

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по диссертации
на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 23 мая 2018 г. № 9

О присуждении **Логашинной Юлии Александровне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Пептиды морских анемонов, модулирующие активность TRPA1 рецепторов» по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия принята к защите 16 марта 2018 г., протокол №6 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10 (действует на основании приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 г.).

Соискатель Логашина Юлия Александровна 1988 года рождения в 2011 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» по специальности биотехнология (технология белковых препаратов и биологически активных веществ). С 2011 по 2014 гг. Логашина Ю.А. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертация выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель – кандидат биологических наук Андреев Ярослав Алексеевич, старший научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корр. РАН, главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук;

Быстрова Марина Федоровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной физиологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биофизики клетки Российской академии наук

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (ФГБУН ИЦ РАН) в своем положительном заключении, подписанном главным научным сотрудником лаборатории ионных каналов клеточных мембран, д.б.н. Казначеевой Е.В. и утвержденном д.б.н., директором ФГБУН ИЦ РАН Скарлато С.О., указала, что диссертационная работа Логашиной Юлии Александровны соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых 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 ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 работы общим объемом 7 печатных листов в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Министерством образования и науки Российской Федерации для опубликования результатов диссертационных работ, а также имеется 1 патент. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных автором работах.

Научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной или существенный вклад:

- 1) Я.А. Андреев, **Ю.А. Логашина**, К.И. Лубова, А.А. Василевский, С.А. Козлов. Боль, воспаление и другие неприятности: обратная сторона ощущений. Природа, 2016, №12, стр. 3-9.
- 2) **Y.A. Logashina**, I.V. Mosharova, Y.V. Korolkova, I.V. Shelukhina, I.A. Dyachenko, V.A. Palikov, Y.A. Palikova, A.N. Murashev, S.A. Kozlov, K.Stensvåg, and Y.A. Andreev. Peptide from Sea Anemone Metridium senile Affects Transient Receptor Potential Ankyrin-repeat 1 (TRPA1) Function and Produces Analgesic Effect. The Journal of Biological Chemistry, 2017, vol. 292, no. 7, pp. 2992–3004.
- 3) **Y.A. Logashina**, R.G. Solstad, K.S. Mineev, Y.V. Korolkova, I.V. Mosharova, I.A. Dyachenko, V.A. Palikov, Y.A. Palikova, A.N. Murashev, A.S. Arseniev, S.A. Kozlov, K. Stensvåg, T. Haug, and Y.A. Andreev. New Disulfide-Stabilized Fold Provides Sea Anemone Peptide to Exhibit Both Antimicrobial and TRPA1 Potentiating Properties. Toxins, 2017, vol. 9, no. 5, pii: E154.
- 4) Козлов С.А., Андреев Я.А., Гришин Е.В., **Логашина Ю.А.**, Королькова Ю.В., Мошарова И.В., Мурашев А.Н. Анальгетический пептид из морской анемоны. Патент РФ № 2614759 (дата приоритета 12.02.2016, дата регистрации 29.03.2017), (заявка на патент № 2016104705 от 12.02.2016).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы.

Отзыв официального оппонента д.б.н., член-корр. РАН Купраша Дмитрия Владимировича. Отзыв положительный. Содержит следующие вопросы и замечания:

1. Недостаточно внимания уделено сравнению исследуемых пептидов с известными модуляторами рецептора TRPA1. Так в обзоре литературы отсутствуют их конкретные действующие концентрации, а в эксперименты на животных (рис. 35-38) они не включены в качестве контролей.
2. Кривые дозозависимости и антагонист TRPA1 лишь отчасти подтверждают гипотезу о специфичности действия исследованных пептидов на TRPA1, поскольку неспецифические эффекты также зависят от дозы, а антагонист блокирует рецептор полностью, исключая возможность наблюдать модуляцию его активности. В качестве одного из возможных контролей в опытах *in vivo* мог бы выступать физиологически нейтральный нерелевантный пептид, либо один из исследуемых пептидов с аминокислотными заменами в предположительно функционально важных положениях.
3. Более близкое сравнение свойств двух исследуемых пептидов друг с другом также было бы интересно и естественно. На рис. 34 показана утрата функциональности TRPA1 после применения 750 мкМ Ueq12-1 в присутствии агониста. Для Ms9a-1 подобного эффекта не наблюдалось, однако похоже, что и максимальная использованная концентрация была существенно ниже 750 мкМ. Ни сравнительный анализ активности двух пептидов в высоких концентрациях, ни обсуждение возможных причин данного эффекта не проводится.
4. Также не проводится сравнение двух пептидов в опытах на животных, или хотя бы сравнительное обсуждение результатов опытов, выполненных в одинаковой постановке. Так, на рис. 36Б показано, что применение Ms 9a-1 в модели воспаления, вызванного активацией врожденного иммунитета, дает значимый эффект по сравнению с физраствором во всех точках кинетики, а на рис. 37Г показаны результаты, по-видимому, аналогичного эксперимента с Ueq 12-1, где значимый эффект наблюдается только в точке 24 ч. При этом пептиды использованы в разных концентрациях, контрольная кинетика с физраствором выглядит по-разному, и даже оси ординат на диаграммах выполнены в разных единицах. Это затрудняет сравнение и попытку ответить на очевидный вопрос: на основании полученных данных, представляется ли какой-то из двух пептидов более перспективным кандидатом для разработки анальгетика с противовоспалительными свойствами?
5. При описании эксперимента по антибактериальной активности Ueq12-1 (рис. 33) вначале излагается постановка эксперимента и полученные результаты, а затем излагаются структурные соображения о сходстве с дефензинами. Между тем, очевидно, что именно это структурное сходство и было причиной для постановки данного эксперимента. Обсуждать следовало действующие концентрации Ueq 12-1 в сравнении с концентрациями какого-либо из известных дефензинов, чтобы ответить на вопрос – о том, есть ли у Ueq 12-1 какие-либо перспективы в качестве антибактериального препарата.

6. Текст диссертации содержит значительное количество нечетких формулировок и злоупотреблений техническим и лабораторным жаргоном, не искажающих смысла, но затрудняющих восприятие.
7. Термин "потенцирование" является "калькой" с английского "potentiate", которая удобна для обозначения наблюдаемого эффекта одним словом. Однако русскоязычные системы проверки правописания считают вариант с двумя "и" опечаткой, и сам автор иногда пишет "потенцирование", а иногда – "потенцирование". С другой стороны, "потенциатор" – это конкретный термин для модуляторов рецептора CFTR, которые влияют на время, в течение которого он остается открытым. Возможно, исследованные пептиды действуют именно таким образом, тогда данный термин уместен. В названии диссертации использован термин "модуляция", который корректен, но не несет в себе информации о направлении наблюдаемого эффекта. Вопросу о наилучшем термине для обозначения наблюдаемого явления не было уделено достаточного внимания.

Отзыв официального оппонента д.б.н. Быстровой Марины Федоровны. Отзыв положительный. Содержит следующие вопросы и замечания:

1. В обзоре литературы п.2.3., стр. 12 и 13 название семейства TRP-каналов «Transient Receptor Potential channels» следует переводить с английского как «каналы временного рецепторного потенциала».
2. TRPA1 в диссертации считается рецептором, термин канал применительно к нему не употребляется вовсе. Из описания в обзоре литературы следует, что для одних агонистов TRPA1 является лиганд-активируемым каналом, для других – рецептор-активируемым каналом, для третьих – молекулярным сенсором. Вопрос: для каких конкретно агонистов, упомянутых в диссертации, TRPA1 выполняет функцию ионотропного рецептора?
3. Не может ли несоответствие результатов, полученных автором *in vivo* и *in vitro*, быть следствием того, что активность пептидов изучалась на разных TRPA1 – мышинном и крысином каналах, соответственно?
4. На рис 19, стр. 68 неправильно обозначены направления олигонуклеотидных праймеров.
5. На стр. 68 описано клонирование синтетических генов, кодирующих целевые полипептиды. Нет возможности убедиться получились или нет в итоге рекомбинантные пептиды, слитые с тиоредоксином, поскольку отсутствуют белковые форезы, которые могли бы подтвердить экспрессию слитых белков соответствующего молекулярного веса в *E.coli*, степень их очистки и уменьшение размера после обработки бромцианом.
6. Увеличение интегрального тока не эквивалентно потенциации канала. Анализ кинетических характеристик агонист-индуцированных ответов TRPA1-положительных клеток позволил бы отчасти оценить вклад некоторых механизмов (изменения аффинности канального белка к стимулирующему агонисту, увеличения скорости агонист-зависимой активации канала и/или уменьшения скорости агонист-зависимой инактивации) в модулирование активности TRPA1 в присутствии пептидов.

В тексте и подписях к рисункам (номера по автореферату) имеются неточности, например: на рис 5А показаны токи при двух фиксированных потенциалах; на рис. 5Б дозозависимость токов аппроксимируется без указания соответствующего уравнения, и стационарные концентрационные зависимости в простейшем случае аппроксимируются с использованием уравнения Хилла, а не логистической функции; регистрировавшийся ток назван «исходящим», в то время как устоявшийся термин – «выходящий ток»; на рис. 6А не указан фиксируемый потенциал.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания:

1. В обзоре литературы не приведены конкретные действующие концентрации известных модуляторов TRPA1, поэтому сравнение их с полученными новыми пептидными модуляторами крайне затруднительно.
2. В работе отсутствует сравнение анальгетического эффекта в моделях *in vivo* выделенных пептидных модуляторов рецептора с известными антагонистами TRPA1.
3. В заключении обзора литературы не достаёт раздела, подводящего читателя к пониманию необходимости проведенного исследования.
4. В работе имеется значительное количество орфографических и синтаксических ошибок.

Отзыв на автореферат Байкова Александра Андреевича, д.х.н., профессора, заведующего Отделом химии белка Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный. Содержит следующие технические замечания: понятия «первичная последовательность» (в разделе "Выводы") не существует – есть «первичная структура» и «аминокислотная последовательность».

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области изучения клеточных рецепторов, что подтверждается наличием большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научно-практическую значимость данной диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что автором проведено законченное научное исследование по поиску, выделению и характеристике пептидов морских анемон, модулирующих активность TRPA1 рецептора. Автором впервые описан новый, двенадцатый, класс токсинов морских анемон и получены новые приоритетные данные, доказывающие, что положительная модуляция TRPA1 может приводить к анальгетическому и противовоспалительному эффекту в животных моделях.

Теоретическая значимость исследования состоит в открытии первых селективных пептидных модуляторов TRPA1, обладающих модулирующей активностью только в присутствии агонистов рецептора. Выделенные в данной работе пептиды дают возможность изучить молекулярные основы функционирования TRPA1 канала и участия TRPA1-экспрессирующих нейронов в физиологических и патологических состояниях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что автором описаны новые анальгетические пептиды, которые положительно модулируют TRPA1 канал, что приводит к ингибированию нейрогенного воспалительного ответа, вследствие десенситизации TRPA1-экспрессирующих нейронов. Выделенные из ядов актиний пептиды можно рассматривать в качестве потенциальных анальгетических препаратов. В отличие от низкомолекулярных антагонистов TRPA1, пептиды способны снижать воспаление и термическую гиперчувствительность в модели воспаления в ответ на введение полного адьюванта Фрейнда. Данный эффект отличает положительную модуляцию от ингибирования TRPA1 канала.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием широкого арсенала современных методов исследования. Тщательный анализ полученных данных и корректные способы статистической обработки материала позволяют констатировать обоснованность полученных результатов. Данные, полученные диссертантом, согласуются с мировыми исследованиями доказывающими, что не только ингибирование, но и слабая активация TRPA1 могут оказывать терапевтическое действие при патологических состояниях. Предложенный механизм действия пептидов не противоречит ранее доказанным эффектам слабых агонистов TRPA1 на восприятие болевых ощущений и воспалительный процесс.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в постановке научных экспериментов и анализе полученных результатов. Работа выполнена в сотрудничестве с Norwegian College of Fishery Science (Тромсо, Норвегия), филиалом ИБХ РАН (Пущино, Россия) и лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН. Основные результаты работы были получены лично соискателем, за исключением спектров ЯМР (лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН), тестирования на животных (филиал ИБХ РАН) и скрининга антибактериальной активности (Norwegian College of Fishery Science). Соискатель лично участвовала в апробации работы на научных конференциях и в написании научных статей.

На заседании 23 мая 2018 г. Диссертационный совет принял решение присудить Логашину Юлии Александровне ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 6 докторов наук по профилю представленной диссертации (специальность 02.00.10 - биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 1, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
Диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

