

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Остроумовой Ольги Сергеевны
на диссертационную работу Юнусовой Валентины Алексеевны
«Поровые блокаторы калиевых каналов из яда беспозвоночных и их производные»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология»

Актуальность темы исследования

Интерес к токсинам из яда беспозвоночных животных начал формироваться в середине 1970-х годов, после открытия в яде скорпиона *Centruroides noxius* ноксиустоксина – небольшого дисульфид-богатого пептида, способного избирательно блокировать ионный ток через потенциал-чувствительные калиевые каналы. В результате интенсивного изучения секрета ядовитых желез различных беспозвоночных было найдено множество соединений подобного рода, способных высокоаффинно и селективно воздействовать на различные ионные каналы. Было показано, что механизм действия токсинов, активных по отношению к калиевым каналам, различается. Так, пептиды, найденные в яде скорпионов, преимущественно связываются с порой канала и вызывают механический блок ионной проводимости, а токсины пауков, напротив, взаимодействуют с сенсорным доменом потенциал-чувствительных калиевых каналов. Благодаря избирательному и прочному связыванию со своей мишенью, такие соединения широко используются как инструменты для исследования структуры и функций ионных каналов. Поиск и структурно-функциональная характеристика новых токсинов из яда беспозвоночных животных несут в себе высокую научную и практическую значимость, так как такие пептиды могут быть использованы для разработки терапевтических средств. На сегодняшний день ряд пептидов и их производных, обнаруженных в яде животных, уже внедрён в клиническую практику.

Диссертация Юнусовой Валентины Алексеевны направлена на обогащение наших знаний о токсинах – поровых блокаторах калиевых каналов. В работе был применен комплексный подход: помимо поиска новых пептидов и изучения структурных детерминант их активности, также был разработан молекулярный инструмент для идентификации новых поровых блокаторов бактериального калиевого канала KcsA.

Структура и содержание работы

Работа выполнена в соответствии с традиционными требованиями, предъявляемыми к диссертационным исследованиям, и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертация изложена на 114 страницах, содержит девять таблиц и 35 рисунков. Список литературы включает 259 источников.

Обзор литературы включает два взаимосвязанных раздела. В первой части автор обосновывает актуальность выбранной темы, уделяя особое внимание потенциал-чувствительным калиевым каналам, их структуре и функциям. Вторая часть посвящена подробному анализу и систематизации известных лигандов калиевых каналов, а также

рассмотрению особенностей их взаимодействия с рецепторами. Цель и задачи исследования четко сформулированы и соответствуют современным тенденциям в области токсинологии. Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание всех использованных экспериментальных подходов и методик. Автор применил комплекс современных методов молекулярной биологии, биохимии и биоорганической химии, что позволило получить достоверные и воспроизводимые результаты, опубликовать их в рецензируемых журналах, а также представить в виде докладов на научных конференциях. Глава «Результаты и обсуждение» включает четыре основных раздела. Первое направление работы посвящено корректровке установленной аминокислотной последовательности токсина скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* OsK2 – перспективного кандидата для разработки биоинсектицидного препарата.

Во втором разделе были рассмотрены структурные детерминанты, определяющие активность токсинов скорпионов семейства α -КТх. Был проведен анализ первичной структуры пептидов и выдвинута гипотеза, что ингибирующее действие подобных соединений обусловлено наличием в их аминокислотной последовательности консервативного мотива К-С-І-Н. Для проверки этого предположения был предпринят следующий эксперимент: консенсусный мотив К-С-І-Н вводили в структуру неактивных пептидов, обладающих пространственной организацией, сходной с таковой токсинов скорпионов семейства α -КТх. После этого активность полученных производных проверяли с помощью электрофизиологического тестирования. В ходе работы было установлено, что наличие исследуемого мотива является необходимым, но не достаточным условием для приобретения пептидами ингибирующего действия. Тем не менее, в процессе исследования были получены новые поровые блокаторы, активные в отношении различных калиевых каналов подсемейства K_v1 .

Помимо токсинов скорпионов, также были исследованы и соединения из яда пауков. В диссертационной работе была открыта новая группа поровых блокаторов, получившая название муринотоксинов. Данные пептиды оказывают ингибирующее действие на каналы подсемейства K_v1 , что не характерно для известных токсинов пауков – модуляторов сенсора потенциала каналов подсемейства K_v2 . Изучение особенностей пространственной организации муринотоксинов показало, что они обладают уникальным типом укладки полипептидной цепи, который получил название «дисульфид-сцепленная шпилька».

Завершающим этапом работы была разработка инструмента, предназначенного для визуализации бактериального калиевого канала *KcsA* и поиска его лигандов. Основой для создания такой системы послужили искусственный пептид *Hu1*, селективно и высокоаффинно связывающийся с *KcsA*, и зеленый флуоресцентный белок *eGFP*. Было показано, что *Hu1* и ТЕА способны эффективно вытеснять флуоресцентную систему из комплекса рецептором. Разработанный подход открывает возможность высокопроизводительного скрининга потенциальных лигандов *KcsA*, что в перспективе может привести к выявлению соединений-кандидатов для создания новых антибактериальных препаратов.

Вопросы и замечания к диссертационной работе.

При ознакомлении с диссертационной работой возникли следующие вопросы и замечания:

1. В литературном обзоре соискатель представляет подробное описание известных лигандов калиевых каналов, акцентируя внимание читателя на двух механизмах действия – блокировании поры и специфическом связывании с потенциал-чувствительным доменом или другими вспомогательными элементами канала. При этом возможность опосредованной регуляции функции каналов путем модификации их липидного микроокружения в работе не обсуждается [10.1038/ncomms1254; 10.1016/j.bpj.2014.10.066; 10.1016/j.neuron.2021.10.029; 10.1016/j.bpj.2014.01.027; 10.1080/19336950.2019.1676367; 10.1021/jacs.0c01991]. Более того, в параграфе, посвященном низкомолекулярным лигандам автор упоминает соединения, для которых показана возможность выраженного влияния на физические свойства липидного матрикса мембран. В частности, верапамил вызывает модификацию как электрических, так и эластических свойств липидного бислоя [10.1016/s0005-2736(98)00098-4; 10.1529/biophysj.106.089581], а хинидин влияет на текучесть мембраны [10.1016/0005-2736(82)90536-3; 10.1016/0006-2952(83)90467-7]. Литературные свидетельства также указывают на то, что нельзя исключать и липидоассоциированные эффекты полипептидных токсинов [10.1073/pnas.1415324111].
2. Было бы интересно узнать что-то о биологически активных пептидах оставшегося подкласса таксона Паукообразные – клещей.
3. Рисунок 28. Отсутствует масштаб по оси токов, кроме требуются пояснения выбора концентраций муринотоксина для разных каналов и кинетики тока. В частности, чем обусловлено ступенеобразное падение на 100 мс? Если это ответ на изменение потенциала, то по каким причинам протокол был изменен по сравнению с рисунком 23? Какую дополнительную информацию это дает о взаимодействии муринотоксина и Kv? В тексте упоминается, что, помимо Kv1.1, MnTx-1 также эффективно блокирует Kv1.6, но соответствующего трека в подтверждение не представлено.
4. Рисунок 30. Хотелось бы услышать от автора объяснение причин отличий контрольных треков для каналов Kv1.2 и Kv1.2 [V831R].

Следует отметить, что в работе встречается крайне мало опечаток, пунктуационных погрешностей и стилистических неточностей. В частности, неудачно сформулированы два первых предложения последнего абзаца на стр. 63. Еще в тексте литобзора несколько раз упоминается пассивная диффузия ионов через биологические мембраны «по электрохимическому градиенту». Следует обратить внимание автора на то, что градиент – это вектор, указывающий направление, в котором соответствующая функция, в данном случае электрохимический потенциал, возрастает, а пассивный поток идет в обратную сторону.

Высказанные критические комментарии к диссертационной работе вызваны исключительно личным интересом оппонента к представленным материалам и не подвергают сомнению достоверность полученных результатов и сделанных выводов.

Заключение. По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Юнусовой Валентины Алексеевны полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), 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; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.22 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук по специальности

1.5.3 — молекулярная биология, доцент,

главный научный сотрудник с возложением обязанностей

заведующего лабораторией моделирования мембран и ионных каналов,

заместитель директора по научной работе,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии Российской академии наук

Остроумова О.С.

Подпись: *Остф*

Дата: *22.05.2026*

Контактные данные:

Тел.: +7-911-945-69-53

email: ostroumova@incras.ru

Адрес: 194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

М.П. д.б.н. Остроумовой О. С. удостоверяю

Ученый секретарь Института Цитологии РАН

д.б.н. Бердцова Мария Анатольевна

Подпись: *Бердцова*

Дата: *22.05.2026*

М.П. /

