

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Логашинной Юлии Александровны

на тему «**ПЕПТИДЫ морских анемонов, модулирующие активность TRPA1 рецепторов**», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 — биоорганическая химия.

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Логашинной Ю.А. посвящена поиску и характеристике пептидных модуляторов рецептора TRPA1 в ядах актиний (называемых также морскими анемонами). Рецептор TRPA1 (от англ. "transient receptor potential ankyrin 1") - часть сенсорной системы, воспринимающей и передающей множество видов болевых сигналов от потенциально вредных (так называемых "ноцицептивных") стимулов. TRPA1 отвечает за механочувствительность и термочувствительность, участвует в детекции летучих раздражителей в дыхательных путях. Активация TRPA1 опосредует развитие непосредственных защитных реакций - кашля, расслабления гладких мышц кровеносных сосудов, увеличения подвижности желудочно-кишечного тракта, термогенеза, а также последующего воспаления. Молекулы, модулирующие активность TRPA1, могут быть полезны для исследования роли экспрессирующего этот рецептор нейронов в физиологических и патологических состояниях. Среди известных модуляторов TRPA1 есть два неселективных пептидных антагониста, которые были найдены в ядах тарантула (*Thrixopelma pruriens*) и бразильского странствующего паука (*Phoneutria nigriventer*). В данной работе из ядов актиний *Metridium senile* и *Urticina eques* были выделены два пептида, которые селективно действуют на TRPA1, усиливают действие его агонистов *in vitro* и демонстрируют анальгетическую и противовоспалительную активность *in vivo*. Пептидных продуктов с такими свойствами ранее описано не было, поэтому актуальность рецензируемой работы и ее научная новизна не вызывают сомнений.

Структура и объем диссертации

Диссертация Логашинной Ю.А. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы с описанием собственных результатов исследования и их обсуждением, выводов и списка литературы. Работа изложена на 149 страницах, содержит 38 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 360 источников, большинство из которых датированы последним десятилетием.

Во «Введении» автор формулирует цели и задачи своей работы, кратко обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и практическую значимость результатов.

Раздел «Обзор литературы» состоит из трех основных частей, первая посвящена описанию общих механизмов восприятия боли, вторая – характеризует семейство TRP каналов, их локализацию и функции, а третья

подробно описывает структуру TRPA1, физиологические и патофизиологические процессы с участием рецептора, а также известные модуляторы TRPA1 и их клинические перспективы. Кроме того, автор описывает молекулярный механизм, который может лежать в основе анальгетического эффекта некоторых активаторов рецептора и представлять собой основу для лечения болезненных состояний, связанных с избыточной активностью TRPA1. Обзор хорошо структурирован, отражает современные представления о предмете исследования, позволяет оценить актуальность темы диссертации, и свидетельствует о высокой квалификации диссертанта в области биоорганической химии и смежных дисциплин.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание научно-методологических подходов, примененных автором для решения поставленных задач. В разделе перечислены реактивы, оборудование и биологические объекты, использованные в работе. Применявшиеся в работе методы включали твердофазную экстракцию, хроматографическое разделение, биоинженерные подходы, гетерологическую экспрессию пептидов в бактериях, анализ биологической активности пептидов с помощью кальциевого имиджинга и электрофизиологического тестирования, а также тестирование на животных моделях. Для проведения функциональных исследования *in vitro* автором были использованы клеточная линия CHO, стабильно экспрессирующая TRPA1, первичная культура DRG нейронов и ооциты *Xenopus laevis*, экспрессирующие рецептор. Оценки биологической активности *in vivo* осуществлялась с помощью двух мышиных моделей – модели ноцицептивного ответа, индуцированного селективным агонистом TRPA1, и модели воспаления в ответ на введение полного адьюванта Фрейнда. Подробность описания материалов и методов достаточна для понимания специалистами, но не для воспроизведения экспериментов без привлечения дополнительной литературы. Такая лаконичность является неизбежным следствием разнообразия использованных методов, которое производит сильное впечатление и отражает широкий кругозор и высокую экспериментальную квалификацию диссертанта.

Раздел «Результаты и обсуждения» подтверждает успешное решение диссертантом всех поставленных задач. Описано строение пептидов, выделенных из ядов актиний, проведен подробный сравнительный анализ их структуры. Показано, что оба пептида обладают усиливающим действием на агонист-опосредованную активацию крысиный TRPA1 на клетки в культуре, что в экспериментах на мышах выражается в достаточно парадоксальной противовоспалительной и анальгетической активности. Кроме того, пептид из яда *U. eques* имеет уникальную пространственную структуру и обладает дополнительной антибактериальной активностью. Выделенные диссертантом новые пептиды из ядов морских анемонов являются первыми селективными пептидными модуляторами рецептора TRPA1 с новыми нетривиальными свойствами, придающими этим веществам потенциальную практическую значимость. Полученные результаты изложены достаточно ясно и подробно,

проиллюстрированы соответствующими рисунками и таблицами, которые облегчают восприятие материала.

В целом диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне и производит хорошее впечатление. Сформулированные в работе выводы базируются на обширном экспериментальном материале. Анализ основных результатов исследования проведен с привлечением современных литературных данных.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов.

В диссертационной работе Логашиной Ю.А. были получены новые приоритетные данные, в частности, показано, что усиление действия агонистов TRPA1 пептидами из ядов актиний *M. senile* и *U. eques* может приводить к анальгетическому и противовоспалительному эффекту в животных моделях. Такая модуляция активности рецептора, индуцирующая анальгетический эффект, может оказаться привлекательной терапевтической стратегией для ингибирования нейрогенного воспалительного ответа, поскольку существующие ингибиторы TRPA1 имеют высокие эффективные дозы, а частичные агонисты вызывают сначала боль, а затем аналгезию. Исследованные пептиды могут также служить инструментами для исследования участия TRPA1-экспрессирующих нейронов в физиологических и патологических состояниях.

В работе впервые описан новый, двенадцатый, класс токсинов морских анемонов, к которому относится пептид из яда *U. eques*. Токсин имеет уникальную первичную последовательность, а его пространственная структура по укладке полипептидной цепи отчасти похожа на известные структуры дефензин-подобных антибактериальных пептидов. Это сходство функционально проявляется в наличии у данного пептида антибактериальных свойств, что было проверено Логашиной Ю.А. экспериментально.

Таким образом, представленные исследования являются новыми и имеют как теоретическую, так и практическую значимость.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса современных методов исследований, грамотно спланированными экспериментами, тщательным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки материала. Выводы диссертационной работы основаны на полученных результатах и сформулированы корректно. Содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации.

Результаты диссертационной работы были представлены автором на международных и российских научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в научных изданиях, рекомендованных Министерством образования и науки Российской Федерации для опубликования результатов диссертационных работ. Кроме того, по

результатам диссертации получен один патент. Следует особенно отметить публикацию Logashina et al, J Biol Chem. 2017; 292:2992. Несмотря на заметное падение импакт-фактора в последние годы, JBC остается одним из самых уважаемых журналов в области биоорганической химии, с высокими стандартами рецензирования. Статья в этом журнале является объективным свидетельством качества проекта и высокой профессиональной квалификации первого автора работы.

При детальном ознакомлении с диссертацией возникает ряд замечаний:

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. 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.

3. 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 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 Ms9a-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 Ueq12-1, 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. 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?

5. 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 Ueq12-1 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.

6. Текст диссертации содержит значительное количество нечетких формулировок и злоупотреблений техническим и лабораторным жаргоном, не искажающих смысла, но затрудняющих 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.

7. 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 Ueq12-1 и Ms9a-1 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 рецептора CFTR, которые влияют на время, в течение которого он остается открытым. Возможно, исследованные пептиды действуют на TRPA1 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, не умаляют научной ценности полученных данных и сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы.

Заключение

На основе всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа Логашиной Юлии Александровны «Пептиды морских анемонов, модулирующие активность TRPA1 рецепторов» является цельным законченным научным исследованием и 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; 29.05.2017 г. № 650), а сама Юлия Александровна, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 — биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Купраш Дмитрий Владимирович,

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 (ФГБУН ИМБ РАН),
доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корр. РАН



119991, Москва, ул. Вавилова, 32
8(499) 135-9770
kuprash@eimb.ru

Подпись д.б.н., член-корр. РАН Купраша Д.В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН

к.в.н. **Бочаров А.А.**

