 – Физиология) заведующий Лабораторией эволюции органов чувств, директор Федерального государственного бюджетного учреждения Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург
- дали положительные отзывы на диссертацию**

Ведущая организация:

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (г. Москва) в своем положительном заключении (заключение составил заведующий лабораторией молекулярных инструментов для нейробиологии ИБХ РАН, к.х.н. Александр Александрович Василевский) указала, что диссертационная работа представляет собой законченное исследование, является научно-квалификационной работой и соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 года, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, 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 19 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 11 работ (2,13 п.л.), из них 3 работы в

рецензируемых научных изданиях рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций и 9 тезисов докладов на Российских и международных форумах. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных М.А. Рязанцевой работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Henke, N. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress / P. Albrecht, I. Bouchachia, **M. Ryazantseva**, K. Knoll, J. Lewerenz, E. Kaznacheeva, P. Maher, A. Methner // Cell Death Dis – 2013. – V. 4. – e470.

Статья посвящена исследованию влияния активности кальциевых каналов Orai при реализации программируемой гибели клетки в результате окислительного стресса.

2. **Ryazantseva, M.** Attenuated presenilin-1 endoproteolysis enhances store-operated calcium currents in neuronal cells / K. Skobeleva, L. Glushankova, E. Kaznacheeva // J Neurochem. – 2016. – V. 136. – N. 5. – P. 1085-1095.

Статья посвящена исследованию влияния накопления полноразмерного белка пресенилин-1 в нейронах на депо-управляемые кальциевые каналы.

3. **Ryazantseva, M.** Presenilin-1 Delta E9 Mutant Induces STIM1-Driven Store-Operated Calcium Channel Hyperactivation in Hippocampal Neurons / A. Goncharova, K. Skobeleva, M. Erokhin, A. Methner, P. Georgiev, E. Kaznacheeva // MolNeurobiol. – 2017. – doi: 10.1007/s12035-017-0674-4.

Статья посвящена исследованию молекулярного механизма нарушений регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных и животных моделях наследственной болезни Альцгеймера.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Руководителя лаборатории Молекулярной физиологии клетки Института биофизики клетки РАН, доктора биологических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика, профессора **Станислава Сергеевича Колесникова**.

Отзыв положительный, имеются замечания:

«..данная работа была направлена на «разработку клеточных и трансгенных животных моделей болезни Альцгеймера» в связи с

этим возникает вопрос, могут ли в принципе животные и клеточные модели, время жизни которых весьма ограничено, воспроизводить этиологию нейродегенеративных процессов у человека, которые развиваются годами, если не сказать, десятилетиями, а скорее всего носят системный характер? Допустимо ли сравнительное возрастное масштабирование (молодой, старый) для животных продолжительность жизни которых отличается на два порядка, если ключевые биохимические процессы в них идентичны? Не является ли использование неадекватных моделей причиной того, что этиология нейродегенерации до сих пор не имеет ясных очертаний?»

2. Главного научного сотрудника, и.о. заведующего лаборатории физиологии рецепторов и сигнальных систем Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, доктора биологических наук по специальности 03.00.04 - Биохимия, профессора **Павла Владимировича Авдонина**.

Отзыв положительный, имеются замечания:

«...Замечания касаются формальных вещей. В автореферате М.А. Рязанцевой встречаются неточности в формулировках, в частности, на стр.3 при цитировании статьи Nonarnejad et al., 2013. Эти и некоторые другие погрешности связаны с недостаточной стилистической правкой текста автореферата. В тексте встречаются опечатки. Количество выводов можно было сократить - вывод 4 почти полностью дублирует вывод 2.»

3. Зам. Директора Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, член-корр. РАН, доктора биологических наук по специальности 03.03.01 - Физиология, **Дениса Борисовича Тихонова**.

Отзыв положительный, имеются замечания:

«Грешно все-таки называть токами величины, имеющие размерность пА/пФ. Хотелось бы также видеть на осях в соответствующих рисунках нечто большее, чем просто размерность величин. А вот на рисунке 8 (STIM1-Orai1 взаимодействие) читателю наоборот приходится догадываться, в каких единицах измеряется данное взаимодействие. Данные замечания чисто технического свойства и не умаляют ценность работы»

В дискуссии принимали участие:

1. Шавловский Михаил Михайлович, д.м.н., проф., член диссертационного совета (Институт Цитологии РАН)

2. Безprozванный Илья Борисович, д.б.н., проф. (Санкт-Петербургский Политехнический Университет)

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии, цитологии и гистологии, в частности в клеточной нейробиологии, генетике и фармакологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны новые клеточные и животные модели наследственной болезни Альцгеймера;

предложены новые молекулярные мишени и потенциальный фармакологический агент для разработки лекарственного препарата для лечения наследственной формы болезни Альцгеймера;

доказано, что экспрессия гена человека с мутацией PS1 DE9, связанной с наследственной болезнью Альцгеймера (НБА), в нейронах гиппокампа мышей и нейробластоме мыши линии Neuro2a приводит к увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция;

доказано, что патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет гиперактивности кальциевых сенсоров STIM1;

доказано, что белки TRPC1 и Orail участвуют в образовании депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа мыши и вовлечены в патологически увеличенный вход кальция в клеточных моделях НБА.

доказано, что экспрессия мутантного гена человека PS1 DE9 в нейронах холинергической нервной системы трансгенных *Drosophila melanogaster* приводит к возрастным нарушениям кратковременной памяти, что подтверждает фенотипическое проявление НБА в этой модели.

доказано, что ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB, действующий на сенсор STIM1, восстанавливает функцию памяти в трансгенных *Drosophila melanogaster*, экспрессирующих мутантный ген человека PS1 DE9 в нейронах холинергической нервной системы.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие современные представления о молекулярных и клеточных механизмах нейродегенерации при НБА

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных цитологических, микроскопических, биохимических и нейробиологических методов, включающий получение первичных культур нейронов гиппокампа мыши, создание клеточных моделей НБА с помощью трансфекции или ленти-вирусной трансдукции, методы иммуноокрашивания, электрофизиологические измерения, измерения динамики внутриклеточной концентрации кальция, конфокальная микроскопия, иммуноблоттинг и ко-иммунопреципитация, методы молекулярного клонирования и создания ДНК векторов (ПЦР, рестрикция, лигирование), создание трансгенных животных (*Drosophila melanogaster*) со специфической экспрессией мутантных генов человека в холинергической нервной системе, методы оценки кратковременной памяти у *Drosophila melanogaster*.

изложены новые данные об изменении в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов при НБА в нейронах.

раскрыт механизм изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов, который может быть вовлечен в нарушения работы кратковременной памяти при НБА.

изучены возможные молекулярные мишени, участвующие в регуляции депо-управляемых каналов в нейронах, воздействие на которые потенциальным лекарственным препаратом способно устранять нарушения кратковременной памяти.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

изучены молекулярные механизмы нарушения кальциевого гомеостаза при НБА в клеточных и животных моделях;

показано, что нарушения в кальциевом гомеостазе, в частности в регуляции депо-управляемых каналов, связаны с изменениями в работе кальциевых сенсоров STIM, что делает их привлекательной мишенью для разработки новых препаратов. По результатам можно считать, что потенциальным лекарственным препаратом могут служить производные Аминоэтоксидифенилбората (2-APB), который был способен устранять гиперактивацию кальциевых каналов в нейронах гиппокампа мыши, а также предотвращать развитие нарушений кратковременной памяти у модельных *Drosophila melanogaster*;

определены перспективы возможного практического применения результатов исследования для целей разработок новых лекарственных препаратов для лечения НБА;

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- **результаты**, представленные в диссертации, получены на сертифицируемом оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

- **теория** построена на известных, проверяемых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

- **идея** базируется на анализе данных современной литературы, на полученных ранее в лаборатории Ионных каналов клеточных мембран ФГБУН Института цитологии РАН данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

- **использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой 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 (электрофизиологические измерения, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, иммуноблоттинг и ко-иммунопреципитация, молекулярное клонирование, трансфекция, трансдукция, поведенческие тесты) и адекватные методы статистической обработки результатов.

Личный вклад соискателя состоит в:

непосредственном планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации полученных результатов. Все основные эксперименты выполнены автором лично. Соискатель принимала непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и международных конференциях, в подготовке и написании научных статей и тезисов по теме диссертации. Диссертационная работа выполнена при поддержке грантов РНФ (14-14-00720) и РФФИ №14-04-31280мол_а, а также Стипендии Президента Российской Федерации.

Диссертация посвящена исследованию нарушений работы депоуправляемых кальциевых каналов при НБА, и является законченным (в

рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной нейробиологии, которое содержит решение научных задач, имеющих большое значение как для понимания механизмов нейродегенерации, так и для развития медицины и фармакологии. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных М.А. Рязанцевой работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа по актуальности, достоверности и научной новизне полученных результатов 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 22 декабря 2017 г. Диссертационный совет Д 002.230.01 принял решение присудить Марии Андреевне РЯЗАНЦЕВОЙ ученую степень кандидата биологических наук по специальности «Клеточная биология, цитология, гистология» (03.03.04)

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 10 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

25.12.2017