

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по образовательной деятельности
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
д.ф.-м.н., доцент
Екатерина Александровна Турилова



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" на диссертационную работу Андреева Ярослава Алексеевича «Природные лиганды нейрональных кислоточувствительных и термочувствительных каналов: структурно-функциональная характеристика и терапевтический потенциал», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Андреева Я.А. посвящена решению актуальной фундаментальной и прикладной проблемы современной биоорганической химии и молекулярной нейробиологии – поиску и структурно-функциональной характеристике новых природных лигандов ионных каналов сенсорных нейронов (TRPV1, TRPA1, ASIC3), участвующих в восприятии внешних стимулов и инициации нейрогенного воспаления.

Хроническая боль является одним из наиболее распространенных и социально значимых патологических состояний, существенно снижающих качество жизни населения. Существующие анальгетические средства (опиоиды, НПВП) обладают серьезными ограничениями – от риска развития зависимости

и угнетения дыхания до желудочно-кишечных и сердечно-сосудистых осложнений. В связи с этим разработка новых классов анальгетиков, селективно действующих на периферические механизмы формирования болевого сигнала, является одной из важных задач современной фармакологии. Источником активных соединений стали образцы экстрактов морских анемонов и лекарственных растений. Опыт получения фармакологических субстанций однозначно указывает, что именно в них могут быть обнаружены селективные и высокоаффинные лиганды мембранных каналов и рецепторов. Таким образом, диссертация обладает несомненной актуальностью как для развития фундаментальных представлений о механизмах работы ионных каналов, так и для создания новых кандидатов в лекарственные препараты.

Научная новизна

Диссертант в ходе работы впервые идентифицировал ряд новых модуляторов ионных каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3. Так, впервые обнаружены и охарактеризованы пептидные ингибиторы TRPV1 (APHC1–3) из морской анемоны *Heteractis crispa*. Эффект данных пептидов зависит от типа и интенсивности активирующего стимула *in vitro*, а на животных они оказывают значительный анальгетический эффект в различных моделях боли и воспаления. Выделены первые пептидные положительные модуляторы канала TRPA1 их экстрактов морских анемонов (Ms 9a-1 из *Metridium senile* и Ueq 12-1 из *Urticina eques*), обладающие анальгетической и противовоспалительной активностью за счет индуцированной десенситизации нейронов.

Идентифицированы новые лиганды ASIC3, включая пептиды Ugr 9a-1 (с новым типом пространственной укладки) и Hcr 1b-1, низкомолекулярные соединения – лигнан севанол из *Thymus armeniacus*, алкалоид линдолдхамин из *Laurus nobilis*, а также эндогенные изохинолиновые алкалоиды (тетрагидропапаверолин, ретикулин).

Впервые показано ингибирование обеих компонент тока ASIC3 природными соединениями (Ugr 9-1, севанол). Установлены структурные детерминанты, определяющие связывание севанола и Ugr 9-1 с ASIC3 каналом.

Теоретическая и практическая значимость

Диссертационное исследование Андреева Я.А. обладает высокой теоретической и практической значимостью, что подтверждается как фундаментальными открытиями, так и прикладными разработками, доведенными до стадии доклинических испытаний.

Теоретическая значимость. В ходе работы Андрееву Я.А. удалось расширить представления о возможностях модуляции TRP каналов. Впервые показано, что природные пептиды (APHС1–3) могут по-разному влиять на активность TRPV1 в зависимости от типа и интенсивности активирующего стимула (капсаицин, рН, 2АРВ). Это открывает новое направление в исследовании аллостерической регуляции TRP-каналов и позволяет пересмотреть классическую концепцию «антагонист/агонист» в пользу более сложной модели разных конформационных состояний канала.

В работе предложена новая парадигма фармакологического воздействия на TRPA1. Обнаружение пептидных положительных модуляторов TRPA1 (Ms 9a-1, Ueq 12-1), которые усиливают ответ канала на агонисты, но при этом в условиях *in vivo* проявляют анальгетический эффект, опровергает упрощенное представление о том, что активация TRPA1 всегда приводит к усилению боли и воспаления. Предложенный механизм (десенситизация TRPA1-положительных нейронов через их стимуляцию) создает теоретическую основу для разработки нового класса анальгетиков, действующих на TRPA1 – «десенситизаторов».

Поиск новых лигандов TRP и ASIC каналов привел к расширению знаний о структурном разнообразии пептидов морских анемонов. Установлены новые типы пространственной укладки для пептидов Ugr 9-1 (компактная β-шпилька) и Ueq 12-1 (уникальная W-образная структура с нехарактерным для известных токсинов расположением дисульфидных связей), что расширяет

таксономию структурных классов токсинов Cnidaria и создает основу для дальнейшего структурно-функционального анализа.

В ходе работы были обнаружены новые инструменты для изучения каналов ASIC. Идентификация первых природных соединений, ингибирующих обе компоненты тока ASIC3 (быструю и медленную), а также открытие эндогенных агонистов этого канала (тетрагидропапаверолин, ретикулин) позволяет по-новому взглянуть на физиологическую роль ASIC3 в норме и при патологии.

Методологическое значение. Разработанная система получения рекомбинантных пептидов с использованием тиоредоксина и последующего рефолдинга может быть экстраполирована на другие пептиды с большим количеством дисульфидных связей, которые трудно экспрессировать в бактериальных системах.

Практическая значимость. Пептид APHC3 и низкомолекулярное соединение севанол успешно прошли доклинические испытания, что подтверждает высокий прикладной потенциал работы. APHC3 и севанол являются готовыми кандидатами для расширенных доклинических и последующих клинических исследований в качестве анальгетиков нового поколения. Положительные модуляторы TRPA1 (Ms 9a-1 и др.) открывают новую фармакологическую стратегию – использование десенситизации болевых нейронов для терапии воспалительных заболеваний (в частности, остеоартрита).

По результатам работы получено 7 патентов РФ (в том числе патенты на пептиды APHC1–3, Ugr 9-1, севанол). Это обеспечивает приоритет разработок и создает предпосылки для их коммерциализации.

Степень достоверности результатов

Представленные в диссертации положения, выносимые на защиту, и выводы являются обоснованными и достоверными. Это обеспечивается корректным дизайном экспериментов, включающим адекватные положительные и отрицательные контроли на всех этапах – от скрининга природных экстрактов до поведенческих тестов на животных. Следует

отметить, что были использованы современные и взаимодополняющие методы: высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, двухэлектродная фиксация потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*, флуоресцентная спектроскопия для измерения внутриклеточного Ca^{2+} , ПЦР (RACE), методы молекулярного моделирования, а также стандартизованные поведенческие тесты на грызунах.

Основные результаты диссертации опубликованы в 46 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также в 7 патентах РФ. Результаты представлены в виде 38 докладов на международных и всероссийских научных конференциях. Публикационная активность соискателя и широкая апробация свидетельствуют о высоком уровне и признании полученных результатов.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 255 страницах, структура включает следующие разделы: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, включающий 559 источников. Диссертация содержит 83 рисунка и 4 таблицы.

Раздел «Введение» содержит обоснования актуальности выполненного исследования, научной новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов. В данном разделе обозначены цели и задачи работы и определены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения о личном вкладе автора, апробации результатов исследования.

В разделе «Литературный обзор» последовательно изложен материал о TRPV1, TRPA1 и ASIC3 каналах. Приведены исторические факты об их открытии и эволюции представлений их участия в нормальных и патологических процессах. Также представлены данные об основных агонистах и антагонистах каналов, их анальгетической и противовоспалительной активности.

В главе «Материалы и методы» представлены материалы и методы, использованные при выполнении работы. В целом, этот раздел написан достаточно подробно, хотя некоторые методики очевидно упущены.

В разделе «Результаты и их обсуждение» изложены результаты работы и с их подробным анализом с учетом литературных данных. В ходе работы было выделено и изучено значительное количество новых природных модуляторов каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3. Установлены параметры взаимодействия полученных модуляторов с каналами мишени, для самых активных молекул был проверен их потенциал на животных в качестве анальгетических и противовоспалительных средств.

В разделах «Заключение» и «Выводы» резюмируются итоги выполненного исследования и формулируются основные результаты.

Диссертационная работа Андреева Я. А. является подробным и обстоятельным исследованием, построена логично, выполнена на высоком экспериментальном уровне. Выводы конкретны и полностью отражают результаты, обладающие несомненной новизной. Диссертация написана хорошим языком и позволяет заинтересованному читателю быстро войти в круг обсуждаемых проблем. Результаты их должным образом обсуждаются, правильность интерпретации подтверждается постановкой необходимых контрольных экспериментов. Не возникает сомнений в достоверности выводов диссертации, а также в важности полученных результатов.

Вопросы и замечания

При анализе диссертационного исследования возникли следующие замечания и вопросы.

Замечания

1. В обзоре литературы встречаются некорректные фразы и определения, такие как «крысиных спинномозговых ганглиях», «чувствительно-эффекторную функцию», «тройнично-нервном ганглии», «корешках спинномозговых ганглиев», «предзрительной части гипоталамуса»

2. Не все экспериментальные методики подробно описаны. В ряде экспериментальных протоколов отсутствуют указания на время аппликации веществ (агонистов, антагонистов новых пептидов и тд).
4. В экспериментах *in vivo* использовалось интраназальное и пероральное введение вещества. При этом в методике нет описание этих методик.
5. Не все приведенные экспериментальные результаты были упомянуты в задачах исследования и охарактеризованы в выводах.

Вопросы

1. На стр. 99 рис. 23 "В экспериментах с патч-клампом ответы TRPV1 на агонист демонстрировали выраженное уменьшение со временем (run-down)". Не влияет ли наличие этого свойства на результаты, полученные в экспериментах с ингибирующим действием пептидов?
2. Почему анализ уровня внутриклеточного кальция был проведен только при исследовании TRPA1?
3. При исследовании TRPA1 автор указывает, что активация канала TRPA1 может приводить к анальгетическим эффектам. Было ли проведено исследование этих свойств активаторов TRPA1 с оценкой десенситизации TRPA1 и влияния TRPV1? Какой механизм активации TRPA1 будет определять боль или анальгетический эффект?
4. Было показано, что действие LIN на амплитуду быстрого компонента ASIC3 токов для hASIC (human) и rASIC (rats) различается, что указывает на видовую специфичность (рис. 78). Можно ли экстраполировать результаты экспериментов, полученных на крысах в *in vivo* экспериментах в моделях воспаления и боли, на человека?

Высказанные замечания, однако, не носят принципиального характера и не снижают ценности проделанной работы. Работа безусловно является важным и оригинальным научным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне.

Заключение

Диссертационная работа Андреева Ярослава Алексеевича «Природные лиганды нейрональных кислоточувствительных и термочувствительных каналов: структурно-функциональная характеристика и терапевтический потенциал» является законченным, самостоятельным, фундаментальным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. По своей актуальности, новизне, объему экспериментального материала, достоверности выводов и научно-практической значимости она полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям. Диссертационная работа Андреева Ярослава Алексеевича в полной мере соответствует критериям, установленным пунктами 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., с актуальными изменениями и дополнениями), а сам автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Отзыв составлен заведующим кафедрой физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» доктором биологических наук, профессором Ситдиковой Гузель Фаритовной.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», протокол № 8 от «15» мая 2026 г.

Сведения о ведущей организации: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Адрес: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

Тел.: +7 (843) 939-29-03

Электронная почта: public.mail@kpfu.ru

Сайт: <https://kpfu.ru>

Заведующий кафедрой физиологии человека и животных

Института фундаментальной медицины

доктор биологических наук,

профессор

Ситдикова Гузель Фаритовна

Подпись д.б.н. Ситдиковой Г. Ф.

«Удостоверяю»



вед. ст. пр. И. И. Злотова

«2» 06 2026 г.