



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
*Российской академии наук*  
( ИБХ РАН )

---

**СТЕНОГРАММА**  
**Заседания диссертационного совета Д 002.019.01**  
**при ИБХ РАН**

23 мая 2018 года

Защита диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук **Логашинной Юлией Александровной** на тему:  
«Пептиды морских анемон, модулирующие активность TRPA1 рецепторов»  
по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Москва, 2018 г.

## СТЕНОГРАММА

заседания 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 от 23 мая 2018 года.

Заместитель председателя диссертационного совета  
Доктор физико-математических наук

Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
Доктор физико-математических наук

Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
2.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
7.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
8.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
9.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
10.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
11.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
12.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13.	Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
14.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
17.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
19.	Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
20.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
21.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

### **Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Владимир Александрович, ознакомьте, пожалуйста, членов совета с материалами личного дела соискателя Логашинной Юлии Александровны.

### **Уч. секретарь, д.ф.-м.н., Олейников В.А.:**

Материалы личного дела (зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя и все необходимые документы в деле есть).

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо, Владимир Александрович. Уважаемые коллеги, есть ли вопросы по процедуре, по материалам личного дела? Если вопросов нет, тогда, Юлия Александровна, Вам слово, пожалуйста, изложите основные положения Вашей работы. Двадцать минут.

**Логашина Ю.А.:**

*(Излагает основные положения диссертационной работы).*

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Вопросы, пожалуйста.

Коллеги, позвольте мне тогда начать дискуссию. Скажите, пожалуйста, по сравнению с другими известными модуляторами этого канала, изучаемые Вами соединения, чем хороши? Может быть, у них более высокий потенциал использования? Что можете сказать?

**Логашина Ю.А.:**

Положительные модуляторы, они отличаются. Если просто заблокировать рецептор TRPA1, то никакого эффекта в модели общего воспалительного процесса не происходит. А данные пептиды не только действуют на боль, вызванную специфическими агонистами рецептора, но также еще блокируют общий воспалительный процесс, уменьшая гиперчувствительность в общем воспалительном процессе. Этим они отличаются, то есть у них есть дополнительный механизм действия.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Кроме изучаемых Вами двух соединений, двух пептидов, какие-то еще известны модуляторы по такому же сценарию действующие?

**Логашина Ю.А.:**

Нет.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

То есть это впервые это впервые было показано?

**Логашина Ю.А.:**

Да. Есть только агонисты и, соответственно, антагонисты, а именно положительных модуляторов до этого обнаружено не было.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

А какой механизм молекулярный действия на канал TRPA1 предполагается, то есть сайт связывания? Что-нибудь можете сказать?

**Логашина Ю.А.:**

Пока что не могу. Это предмет наших дальнейших исследований. Но пока что, можно сделать предположение, что эти пептиды увеличивают вероятность открытого состояния канала и, таким образом, потенцируют, соответственно, действие агонистов.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Вы не знаете, они действуют где-то в районе устья канала, порового домена или, как некоторые другие лиганды таких рецепторов, где-то на удаленных участках, на периферических участках?

**Логашина Ю.А.:**

Нет. Таких исследований не проводили.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Понятно.

Так, коллеги. Вопросы, пожалуйста.

Да, пожалуйста, Сергей Кириакович.

**Член-корр. РАН Завриев С.К.:**

Совсем маленький вопрос. Когда Вы делали рекомбинантные пептиды, их активность, так сказать, ничем не отличается от природных?

**Логашина Ю.А.:**

Да. Все верно.

**Член-корр. РАН Завриев С.К.:**

Совершенно четко установлено, то есть никаких различий, в принципе, нет. Да?

**Логашина Ю.А.:**

Да.

**Член-корр. РАН Завриев С.К.:**

И выход хороший, да?

**Логашина Ю.А.:**

Для Ms9a-1 выход хороший, 2,5 мг с литра. А Ueq12-1 имеет дефензин-подобный фолд и его выход был значительно ниже.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Вы упомянули, что пространственная структура одного из полипептидов, была сделана с помощью ЯМР-спектроскопии. Вы показали просто топологию, а сама структура-то, что из себя представляет? Бета-структурный белок, да?

**Логашина Ю.А.:**

Да, бета-структурный белок наподобие буквы «W».

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Динамику его изучали с помощью ЯМР-спектроскопии? Что можно сказать о коровой части, о структурном каркасе или каких-то там подвижных петлях, ну и вообще, с похожими структурами? Может быть это дает какие-то выходы, мысли о возможном механизме действия? Нет, все-таки? Каких-то функционально важных остатках?

**Логашина Ю.А.:**

Динамику не изучали. Что касается пространственной поверхности, она имеет нейтральный заряд, то есть нет каких-то выраженных кластеров положительного или отрицательного заряда. Пока что это все, что известно. И похож, действительно, фолд на дефензин-подобные пептиды.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Так, понятно. А вот распределение консервативных, переменных остатков, допустим, по

сравнению с гомологичными белками, где на Ваш взгляд наиболее значимые замены расположены в структуре?

**Логашина Ю.А.:**

Нет гомологичных последовательностей. Аминокислотных гомологичных последовательностей нет, это гомология только структурная.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Это Ueq12, который, да?

**Логашина Ю.А.:**

Да, Ueq12-1. Поэтому не с чем сравнивать.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Понятно. Интересно. Еще вопросы, коллеги. Если вопросов нет, тогда пока присаживайтесь, отдохните. И мы переходим к заслушиванию отзывов, письменных отзывов, поступивших в диссертационный совет. Отзыв ведущей организации.

**Уч. секретарь, д.ф.-м.н., Олейников В.А.:**

Отзыв ведущей организации. Ведущей организацией является Институт цитологии Российской академии наук. Отзыв полностью положительный. *(Зачитывает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)*. По диссертации имеется несколько вопросов и замечаний. Первое. В обзоре литературы не приведены конкретные действующие концентрации известных модуляторов TRPA1, поэтому сравнение их с полученными новыми пептидными модуляторами крайне затруднительно. В работе отсутствует сравнение анальгетического эффекта в моделях *in vivo* выделенных пептидных модуляторов рецептора с известными антагонистами TRPA1. Третье. В заключение обзора литературы недостает раздела, подводящего читателя к пониманию необходимости проведенного исследования. Четвертое. В работе имеется значительное количество орфографических и синтаксических ошибок. Но опять же подчеркивается, что данные замечания не носят принципиального характера и не снижают общую положительную оценку диссертации. Далее перечисление тех постановлений и положений, которые подтверждают соответствие диссертации Логашиной Юлии Александровны, соответствие положениям, и то, что ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия. Отзыв обсужден и рассмотрен на семинаре Лаборатории ионных каналов клеточных мембран и Лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской Академии Наук. Подписано доктором биологических наук, главным научным сотрудником Еленой Валентиновной Казначеевой и утверждено, соответственно, директором этого института Скарлато.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо Владимир Александрович. Да, были замечания. Юлия Александровна, пожалуйста, ответьте на замечания.

**Логашина Ю.А.:**

Я бы хотела выразить, в первую очередь, благодарность Казначеевой Елене Валентиновне за детальный анализ моей диссертационной работы. В обзоре литературы действительно не приведены конкретные действующие концентрации модуляторов, а только порядок соответствующих величин. Поскольку все известные модуляторы являются агонистами или

антагонистами, а в данной работе получены первые положительные модуляторы, увеличивающие ответ рецептора на активирующий стимул, то, таким образом, найденные пептиды обладают новым механизмом действия. И в связи с этим я решила не акцентировать внимание на конкретных действующих концентрациях известных модуляторов. По той же причине не проводилось сравнение анальгетического эффекта известных модуляторов с пептидами. Также я прошу прощение за отсутствие главы в обзоре литературы подытоживающей важность исследования TRPA1 и присутствующие орфографические и синтаксические ошибки. Я постаралась учесть все замечания при составлении презентации.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Так, спасибо. Теперь слово предоставляется научному руководителю. Ярослав Алексеевич, скажите о соискателе.

**К.б.н. Андреев Я.А.:**

О Юлии Александровне у меня только положительные впечатления. Она со студенческой скамьи работает в нашей лаборатории. Она достаточно быстро освоила множество методов молекулярной биологии, биохимии и даже электрофизиологии. Справлялась со всеми поставленными задачами, которые перед ней стояли. И целеустремленность, настойчивость и обязательность позволили ей справиться с этим не простым проектом, который выпал на ее долю. На мой взгляд, она полностью заслуживает присуждения ей искомой степени.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Так, поступили ли, Владимир Александрович, отзывы на автореферат? Представьте их, пожалуйста.

**Уч. секретарь, д.ф.-м.н., Олейников В.А.:**

Да, но в отличие от предыдущей защиты здесь один отзыв. Вот хотя бы один, потому что часто, у нас бывает, вообще нет отзывов на автореферат. Отзыв полностью положительный. *(Зачитывает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв без критических замечаний. Отзыв прилагается)*. Никаких замечаний в отзыве нет. Отзыв подписан: зав. отдела Химии белка НИИ Физ.-хим. биологии имени Белозерского МГУ, доктор химических наук, профессор Байков.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Раз замечаний нет, значит идем дальше, и предлагаю начать дискуссию по рассматриваемой работе, заслушать официальных оппонентов. Слово предоставляется Быстровой Марине Федоровне, доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику лаборатории молекулярной физиологии клетки Института биофизики клетки Российской Академии Наук. Пожалуйста.

**Д.б.н. Быстрова М.Ф.:**

*(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)*. Уважаемый председатель, уважаемые члены ученого совета, коллеги, диссертация Юлии Александровны посвящена исследованию пептидов из ядов актиний северных морей. Актуальность диссертации определяется тем, что пептиды из ядов различных животных являются уникальным природным инструментом для исследования механизмов работы канальных рецепторных белков. В этом и теоретическое, и практическое значение работы, потому что если мы знаем как, используя эти инструменты, мы узнаем механизм работы каналов, это нам дает базу для последующей разработки новых подходов для создания фармацевтических средств для

их управления. А канал, который исследует Юлия Александровна в своей работе, очень интересный, на мой взгляд. Он обладает механочувствительностью, хемочувствительностью, температурной чувствительностью. Канал полимодальный, круг агонистов у этого канала необыкновенно широкий. Юлия Александровна рассматривала его в своей работе с точки зрения его участия в генерации боли. Он вовлечен в генерацию боли, прежде всего, боли хронической, связанной с воспалением и с нейропатией. Мишенями действия вот этих вот пептидов, Юлия Александровна показала, что канал может быть мишенью действия пептидов, причем возможно, что пептиды действуют на него селективно. В настоящее время из ядов животных известно два ингибитора канала TRPA. Это значит, один ингибитор выделен из яда перуанского тарантула, а второй – из яда бразильского странствующего паука. Оба они ингибиторы, но неселективные, они еще действуют на потенциал-управляемые каналы. Значит, в чем новизна работы? Пептиды, которые выделила Юлия Александровна, они не ингибиторы, и не активаторы, они – позитивные модуляторы. И предварительно в диссертации просканировали действие пептидов на различные другие каналы, и есть, значит, основание полагать, что возможно вот эти вот пептиды будут обладать селективностью, потому что для разработки лекарств нужно, чтобы все-таки пептид селективным, чтобы он действовал на какой-то один канал или рецептор, иначе как будет все это *in vivo*. Мишеней может быть много и по-разному действовать на разные мишени. Значит... Наверно, я... Ну по всем формальным признакам диссертация, конечно, соответствует требованиям ВАК: есть и новизна, и научно-практическое значение, и достоверность данных у меня не вызывает сомнения. И на субъективном уровне, что мне понравилось в диссертации, у нее есть как бы изюминка. И заключается она в том, что результаты, которые получены *in vitro*, показывают, что пептиды должны канал активировать, то есть это значит, что они должны усиливать болевые эффекты, а результаты, которые получены *in vivo* на моделях животных, показывают, что, наоборот, пептиды обладают анальгетическим действием. И Юлия Александровна в работе высказывает оригинальную, на мой взгляд, гипотезу, которая заключается в том, что она предполагает, что пептиды должны способствовать десенситизации канала, и на этом базируется их анальгетическое действие. Значит, перейду к вопросам и замечаниям. Канал везде в диссертации, в названии, сегодня в докладе называется рецептором. Конечно, в семействе TRP есть каналы, которые играют роль ионотропных рецепторов, но только для ограниченного количества лигандов. Здесь канал у нас... он... количество лигандов просто зашкаливает. И вот, когда в диссертации, если Вы пишете, что это рецептор, мне хотелось бы знать, это рецептор чего? Всех стимулов физической и химической природы, на которые канал отвечает? Чего это рецептор? В системе биологического узнавания есть молекулы, которые являются сенсорами, но при этом они не обязательно рецепторы. Что такое рецептор? Рецептор – это молекула, которая обеспечивает детекцию экстраклеточного стимула и его преобразование во внутриклеточный сигнал. То есть это transducer, по-английски, сигнала экстраклеточного во внутриклеточный. И агонист рецептора, он взаимодействует с экстраклеточным интерфейсом трансмембранного домена. Вот в диссертации, в обзоре литературы, который очень большой, все там написано, информация дана полностью про рецептор. И Юлия Александровна подробно описывает взаимодействие всех перечисленных агонистов с TRPA1. И что я нам вижу? Электрофильные агенты, к которым относится и аллилизотиоцианат, и акролеин, и много этих агентов, все они взаимодействуют с внутриклеточным N-концевым доменом рецептора, как Юлия Александровна пишет. То есть все они проникают в клетку и взаимодействуют с внутриклеточным доменом. Следовательно, TRPA1 по отношению к ним не рецептор, это лиганд-управляемый канал. Теперь, медиатор воспаления, например, брадикинин. В диссертации сказано, что брадикинин взаимодействует с TRPA1 не напрямую, ну, то есть он вообще не взаимодействует, он взаимодействует со своим рецептором, у него есть свой

рецептор. А TRPA1, значит, у нас является, состоит компонент системы трансдукции сигнала, сигнального каскада, который запускается при взаимодействии брадикинина со своим рецептором. Следовательно, TRPA1 в этом случае служит рецептор-управляемым каналом. Для ЛПС, например, он служит сенсором, потому что ЛПС взаимодействует... Ну, у ЛПС есть свои рецепторы, но TRPA1 является сенсором взаимодействия ЛПС с липидным бислоем. Это сенсор возмущений, которые возникают, которые вносятся ЛПС при взаимодействии с липидным бислоем. Ну, и самое главное клише – это то, что агонистом рецептора является пероксид водорода. Если мы переведем язык внутриклеточной сигнализации, это означает, что TRPA1 является рецептором пероксида водорода. У пероксида водорода рецепторов нет, и быть не может. Пероксид водорода, конечно, участвует в регуляции внутриклеточной сигнализации. В клетке есть молекулярный сенсор пероксида водорода, и по ряду критериев эта молекула может играть роль вторичного посредника некоторых сигнальных каскадов, например, сигнальных каскадов, которые запускаются при взаимодействии факторов роста с соответствующими рецепторами. Если у Вас в названии есть рецептор, Юлия Александровна, у меня вопрос первый: какие конкретно агонисты, по отношению к каким конкретно агонистам, упомянутым в диссертации, TRPA1 играет роль ионотропного рецептора? Значит, второй вопрос связан с очень интересным свойством канала – это его видоспецифичностью. То есть несмотря на очень высокую консервативность молекулярную, различные ортологи канала различных животных могут на один и тот же лиганд отвечать по-разному: одна и та же молекула может блокировать один ортолог и активировать другой. И это тоже в обзоре литературы очень хорошо отображено, вот эта видовая специфичность. И Юлия Александровна пишет, заканчивает эту главу фразой, что «аминокислотное разнообразие является серьезной проблемой, которая требует творческих решений». И вот какое творческое решение мы видим в этой диссертации. Все эксперименты *in vitro* мы проводим на канале крысином, а эксперименты *in vivo* на канале мышшином. То есть когда Вы задачи ставите, Вы должны понимать, что если у Вас разные каналы в диссертации, два разных канала, и Вы понимаете, что у них видоспецифичность, что у них фармакологический профиль может быть совершенно разный, то Вы вносите, обязательно вносите, неизбежную сложность в интерпретацию данных. Может быть, и не нужна гипотеза, которая объясняет, почему по-разному ведут себя пептиды *in vivo* и *in vitro*? Может быть просто потому, что Вы изучали два канала? И у Вас в выводах тоже, выводы касаются двух каналов? Потенциация ответа на каналах крысиных, а анальгетическое действие на каналах мышшиных. Так, третий вопрос у меня связан с выводом первым, четвертым, где пептиды называют потенциаторами канала. Значит, в первом выводе пишут, что он потенцирует канал, а в четвертом, что он является потенциатором канала. Дело в том, что на самом деле, как себя ведет канал, мы не знаем. Точно совершенно, что пептиды потенцируют токи, или кальциевый ответ, или, можно сказать, клеточный ответ, да, они потенцируют, но как себя ведет канал не понятно. Тут был вопрос к Юлии Александровне, каковы механизмы действия пептидов? Я Вам расскажу, если можно. Я расскажу Вам, как я вижу. Посмотрите на этот вопрос с точки зрения биофизики. Пептид активирует ответ, токи активируются. Как у нас канал себя ведет? У него три состояния: неактивное, активное и инактивированное. Вот из инактивированного состояния он в активное никогда не перейдет, он должен перейти сначала в неактивное, а потом уже в активное. То есть вот этот вот процесс инактивации канала, это то, о чем Юлия Александровна говорит «десенситизация». У нас какие механизмы того, что токи потенцируются могут быть? Мы можем предположить теоретически, как это происходит. Во-первых, может быть, пептиды могут повышать аффинность связывания агониста с рецептором. Во-вторых, они могут повышать скорость перехода канала в активное состояние и/или одновременно понижать скорость инактивации, то есть скорость перехода в инактивированное состояние. То есть на самом деле они



должны уменьшать десенситизацию, а не повышать. Ну и третье, которое, для этого нужны были эксперименты с одиночными каналами. Третье, это повышение вероятности нахождения в открытом состоянии. То есть я хочу сказать, что потенциация ответов и потенциация канала – это не одно и то же. Например, повышение афинности и понижение инактивации – это не потенциация канала. Но это вполне может быть причиной действия пептидов. И если, так вот на рисунке 6Г в автореферате видны признаки инактивации канала, и добавление пептидов ее снимает. Значит, я, поскольку гипотеза Юлии Александровны, которая высказана, она базируется именно на том, что пептиды могут десенситизировать канал, а я, как бы, не вижу оснований в экспериментах *in vitro*, что они это могут сделать, поэтому я Вам позволю высказать свою гипотезу. Но тогда эта гипотеза, если мы будем воспринимать вещи, как они есть, пептиды активирую канал, не канал, а токи, и, следовательно, они должны боль усиливать. И когда мы внутривенно пептиды мышам добавляем в поведенческих реакциях. И наблюдаем поведенческие реакции, что должен делать пептид? Он должен усиливать действие эндогенных активаторов канала подпороговой силы, то есть он должен, на самом деле, вызывать боль. И тогда у нас получается, что у нас у мышей две боли: одна системная, вызванная внутривенным введением пептида, а вторая локальная, вызванная уколом в подошву лапы. И получается, что на фоне системной боли, локальный раздражитель может тормозиться. То есть у нас поведенческие реакции будут те же самые: количество лизаний лапы будет меньше, и, значит, время подергивания лапы тоже меньше. Но причина не анальгетические эффекты, а то, что мыши просто не до лапы, у нее системная боль. Ну, то есть доказательств у меня, естественно нет, как и нет доказательств и гипотезы у Юлии Александровны, но такое тоже может быть. Тогда мы не можем говорить об анальгетическом действии пептида. Все эти вопросы, они скорее, как бы, характеризуют диссертацию с положительной стороны, потому что в ней есть и мультидисциплинарный подход, тут много экспериментов и биофизических, и биоорганическая химия, и молекулярное клонирование. И понятно, что при таком объеме диссертации могут быть, данные можно, как бы, неоднозначно интерпретировать. Это скорее плюс, показывает, что есть над чем работать дальше с этими пептидами. Ну и есть у меня замечания, которые касаются небрежности, неточности. Такое пренебрежение к деталям. Юлия Александровна уже исправила, я смотрела в докладе, схему синтеза гена, кодирующего пептиды, где и направление ПЦР праймеров, и положение было указано неправильно. Второй вопрос касается клонирования ДНК, кодирующей пептиды, в плазмиду pET32b. Ген, содержащий ATG и стоп кодон, клонируется по сайту EcoRV по тупым концам. При таком способе клонирования в эту плазмиду будет нарушена открытая рамка считывания. Нужно было перед ATG кодоном ввести дополнительный нуклеотид, чтобы ее сохранить, иначе никакого рекомбинантного белка слитого с тиоредоксином не получится. А получился он или не получился, к сожалению, у меня возможности убедиться нет, поскольку никаких белковых форезов, доказывающих, что пептид был, в диссертации нет. Ну, как бы, принято показать, что суперэкспрессия гибридного белка, чтобы я могла убедиться, что у него правильный молекулярный вес, и что эта масса меняется после того, как расщепление происходит бромцианом. Но вот этого нет. Мне кажется, это недостаток диссертации, что нет иллюстрационного материала. Потом, в подписи к рисункам. В нескольких рисунках, где в подписях «линейное изменение потенциала» на самом деле на рисунке показаны токи при двух фиксированных потенциалах. Кривая S-образная везде называется «логистическая», причем для ее построения используется алгебраическое уравнение, модификация уравнения Хилла. Логистическая кривая является решением дифференциального уравнения, поэтому термин тут неуместный. Не все S-образные кривые являются логистическими. Значит, выходящие токи в диссертации называются «исходящими». Ну, если бы вот таких неточностей не было, наверно, диссертация... Ну, без неточностей нельзя обойтись, наверно, тоже. Высказанные

замечания не снижают высокой научной значимости полученных в диссертации результатов, не влияют на мою общую положительную оценку работы. Автором получены приоритетные данные по актуальной проблеме. Диссертация соответствует всем критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденных Правительством Российской Федерации, а ее автор, Логашина Юлия Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности биорганическая химия. Спасибо за внимание.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо, Марина Федоровна, за неравнодушное и внимательное отношение к диссертационной работе и за начатую такую яркую научную дискуссию. И я думаю, что Юлия Александровна сейчас ее продолжит, эту дискуссию. Ответив или согласившись с замечаниями оппонента.

**Логашина Ю.А.:**

Да, Марина Федоровна, спасибо большое за основательный и критический анализ моей работы. Что касается названия «рецептор» или «канал». Действительно с учетом современной классификации TRPA1 правильней называть лиганд-активируемым каналом или рецептор-управляемым каналом. Однако, как Вы правильно сказали, для разных агонистов и лигандов он является либо рецептор-управляемым, либо лиганд-управляемым, но есть все-таки и агонисты, для которых он является ионотропным рецептором. Например, тимол, ментол или любые гидрофобные агонисты TRPA1, такие как дельта-9-гидроканнабиол. Для всех этих веществ он является рецептором. И, почему я использовала чаще «рецептор», а не «канал», поскольку все-таки основная роль TRPA1 – это связывание с внешними стимулами, детекция внешних раздражителей. И опять-таки пептиды тоже скорее связываются с внешней стороной рецептора, поэтому я чаще использовала «рецептор», а не «канал», однако, оба термина абсолютно корректно характеризуют TRPA1. Для подтверждения фармакологических свойств на мышах, с точки зрения того, как действует пептид на мышах, не является ли он ингибитором, в то время как на крысином TRPA1 мы видим потенциацию, были проведены следующие эксперименты. Во-первых, это тест CFA-индуцируемой тепловой гипералгезии, в котором антагонисты TRPA1 полностью блокируют эффект пептидов, что означает то, что пептиды действуют именно через активацию TRPA1. Если TRPA1 неактивен, то пептиды не проявляют анальгетического действия. И второй тест, который мы провели, это капсаициновый тест. Как известно, V1 рецептор ко-экспрессируется в чувствительных нейронах вместе с A1. При этом есть данные, что антагонисты TRPA1 блокируют рецептор и это никак не влияет на активацию V1 и проведение, передачу болевого сигнала. В то время как слабые антагонисты TRPA1 приводят к десенситизации нейрона, что блокирует активацию капсаицинового рецептора. И в нашем случае на примере Ms 9a-1 было показано, что пептид значительно снижает длительность облизывания лапы в капсаициновом тесте, на применение капсаицина. Что означает, что, скорее всего, пептиды именно модулируют активность рецептора, являются положительными модуляторами, а не блокируют его. Также, в тесте «открытое поле» пептиды не вызывали ни боль, ни воспаление, ни тепловую гиперчувствительность, а также не влияли на поведение мышей, что может означать, что никакого воспалительного процесса введение пептидов не вызывает. Понятие «потенцирование» мы использовали в общем, фармакологическом смысле, то есть это увеличение действия одного вещества другим. В нашем случае одно вещество – это агонист – активирует канал, а другое – пептид – без агониста не действует, но в присутствии агониста увеличивает активность рецептора. Более детальный механизм взаимодействия пептидов с рецептором, конечно, является предметом дальнейших исследований. Но по

имеющимся записям токов, на мой взгляд, можно сделать вывод, что инактивации не происходит, поскольку форма сигнала в присутствии пептида и агониста полностью повторяет формы сигнала в присутствии только агониста. Ну и, конечно, данный вопрос требует дальнейшего исследования. При клонировании в последовательности праймеров, это не указано в тексте, но в сами последовательности праймеров добавлены необходимое количество нуклеотидных остатков, а также метиониновый кодон. Очистку рекомбинантных слитных белков проводили с помощью аффинной хроматографии, и дальше после щепления бромцианом для анализа гидролизной смеси использовали ВЭЖХ метод. Поскольку в нашей лаборатории, получение рекомбинантных белков – это хорошо отработанный метод, и заранее известны время и выход тиоредоксиновых пиков, то мы не прибегали к использованию методов белкового анализа. После этого, идентичность нативного и рекомбинантного пептидов проверяли по хроматографической активности, массе и N-концевым секвенированием. На рисунке действительно представлена запись токов... Рисунок 5А из автореферата, мне кажется, это как раз вот этот рисунок был, 5А из реферата...

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Не 6Г?

**Логашина Ю.А.:**

Там был и 5А, и 6Г. В данном случае, да, действительно, представлены токи при положительном и отрицательном потенциалах, но сам стимул подавали при линейном изменении потенциала, а затем уже регистрировали экстремумы при отрицательном и положительном потенциалах, которые полностью совпадают с токами при +80 и -80 мВ. На рис 19 стр.68 допущена, действительно, была ошибка при подписи праймеров. Большое спасибо за замечание. И, что касается функции Хилла, то с математической точки зрения, эта функция Хилла является производной от логистического уравнения. Поскольку в нашем случае присутствует некий минимальный уровень сигнала, который объясняется тем, что у нас изначально идет действие агониста на рецептор, то я использовала именно это уравнение для описания кривых доза-зависимости. В случае если бы у нас минимальный уровень сигнала был равен нулю, то тогда имело место бы использовать уравнение Хилла. Спасибо, вроде на все ответила, извините, запуталась немножко.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Марина Федоровна, Вы удовлетворены, как соискатель держал оборону?

**Д.б.н. Быстрова М.Ф.:**

Да.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Теперь отзыв следующего официального оппонента.

*(оппонент отсутствует по уважительной причине)*

Купраш Дмитрий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, Институт молекулярной биологии Российской академии наук.

**Уч. секретарь, д.ф.-м.н., Олейников В.А.:**

Да, вот у меня в руках этот отзыв, который поступил в диссертационный совет. *(Зачитывает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).* При детальном

ознакомлении с диссертацией возникает ряд замечаний. Первое. 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 они не включены в качестве контролей. Второе. Во многих случаях хотелось бы видеть больше данных, подтверждающих гипотезу о специфичности действия исследованных пептидов на TRPA1. Кривые дозозависимости и антагонист TRPA1 лишь отчасти решают проблему, 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. Третье. Более близкое сравнение свойств двух исследуемых пептидов друг с другом также было бы интересно и естественно. Вместо этого эксперименты с Ms9a-1 и с Ueq12-1 описаны последовательно, что приводит к необходимости дважды излагать постановку однотипных экспериментов и затрудняет сравнение эффектов и действующих концентраций. Так, на рисунке 34 показана утрата функциональности TRPA1 после применения 750 мкМ Ueq12-1 в присутствии агониста. Для Ms9a 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. Четвертое. Также не проводится сравнение двух пептидов в опытах на животных, или хотя бы сравнительное обсуждение результатов опытов, выполненных в одинаковой постановке. Так, на рисунке 36Б показано, что применение Ms9a-1 в модели воспаления, вызванного активацией врожденного иммунитета, дает значимый эффект по сравнению с физ. раствором во всех точках кинетики, а на рисунке 37Г показаны результаты, по-видимому, аналогичного эксперимента с Ueq12, где значимый эффект наблюдается только в точке 24 часа. При этом пептиды использованы в разных концентрациях, контрольная кинетика с физ. раствором выглядит по-разному, и даже оси ординат на диаграммах выполнены в разных единицах. Все 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? Пятое. В ряде случаев сложно проследить логику изложения материала. Так, 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 же здесь следовало не основания для проверяемой гипотезы, а непосредственно результаты эксперимента, а именно действующие концентрации Ueq12-1 в сравнении с концентрациями какого-либо из известных дефензинов. Последний, в идеале, следовало бы включить в эксперимент в качестве дополнительного контроля, но можно было взять и литературные данные, с помощью которых ответить на другой очевидный вопрос - о том, есть ли у Ueq12 какие-либо перспективы в качестве антибактериального препарата. Как известно, сами дефензины являются великолепными природными антибиотиками, однако высокая стоимость производства делает их неконкурентоспособными по сравнению с малыми молекулами. Шестое. Текст диссертации содержит значительное количество нечетких формулировок и злоупотреблений техническим и лабораторным жаргоном, не искажающим смысла, но затрудняющим восприятие. Например, все выводы сформулированы в стилистике «что делали», а не «что нового узнали», а информация о том, что исследованные пептиды усиливают действие агонистов на TRPA1, содержащаяся в выводе 1, продублирована в

выводе 4. Седьмое. Отдельно хочется остановиться на неудачном термине «потенцирование». Понятно, что эта «калька» с английского «potentiate» удобна для обозначения наблюдаемого эффекта одним словом, вместо словосочетания «усиление действия агонистов». Однако русскоязычные системы проверки правописания считают вариант с двумя «и» опечаткой, и сам автор иногда пишет «потенцирование», а иногда - «потенцирование». В выводе 1 написано «потенцирование», а в выводе 4 применен термин «потенциатор», который в тексте диссертации не встречается больше нигде. «Потенцирование» имеет три значения: в математике это возведение в степень, в фармацевтике - усиление действия препаратов при совместном применении, а в гомеопатии - последовательное разбавление раствора до полного исчезновения из него молекул действующего вещества. Традиционное фармацевтическое значение данного термина оказывается не вполне точным, потому что сами по себе Ueq12 и Ms9a на TRPA1 не действуют. А слово «потенцирование» в гомеопатическом смысле, в ситуации агрессивного наступления скрытой гомеопатии на российский фармацевтический рынок, является токсичным термином, созвучия с которым по возможности следует избегать. С другой стороны, «потенциатор» - это вполне конкретный термин для модуляторов рецепторов CFTR, которые влияют на время, в течение которого он остается открытым. Возможно, исследованные пептиды действуют на TRPA именно таким образом, тогда термин «потенциатор» будет уместным, но это требует отдельного обдумывания и обсуждения. В названии диссертации использован термин «модуляция», который корректен, но не несет в себе информации о направлении наблюдаемого эффекта. Таким образом, вопросу о наилучшем термине для обозначения наблюдаемого явления не было уделено достаточного внимания. Приведенные замечания имеют дискуссионный характер или относятся к оформлению результатов и не умаляют научной ценности полученных данных, сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы. Ну, и заключение. Естественно, ссылки на положения все соответствующие. То, что диссертационная работа соответствует всем действующим «Положениям о присуждении ученых степеней», а сама Юлия Александровна, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. Официальный оппонент: Купраш Дмитрий Владимирович, это ИМБ имени Энгельгардта. Ну, и все.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо, Владимир Александрович. Юлия Александровна, пожалуйста, ответьте по существу на высказанные замечания или вопросы.

**Логашина Ю.А.:**

Я хочу выразить благодарность Дмитрию Владимировичу за конструктивный анализ моей диссертационной работы. Сравнение пептидов с другими агонистами не проводилось в связи с различным механизмом действия пептидов и известных модуляторов. Установление неспецифических эффектов и точного механизма действия пептидов - это предмет будущих исследований. Однако, в тесте на животных, в CFA, ранее были проведены эксперименты, в том числе и с пептидами, не действующими на рецепторы нейронов. И было показано, что пептиды не действуют на соответствующие рецепторы и, соответственно, не обладают анальгетическим и противовоспалительным действием. Задачи сравнить пептиды между собой в данной работе не было. Для пептида Ms 9a-1 проводились эксперименты в более высоких концентрациях, и было показано, что увеличение, еще большего увеличения ответа на активирующий стимул, не происходит. И также не происходит дефункционализация рецептора, что вероятно связано с тем, что пептиды имеют различный механизм действия. Несоответствие ординат на диаграммах связано с тем, что эксперименты были разнесены во

времени. Но, даже по имеющимся данным, можно сделать вывод, что Ms 9a-1 является более перспективным кандидатом для разработки анальгетического препарата с противовоспалительными свойствами. Он обладает более выраженными анальгетическими эффектами *in vivo* и меньшими действующими концентрациями *in vitro*. Антимикробный эффект Ueq 12-1 был найден при независимом скрининге фракций яда на наличие антибактериальной активности. Пептид обладает умеренным эффектом, поэтому очевидно, что его эффект является побочным действием, и вряд ли можно использовать данный пептид как чистый антибактериальный препарат. Я прошу прощение за присутствие технического и лабораторного жаргона в диссертационной работе, а также за использование термина «потенцирование», который не имеет в русском языке четкой формулировки. В диссертации мы говорим о «потенцировании» в фармацевтическом смысле, то есть как усиление действия одного вещества другим. Однако, впредь, я буду внимательнее следить за используемой терминологией и постараюсь избегать неоднозначных выражений. Спасибо.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Так, теперь мы продолжаем публичную дискуссию. Кто хотел бы высказаться о рассматриваемой работе, пожалуйста. Да, Сергей Александрович.

**Д.х.н. Козлов С.А.:**

Уважаемые коллеги, вот мы сегодня заслушали диссертацию Юлии Александровны, и я хотел бы выступить, как-то очень коротко, учитывая время, в поддержку этой диссертации и попросить Вас благоприятно рассмотреть все эти маленькие замечания, которые нашла и ведущая организация, и рецензенты. Но мы знаем, что это стандартно, что при написании больших работ всегда есть опечатки, описки и технические жаргонные термины просто нельзя вытравить из научных сотрудников, которые пытаются всегда вставить какое-нибудь веселое слово и потом забыть его исправить при финальной правке. Но, даже судя по дискуссии, видно, что работа, в общем-то, затронула «за живое», что очень много практического материала сделано и есть где развернуться пытливному уму оппонентов и рецензентов. И я думаю, надо так к этому относиться: что работа большая и реально очень интересные результаты, в том числе, вот первые потенциаторы или, там, пептиды усиливающие действие. Впервые получен рекомбинантный белок, к которому удалось сделать первую пространственную структуру такого типа. Это, в общем, по нашей специальности два хороших таких достижения. Прошу поддержать.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Еще есть желающие выступить? Пожалуйста.

**Зам. дир. по научной работе ИБК РАН, к.б.н. Масулис И.С.:**

Уважаемые коллеги... Я не рассчитывала на такое организованное выступление. Ну, я совершенно незапланированно присутствую на этой защите, как коллега первого официального оппонента. Я хотела на такую вещь обратить внимание, не была знакома заранее с содержанием этой работы, но возникли, очень забавные, скажем так, ассоциации. Возможным продолжением этой работы и тем развитием зерна интереса к пептидам морских беспозвоночных может быть постановка задачи – задуматься об эволюционном значении этих пептидов в жизни, в том числе, морских биоценозов. То есть вот, совершенно неожиданная такая, как бы вот ассоциация. И стоит об этом, подумать и провести некий поиск потенциальных мишеней у других организмов, в том числе у организмов обитающих, у морских обитателей, которые живут при совершенно других температурных условиях. У них может быть совершенно другое строение соответствующего рецепторного аппарата.

Поэтому, на самом деле, работа пробуждает очень много интересных ассоциаций и заслуживает самой высокой оценки.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. Но, я думаю, что, на самом деле, такие работы у нас уже ведутся, по скринингу. Коллеги, еще кто-то хотел бы сказать? Тогда, позвольте, я еще коротко добавлю. Ну, мое выступление не будет касаться научной части работы, потому что я работу уже видел заранее, а вот Сергей Александрович меня спровоцировал на короткое выступление. Я позволю не во все с ним согласиться себе. В частности, вопрос о том присутствует ли жаргон, ошибки, опечатки. Я считаю, что все-таки эти вопросы надо решать соискателю, обращаться к более опытным коллегам, руководителю и так далее, потому что, ну, я считаю, что не может быть оправдания, вот, особенно ошибкам и некорректным выражениям. Обычно их много – это правда. Но бывают работы близкие к идеальному, как бы, варианту. И я считаю, что тут не надо останавливаться, а надо к этому стремиться. Спасибо.

Заключительное слово у нас предоставляется Юлии Александровне, пожалуйста.

**Логашина Ю.А.:**

Уважаемые коллеги, члены диссертационного совета, я бы хотела в первую очередь поблагодарить своего научного руководителя, Андреева Ярослава Алексеевича, за то, что он терпеливо вел меня к защите, направлял мои научные исследования и всегда очень хорошо мотивировал. Также я благодарна Гришину Евгению Васильевичу, поскольку он был первым моим научным руководителем, и он открыл для меня двери науки. Я благодарна Минееву Константину Сергеевичу за определение пространственной структуры Ueq12-1, и Шелухиной Ирине Валерьевне за помощь в проведении экспериментов на DRG нейронах. Также я хочу выразить благодарность норвежским коллегам за предоставление актиний и проведение скрининга антимикробной активности Ueq12-1. А также спасибо Отделу биологических испытаний за помощь в проведении экспериментов на животных. И большое спасибо всей Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов, а также моей семье, моим родным, близким, друзьям за то, что они меня все время поддерживали, подбадривали, придавали мне силы и верили в то, что я дойду до конца и защищу диссертацию. Спасибо.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо. На этом мы завершаем заседание нашего совета и сейчас приступаем к голосованию. Объявляется перерыв для тайного голосования.

*(Проходит тайное голосование.)*

*(Вносятся редакционные поправки в проект заключения Диссертационного совета. С учетом внесенных поправок проект заключения принимается единогласно)*

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

А сейчас, коллеги, заслушаем результаты голосования.

**Уч. секретарь, д.ф.-м.н., Олейников В.А.:**

Работала счетная комиссия в составе Олейников, Бовин, Зубов. Защита Логашинной Юлии Александровны. Присутствовал на заседании 21 член диссертационного совета, роздано бюллетеней – 21, «за» – 20, «против» – 1, недействительных нет. То есть все в порядке.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Спасибо, Владимир Александрович. Да, необходимо утвердить результаты подсчета голосов. Кто за? Против? Воздержался? Единогласно.

**Уч. секретарь, д.ф.-м.н., Олейников В.А.:**

Поздравляю.

**Заместитель председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.:**

Да, поздравляем соискателя с успешной защитой, и на этом наше заседание объявляется закрытым.

Заместитель председателя диссертационного совета  
Доктор физико-математических наук

Ученый секретарь диссертационного совета  
Доктор физико-математических наук



Ефремов Р.Г.

Олейников В.А.