

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Семеновой Светланы Борисовны  
на диссертацию Андреева Ярослава Алексеевича  
«Природные лиганды нейрональных кислоточувствительных и  
термочувствительных каналов: структурно-функциональная характеристика  
и терапевтический потенциал», представленную  
на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности  
1.4.9 – «Биоорганическая химия»

### **Актуальность темы**

Диссертация **Ярослава Алексеевича Андреева** посвящена поиску и характеристике новых природных молекул, которые могут модулировать активность ионных каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3 являющихся основными молекулами сенсорных нейронов, отвечающими на болевые стимулы. Роль этих ионных каналов в ноцицепции трудно переоценить, поскольку за открытие, в частности каналов TRPV1, в 2021 году Дэвиду Джулиусу и Ардему Патапутяну (David Julius and Ardem Patapoutian) была присуждена Нобелевская премия в области Физиологии и Медицины. В настоящее время в мировой науке и фармацевтике ведется активный поиск новых модуляторов активности этих каналов, поскольку есть убеждение, что это приведет к открытию современных терапевтических средств, обладающих анальгетической и противовоспалительной активностью. Актуальность данной проблемы определялась тем, что доступные анальгетические средства, имеют ряд ограничений, связанных с нежелательными побочными эффектами, кроме того, эти лекарства влияют на общий процесс передачи и распространения болевых сигналов, в то время как более эффективными могут быть высокоспецифичные молекулы, точно регулирующие работу болевых рецепторов и каналов.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость работы**

Является неоспоримой научная новизна и научно-практическая значимость диссертационной работы Я. А. Андреева в ходе, которой в яде морской

анемоны *Heteractis crista* были обнаружены пептиды APHC1–3 обладающие уникальными свойствами и влияющие на активность ваниллоидных рецепторов тип1 (каналов TRPV1). Пептиды APHC1–3 обладают значительным противовоспалительными и анальгетическими свойствами и поэтому являются крайне перспективными для разработки новых лекарственных препаратов. Приоритет авторов работы в мире признан и эти статьи цитируются в иностранных обзорах по данной теме. Кроме того, Я.А. Андреевым из ядов морских анемонов были выделены новые пептиды Ms 9a-1, Ueq 12-1, которые усиливают ответ анкириновых рецепторов тип1 (каналов TRPA1) на агонисты, при этом в тестах на животных они проявляют противовоспалительные и анальгетические свойства. Эти пептиды открыли новый подход к поиску противовоспалительных и анальгетических молекул, действующих на каналы TRPA1. Очень важным этапом диссертационной работы является также открытие новых лигандов, к другим болевым рецепторам, кислоточувствительным каналам ASIC3. К ним относятся пептиды морских анемонов - Hcr 1b-1 и Ugr 9a-1; полифенольное соединение - севанол (выделенное из чабреца); алкалоид из благородного лавра - линдолдхамин и эндогенные лиганды тетрагидропапаверолин и ректикулин. Все эти лиганды каналов ASIC3 могут открыть новые возможности для создания новых противоболевых лекарств.

Следует отметить, что Я. А. Андреев внес значимый вклад в развитие отдельного направления биоорганической химии. По новизне и научно-практической значимости диссертационная работа Я. А. Андреева бесспорно отвечает требованиям ВАК к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук.

### **Структура диссертации**

Диссертация оформлена должным образом. Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из Введения, Обзора литературы, описания использованных Материалов и Методов, изложения Результатов и их Обсуждения, Выводов и Списка литературы, содержащего ссылки на 559

источников. Работа изложена на 254 страницах, содержит 83 рисунка и 4 таблицы. Ниже изложен более подробный обзор содержания работы Я. А. Андреева.

### **Введение**

Во введении указана актуальность проблемы, направленной на поиск и изучение новых мишеней для борьбы с болевыми синдромами. Отмечено, что несмотря на множество уже известных анальгетиков, до сих пор нет эффективных средств, которые могли бы без побочных эффектов избавлять больных от страданий, связанных с болевыми синдромами различной этиологии. Обоснована точка зрения, касающаяся необходимости изучения новых молекул, таких как ионные каналы ASIC3, TRPA1 и TRPV1. Именно эти каналы являются сенсорными датчиками болевых стимулов и поиск их лигандов открывает новые перспективы для понимания механизмов возникновения боли и открытия новых анальгетических препаратов.

### **Цель и задачи работы**

*Цель работы* сформулирована как поиск и характеристика новых природных молекул, которые модулируют активность ионных каналов сенсорных нейронов таких как TRPV1, TRPA1 и ASIC3 которые обладают анальгетической и противовоспалительной активностью. Обозначено четыре задачи, детализирующие пути достижения цели исследования.

**Научная новизна** полученных результатов во введении раскрыта достаточно подробно. Из этого раздела видно, что заслугой Я. А. Андреева является открытие, выделение и характеристика новых модуляторов ионных каналов TRPV1, TRPA1, ASIC3, участвующих в ноцицепции. Из ядов морских анемонов были выделены новые пептиды APHC3, Hcr 1b-1, Ms 9a-1, Ueq 12-1, которые действуя на каналы TRPV1, TRPA1, ASIC3, а в тестах на животных проявляют противовоспалительные и анальгетические свойства. Кроме того, установлены новые лиганды для каналов ASIC3: лигнан севанол, алкалоид линдолдхамин и эндогенные лиганды тетрагидропапаверолин и ректикулин.

Эти лиганды наряду с остальными могут открыть возможности для создания новых противовоспалительных и противобололевых лекарственных средств.

### **Обзор литературы**

В Обзоре литературы, представленном в диссертации Я. А. Андреева, дана обширная информация относительно каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3. В виде отдельных разделов, детально рассмотрены структуры всех типов исследуемых каналов, с включением подробных иллюстраций. Особый интерес представляет описание основных функций этих каналов. Очень важно, что включены последние данные относительно известных агонистов и антагонистов описываемых каналов. Заслуживают отдельного внимания разделы, посвященные перспективам использования каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3 в качестве мишени для лекарственных средств. Объем данной главы составляет 66 страниц. Она содержит около двух десятков хорошо выполненных иллюстраций. Следует отметить хорошее изложение материала по исследуемой теме, его достаточно легко и интересно читать. Изложенный в Обзоре литературы материал, на мой взгляд, можно публиковать в виде отдельной монографии или обзора, а также использовать в учебном пособии для студентов биологических и медицинских вузов.

### **Материалы и методы**

Автор диссертационной работы использовал широкий спектр экспериментальных подходов. К ним относятся методы выделения и очистки образцов из морских анемонов и растений, исследование полученных веществ с помощью масс-спектрометрии, установление аминокислотной последовательности и получение рекомбинантных аналогов полученных образцов. Для исследования каналов были получены стабильные линии клеток CHO, экспрессирующих TRPA1 и TRPV1. В работе были использованы биоинформационные методы, кальциевый имиджинг и электрофизиологические измерения токов. В работу были также включены исследования активности полученных веществ на животных моделях, с использованием различных тестов. По обилию и разносторонности

примененных экспериментальных подходов диссертационная работа Я. А. Андреева отвечает современному уровню экспериментальной биологии. Материалы и методы описаны в 17 подразделах. В качестве замечаний нужно отметить большое количество опечаток, что выделяет эту главу из общего текста диссертации.

## **Результаты и обсуждение**

**В разделе 4.1.** данной главы описан поиск модуляторов функциональной активности TRPV1. В рамках исследования были протестированы различные яды и экстракты беспозвоночных животных. Всего было проанализировано 10 ядов паукообразных и 6 ядов или экстрактов морских беспозвоночных. В результате был выделен активный пептид с молекулярной массой около 6187 Да, который подавлял ионные токи, индуцированные капсаицином, в системе на ооцитах с экспрессированным TRPV1. Этот пептид получил название АРНС1 (Analgesic Polypeptide Heteractis Crispa). Была получена полная последовательности кДНК АРНС1 и выявлен гомологичный ген, кодирующий пептид АРНС2 ( $M_r \sim 6185$  Да). Также был выявлен третий пептид — АРНС3 ( $M_r \sim 6111$  Да), обладающий способностью ингибировать токи, вызываемые капсаицином. Автором был разработан метод получения рекомбинантных вариантов АРНС1–3. Измерение токов показало, что пептиды АРНС1, АРНС2 и АРНС3 (100 нМ) ингибировали ответы, вызванные 3 мкМ капсаицина, на  $22 \pm 8$ ,  $41 \pm 14$  и  $61 \pm 15$  % соответственно. Далее полученные вещества были исследованы на животных моделях боли *in vivo*. Было обнаружено, что каждый пептид значительно увеличивал латентность отдергивания задних лап на горячей пластине после введения. Все они блокировали индуцированное капсаицином болевое поведение у мышей. АРНС1–3 были эффективны в ослаблении боли, вызванной формалином и уменьшали количество судорог после введения уксусной кислоты. Кроме того, было выявлено противовоспалительное и обезболивающее действие пептида АРНС3 на моделях остео- и ревматоидного артрита.

**В разделе 4.2.** было описано выделение из морских анемонов пептидов, действующих на TRPA1. В работе были получены пептиды, которые получили название Ms 9a-1 и Ueq12-1. Были определены их первичные структуры и разработаны протоколы получения рекомбинантных Ms 9a-1 и Ueq12-1. Полученные рекомбинантные пептиды демонстрировали молекулярную массу и аминокислотную последовательность, идентичные природным аналогам, что было подтверждено масс-спектрометрией. Было показано, что пептиды Ms 9a-1 и Ueq 12-1 значительно усиливали активацию TRPA1 и кальциевый ответ, индуцированный агонистами АИТС и диклофенак. Также в работе было проведено изучение эффектов пептидных модуляторов TRPA1 в экспериментах на животных. Было отмечено положительное влияние пептидов на отек лапы, вызванный воспалением и температурой. Кроме того, Ms 9a-1 значительно облегчал вызванные МІА артритные симптомы, такие как отек суставов, вызванное болью поведение и гиперчувствительность к различным раздражителям у крыс. Авторы обосновано делают вывод, что пептид Ms 9a-1 может быть использован для разработки новых лекарственных препаратов.

**В разделе 4.3** описаны исследования лигандов кислоточувствительных каналов семейства ASIC. В ходе исследования было выделено несколько пептидов из морских анемонов и было показано, что Ugr 9-1 и пептид Hcr 1b-1 полностью подавлял быструю компоненту тока ASIC3, а введение Ugr 9-1 значительно уменьшало тепловую гиперчувствительность в экспериментах на моделях животных. Также авторами были выделены и исследованы лиганды ASIC каналов полученные из растений. Так было показано, что лигнан экстрагированный из чабреца (*Thymus armeniacus*) и получивший название севанол ингибирует ASIC1a и ASIC3 каналы. В моделях на животных внутривенное введение севанола значительно ослабляло тепловую гиперчувствительность, увеличивая время отдергивания воспаленной лапы от горячей пластины и уменьшало количество корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты. Комплексное исследование

севанола показало его перспективность для создания лекарственных средств нового поколения, направленных на функции кислоточувствительных каналов. Поэтому были проведены доклинические испытания, которые показали его эффективность и безопасность, что позволяет использовать эту молекулу в дальнейшей фармацевтической разработке. Следует отметить, что в работе были также получены экзогенные (LIN) и эндогенные активаторы ASIC - тетрагидропапаверолин (THP) и ретикулин. Анализ полученных данных справедливо привел авторов к выводу, что регуляция чувствительности ASIC3 канала эндогенными непротонными лигандами может быть частью процесса взаимной регуляции ноцицепции и антиноцицепции.

### **Заключение и выводы**

В главе Заключение кратко, но достаточно четко обсуждаются полученные результаты и обосновываются выводы. Большой заслугой автора следует признать обнаружение 16 новых лигандов для каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3. Более того, каждый из этих лигандов может быть рассмотрен в качестве кандидата для создания новых противовоспалительных или противоболевых лекарственных препаратов.

В порядке дискуссии хотелось бы услышать мнение Я. А. Андреева по поводу следующих вопросов:

1) При исследовании активности каналов в качестве внутреннего раствора использовали 3 М KCL, а снаружи стандартный физиологический раствор. Почему выбрали такие ионные условия? Проводились ли эксперименты со стандартным ионным составом для внутриклеточных растворов? 2) Как проверяли стабильную экспрессию каналов в клетках - ПЦР, иммуноблоттинг? Если нет, то почему? 3) Как отметил автор у Ueq 12-1 есть структурное сходство с природными дефензинами. Проверили ли антибактериальные свойства у Ueq 12-1. Использовали ли природные дефензины для проверки действия на каналы? 4) Автор описывают усиление ответов каналов TRPA1 на агонисты АТС или диклофенак при действии

пептидов Ms 9a-1 и Ueq 12-1. Однако в опытах на животных эти пептиды демонстрировали анальгезирующий эффект. Автор объясняет этот эффект *in vivo* результатом снижения возбудимости нейронов, экспрессирующих TRPA1. Если этот эффект происходит в результате десенситизации рецептора, то почему этого не наблюдается в электрофизиологических экспериментах, где эффект должен более ярким?

### **Автореферат**

Содержание автореферата полностью соответствует основному тексту диссертации.

### **Замечания**

Некоторые замечания, касающиеся содержания диссертации уже были обозначены выше. Они не имеют принципиального характера. В дополнение к ним добавлю следующее. Автор использует слово компонента то в женском, то в мужском роде «медленного компонента тока ASIC3» и «медленной компоненты тока канала ASIC3». Наверно, лучше определиться, и отнести используемое слово к одному роду!

### **Заключение**

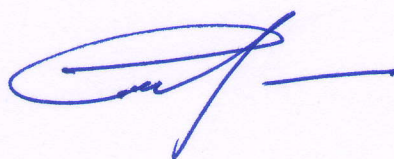
Оценивая соответствие работы Я. А. Андреева основным требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук можно отметить, что по содержанию она соответствует теме 1.4.9 – «**Биоорганическая химия**»

Результаты опубликованы в 46 статьях, входящих в перечень ВАК, и доложены на многочисленных отечественных и международных конференциях и симпозиумах. Представленные данные получены лично автором и полностью оригинальны.

С учетом актуальности темы, большого объема исследований, научной новизны, достоверности полученных данных и высокого научно-методического уровня, а также теоретических положений, разработанных автором, которые можно квалифицировать как научное достижение в области

**биоорганической химии**; считаю, что диссертационная работа «Природные лиганды нейрональных кислоточувствительных и термочувствительных каналов: структурно-функциональная характеристика и терапевтический потенциал» соответствует требованиям п.9-14 действующей редакции «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (со всеми актуальными изменениями и дополнениями), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Андреев Ярослав Алексеевич несомненно заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Доктор биологических наук  
старший научный сотрудник  
Группы ионных механизмов  
клеточной сигнализации  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
«Институт цитологии  
Российской академии наук»,  
Семенова Светлана Борисовна



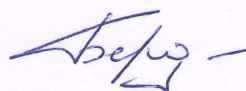
194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4  
Тел. +7 (812) 297-44-20. E-mail: svsem@incras.ru

Подпись д.б.н. Семеновой С. Б.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь Институт цитологии РАН

к. б. н. Бердиева Мария Анатольевна



14. март

2014

