Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
(Минобрнауки России)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИНЦ РАН)

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,
эл.адрес: cellbio@incras.ru; http://www.incras.ru
ИНН 7802030531, КПП 780201001

21.10.2026 № 12316-662-306

На № _____ от _____

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

Исполняющий обязанности директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
цитологии Российской академии наук

Член-корреспондент РАН

_____ Томилин А.Н.

«21» октября 2026 г.

МП

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Василевского Александра Александровича на тему «Токсины паукообразных: многообразие, фундаментальные и прикладные аспекты», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

1. Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа А.А. Василевского посвящена одной из наиболее динамично развивающихся областей биоорганической химии и токсинологии – изучению токсинов паукообразных. Актуальность темы не вызывает сомнений и определяется несколькими обстоятельствами. Во-первых, яды пауков и скорпионов представляют собой богатейший, но всё ещё недостаточно изученный источник полипептидных лигандов ионных каналов и нейрорецепторов. Природное разнообразие этих соединений огромно, тогда как охарактеризована лишь незначительная его часть. Во-вторых, токсины паукообразных уже давно зарекомендовали себя как уникальные молекулярные инструменты для исследования структуры и функции потенциал-чувствительных натриевых, калиевых, кальциевых каналов, глутаматных рецепторов, P2X-рецепторов, ASIC- и TRP-каналов. В-третьих, в последние десятилетия всё более отчётливо проявляется практический потенциал этих соединений: на их основе разрабатываются анальгетики, противокашлевые средства, иммуносупрессоры, биоинсектициды и диагностические агенты. В-четвёртых, работа затрагивает фундаментальные вопросы эволюции, биосинтеза и модульной организации токсинов, что важно для понимания молекулярных механизмов адаптации

ядовитых животных. Таким образом, тема диссертации является актуальной как в фундаментальном, так и в прикладном отношении.

2. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

Диссертация содержит значительный объём новых данных. К наиболее важным результатам следует отнести:

1. Создание базы данных Kalium – первой специализированной базы полипептидных лигандов K^+-каналов, которая стала востребованным и удобным инструментом для исследователей.
2. Комплексное изучение состава яда шести видов пауков и двух видов скорпионов с использованием протеомных, пептидомных и транскриптомных подходов.
3. Открытие и характеристика новых токсинов, включая:
    - блокаторы $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$;
    - токсин Hm-3, действующий на потенциал-чувствительный домен I $Na_v1.4$ и способный ингибировать «ω-токи»;
    - β/δ-агатоксины, одновременно влияющие на активацию и инактивацию Na_v;
    - пуротоксины – первые селективные пептидные ингибиторы P2X3-рецепторов;
    - модульные токсины пауков со всеми возможными комбинациями ICK- и AMP-доменов.
4. Разработку подходов к рациональному дизайну лигандов на основе α-гарпининов, что позволило получить искусственные блокаторы $K_v1.3$ и $K_v1.6$.
5. Получение слитных конструктов FP-Tx на основе флуоресцентных белков и нейротоксинов для визуализации ионных каналов.
6. Создание светоуправляемых блокаторов Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов на основе ацилполиаминов.
7. Определение структур комплексов GluR с поровыми блокаторами методом крио-ЭМ.

Теоретическая значимость работы состоит в расширении представлений о молекулярной эволюции токсинов, их модульной организации, механизмах действия и структурно-функциональных отношениях. Практическая значимость определяется возможностью использования полученных соединений для разработки лекарственных средств, биоинсектицидов и диагностических

реагентов. Особенно перспективными выглядят пуротоксины как основа для создания анальгетиков и противокашлевых препаратов, а также искусственные блокаторы K_v-каналов.

3. Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов не вызывает сомнений. Работа выполнена на современном методическом уровне с использованием широкого арсенала методов: химического синтеза, транскриптомики, протеомики, пептидомики, хроматографии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, крио-ЭМ, электрофизиологии, радиолигандного анализа, микроскопии, молекулярного моделирования и животных моделей. Статистическая обработка данных проведена корректно, с использованием адекватных критериев. Результаты воспроизводимы и подтверждены независимыми исследованиями.

По теме диссертации опубликовано 80 работ, включая 77 статей в рецензируемых журналах и 5 патентных заявок. Результаты многократно докладывались на российских и международных конференциях. Многие данные прошли независимую верификацию и цитируются другими исследователями.

4. Общая характеристика, структура и оформление диссертации

Материалы диссертации изложены на 581 странице машинописного текста. Работа построена по классической схеме и включает введение, основную часть (обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключение, выводы, список сокращений, сведения об апробации работы, благодарности и список литературы. Работа содержит 129 информативных рисунков, 70 таблиц и обширный список литературы из 1258 источников.

Обзор литературы отличается исчерпывающей полнотой, демонстрирует глубокое понимание автором современного состояния проблемы и состоит из 20 крупных разделов, охватывающих все основные группы токсинов паукообразных, их мишени и механизмы действия. Раздел «Материалы и методы» достаточно подробно описывает использованные подходы — от хроматографии и масс-спектрометрии до электрофизиологии, ЯМР и крио-ЭМ. Все использованные методы адекватны поставленным задачам и детально описаны, что обеспечивает возможность воспроизведения результатов. Результаты структурированы по молекулярным мишеням и типам токсинов, что облегчает восприятие большого экспериментального материала.

Отдельно следует отметить практически полное отсутствие опечаток в тексте диссертации (всего 4 ошибки на 581 страницу и несколько пунктуационных неточностей), а также высокое качество иллюстративного материала.

5. Рекомендации по использованию результатов и выводов исследования

Полученные в диссертации результаты и сформулированные выводы могут быть использованы в нескольких направлениях – от фундаментальной науки до прикладных разработок.

1. В фундаментальных исследованиях ионных каналов и нейрорецепторов.

Охарактеризованные токсины (селективные блокаторы Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6, модуляторы Na_v, ингибиторы P2X3, лиганды GluR и др.) целесообразно применять как молекулярные инструменты для изучения структуры, функции, субъединичного состава и физиологической роли соответствующих каналов и рецепторов. Базу данных Kalium следует поддерживать и развивать как общедоступный ресурс для исследователей, занимающихся лигандами K^+-каналов.

2. В разработке лекарственных средств.

Наиболее перспективны пуротоксины PT1 и PT6 как основа для создания анальгетиков и противокашлевых препаратов, блокаторы Kv1.3 – для терапии аутоиммунных заболеваний, блокаторы Kv1.1/1.2/1.6 – для лечения эпилепсии и атаксии, токсин Hm-3 – для коррекции «ω-токов» при гипокалиемическом периодическом параличе, ω-Lsp-IA – для терапии мигрени и эпилепсии, а светоуправляемый блокатор ABSP-6 – как инструмент оптофармакологии. Для этих соединений целесообразно продолжить доклинические и клинические испытания, а также оптимизацию селективности и фармакокинетики.

3. В сельском хозяйстве и биотехнологии.

β/δ-Агатоксины, цитоинсектотоксины и другие инсектотоксины могут стать основой для новых биоинсектицидов, в том числе при создании трансгенных энтомопатогенных грибов и растений. Антимикробные пептиды и генные конструкции на их основе перспективны для борьбы с внутриклеточными паразитами (хламидии, микоплазмы) в лабораторной практике.

4. В биотехнологии и диагностике.

Слитные конструкты FP-Tx (например, eGFP-OSK1, RFP-AgTx-2, eGFP-α-CbTx) могут использоваться для визуализации ионных каналов и nAChR в клетках и тканях, для скрининга новых лигандов и в диагностических системах. Химерные каналы KcsA-K_v и сферопласты *E. coli* применимы как удобные тест-системы для поиска блокаторов K^+-каналов.

5. В методологии и образовании.

Разработанные и адаптированные методические подходы (белковая топография, молекулярная динамика, крио-ЭМ, HCS-микроскопия, радио- и флуоресцентные методы) могут быть внедрены в практику других лабораторий. Материалы диссертации целесообразно использовать в учебных курсах по биоорганической химии, токсинологии, мембранологии и нейробиологии.

6. Вопросы и замечания по диссертации

При общей высокой оценке работы можно сделать несколько замечаний:

1. В параграфе 1.10.1 на стр. 92 в конце 3 абзаца неполное предложение. Не удалось избежать профессионального сленга (например, использование слов «фарма», «движок»).
2. Глава 1.5 стр. 51 (первое предложение последнего абзаца) и параграф 1.9.2 стр. 79 (последнее предложение первого абзаца) – среди отрицательно заряженных групп фосфолипидов следовало бы упомянуть не только фосфорную кислоту.
3. Некоторые таблицы лучше бы читались в альбомном форматировании.
4. Одновременное использование сразу двух величин IC_{50} и EC_{50} для сравнения активности различных лигандов не всегда видится оправданным. Удобнее сравнивать только один параметр.
5. Было бы полезно представить информацию о статистической значимости различия эффектов между 0.5 и 2.5 нмоль пуротоксина на рисунке 98 и между PT6 и PT1 на рисунке 99.
6. Таблица 50 и другие, демонстрирующие результаты оценки антимикробной активности токсинов. Было бы полезно для сравнения представить данные, полученные при использовании известных антибиотиков. Это позволило бы сделать вывод о перспективах терапевтического использования токсинов в качестве антимикробных агентов.
7. Несмотря на активное обсуждение автором результатов ЯМР спектроскопии и криоЭМ, первичных данных, полученных этими методами, в диссертации практически не представлено.

При чтении работы возник ряд вопросов к диссертанту:

1. Вывод о современных подходах к разработке противоядий в конце параграфа 1.2.1. Может ли поиск блокаторов пор, формируемых токсинами, служить эффективным подходом?
2. Могут ли низкомолекулярные непептидные компоненты яда быть модификаторами физических свойств липидного матрикса мембран, в

которые реконструированы таргетные для этих токсинов каналы? Какова вероятность их взаимодействия с липидными мембранами, которую можно было бы оценить по коэффициенту распределения октанол-вода?

3. Как автор диссертации объясняет отсутствие доменной организации у бислоя из смеси ДОФХ и сфингомиелина до добавки Ltc2a, и не могут ли наблюдаемые после введения токсина изменения относится не к формируемым им дефектам, а к индукции фазового разделения, особенно с учетом того, что толщина бислоя в области «дефекта» равна 4 нм (соответствует толщине бислоя из ДОФХ), а вокруг дефекта – 8 мкм, что превышает толщину мембран как из ДОФХ, так и сфингомиелина в 2 раза. Несмотря на то, что этот вопрос касается возможной интерпретации конкретных литературных данных, он связан с более общим: может ли влияние токсина на фазовую сегрегацию в мембране (липидные домены – рафты) быть еще одним механизмом его действия, в частности, за счет регуляции функции ионных каналов при изменении «гидрофобного несоответствия»?
4. Может ли мембранное окружение способствовать восстановлению тиольных групп в полипептидных цепях токсинов? Нет ли необходимости учитывать этот фактор для токсинов, взаимодействующих с сайтами связывания, обращенными к липидам?
5. Как автору удалось получить гигантские одноламеллярные липосомы при обработке гидратированных липидных пленок ультразвуком с последующей экструзией? Обычно для получения гигантских везикул используют электроформацию. Какие данные подтверждают успешность предложенного автором подхода – получение липосом с диаметром более 1 мкм?
6. Для корректного применения парного t-критерия при малых выборках ($n°<°50$) требуется, чтобы разности были распределены нормально или близко к нормальному. Как проверяли гипотезу о нормальности распределения?
7. Моделирование комплексов α-КТх с K_v (3.6.1.1). Зачем ПОФЭ включен в состав мембраны? Насколько исключение этого липида повлияло бы на результат?
8. По токсину Hm-3. Как возможность взаимодействия с мембраной, продемонстрированная автором в экспериментах с липидными везикулами, связана с влиянием на Na_v (ингибированием как α-, так и ω-токов)? Может ли это обстоятельство иметь значение для селективности действия токсина, в частности, отличается ли липидное микроокружение различных изоформ Na_v? Насколько ингибирование α-токов ограничивает терапевтический

потенциал Hm-3 при гипокалиемическом периодическом параличе? Возможно ли получить производные, селективные именно к ω-токам? Какой способ введения пептидного препарата предусматривает автор?

9. По пуротоксинам. Хотелось бы услышать предположения автора относительно природной мишени пуротоксинов у насекомых? Есть ли данные о наличии P2X-подобных рецепторов у членистоногих? Чем можно объяснить отсутствие дисгевзии у PT6?
10. По слитным конструктам FP-Tx. Почему химеры eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2 утратили активность на Kv1.2? Т.е. присоединение FP повлияло на селективность в отношении каналов, может ли изменение коэффициента распределения мембрана-раствор при связывании с водорастворимым белком частично объяснять этот эффект? Или это связано со стерическими ограничениями или с изменением конформации токсина? Как можно оптимизировать такие конструкции?
11. По мембраноактивным токсинам (3.11.1) – зачем автор использовал именно гигантские липосомы, и почему для сравнения с нейтральным ДОФХ была выбрана смесь ДОФГ с ДОФЭ (липидом, склонным к формированию инвертированных гексагональных фаз)? Следует обратить внимание на то, что изменение трансмембранного распределения латерального давления за счет варьирования параметра упаковки липидов может оказывать значимое влияние на мембранную активность АМП. Сама по себе демонстрация возможности связывания с мембранами не указывает на причины гибели бактериальных клеток или гемолиза эритроцитов. Каковы молекулярные механизмы мембранной активности?
12. По антимикоплазменной и антихламидийной активности. Насколько результаты, полученные *in vitro*, могут быть транслированы *in vivo*? Какова будет стоимость таких препаратов? Не токсичны ли предложенные генные конструкции для клеток-хозяев? Есть ли основания предполагать высокую селективность действия мембраноактиных токсинов в отношении мембран клеток внутриклеточного паразита и внутриклеточных мембран/ плазмалеммы хозяина? Можно ли выделить какие-либо детерминанты, помимо анионных липидов, присутствие которых не является исключительным для микоплазм и хламидий и характерно также для внутреннего листка плазмалеммы, поздних эндосом и лизосом, а также митохондрий.
13. В чем заключается механизм синергии между модулями CIT 1a? Как это «работает»?

Указанные замечания и вопросы не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки диссертации, а их количество лишь отражает высокий интерес, с которым читается диссертация.

7. Заключение

Диссертационная работа Василевского Александра Александровича «Токсины паукообразных: многообразие, фундаментальные и прикладные аспекты» является оригинальным научным исследованием и по своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 со всеми изменениями Постановлений Правительства РФ, а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре отдела молекулярной физиологии клетки ИНЦ РАН (протокол № 1 от «19» октября 2026 г.)

Составитель отзыва:
Остроумова Ольга Сергеевна, д.б.н., доцент, главный научный сотрудник с возложением обязанностей заведующей лабораторией моделирования мембран и ионных каналов, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

Почтовый адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-кт, д. 4
Телефон: 8 (911) 945-69-53
E-mail: ostroumova@incras.ru

Подпись О.С. Остроумовой удостоверяю
Ученый секретарь ИНЦ РАН, к.б.н. _____ / М.А. Бердиева /