

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Бережного Алексея Валерьевича
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 темы диссертационного исследования

Поиск новых эффективных и безопасных анальгетиков остается одной из приоритетных задач современной биоорганической химии и фармакологии. Отдельный интерес представляют молекулы, модулирующие активность ионных каналов сенсорных нейронов – TRPV1, TRPA1 и ASIC3, которые играют ключевую роль в формировании болевых сигналов и нейрогенном воспалении. Модуляторы активности этих каналов представляют интерес как с точки зрения функционирования ноцицептивных систем, так и могут оказывать значительный анальгетический и противовоспалительный эффект. Для поиска таких соединений, диссертант обоснованно обращается к природным источникам (яды морских анемонов, экстракты растений), поскольку именно в них эволюционно закреплены высокоактивные и селективные лиганды для множества типов ионных каналов и рецепторов. Таким образом, тема работы является актуальной как для фундаментальной науки (понимание механизмов ноцицепции), так и для практического здравоохранения (создание новых анальгетиков).

Научная новизна и основные положения, выносимые на защиту

Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы четко, логично. Они не вызывают сомнений и подкреплены экспериментальными

данными. Впервые обнаружены и охарактеризованы пептидные ингибиторы TRPV1 из морской анемоны *Heteractis crispa* (АРНС1–3), эффект которых зависит от типа и интенсивности активирующего стимула – крайне нетривиальное свойство для известных модуляторов этого канала. Также найдены первые пептидные положительные модуляторы TRPA1 (Ms 9a-1, Ueq 12-1), проявляющие противовоспалительную и анальгетическую активность за счет десенситизации нейронов. Идентифицированы новые лиганды ASIC3, включая пептиды с уникальным типом пространственной укладки (Ugr 9-1) и низкомолекулярные соединения (севанол, линдолдхамин, тетрагидропапаверолин, ретикулин). Впервые показана возможность ингибирования природными соединениями обеих компонент тока ASIC3 канала. Полученные в ходе работы пептид АРНС3 и севанол успешно прошли доклинические испытания, что подтверждает высокий прикладной потенциал работы.

Степень достоверности и обоснованности результатов

Исследования выполнены на высоком уровне с использованием современных и актуальных методов биоорганической химии (ВЭЖХ, масс-спектрометрия, ЯМР, электрофизиология на ооцитах *Xenopus laevis* и эукариотических клетках методы поведенческого анализа на животных). Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все эксперименты проведены с достаточным количеством независимых экспериментов. Анализ данных проводился при помощи соответствующих выборке статистических критериев. Данные были представлены на ведущих отечественных и международных конференциях и опубликованы в 46 статьях в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science / Scopus и рекомендованных ВАК.

Характеристика работы

Диссертация построена по классической схеме, изложена на 255 страницах, состоит из следующих разделов: 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.

В разделе «Введение» обоснована актуальность исследования и научная новизна, представлены цели и задачи работы и определены основные положения, выносимые на защиту. Приведены сведения о теоретической и практической значимости полученных результатов и апробации результатов исследования.

В разделе «Обзор литературы» отражены основные аспекты изучения TRPV1, TRPA1 и ASIC3 каналов. Литературный обзор подготовлен с использованием значительного числа публикаций, что обеспечивает хорошее представление о состоянии данного научного направления в настоящее время.

В главе «Материалы и методы» представлены реактивы, используемые при выполнении работы, подробно описаны методики, которые охватывают множество экспериментальных задач: от выделения природных соединений и клонирования генов до тестирования полученных веществ на животных моделях.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из 3 больших разделов посвященных выделению и характеристике модуляторов TRPV1, TRPA1 и ASIC3 каналов, соответственно. Исследование каждого модулятора проводили по следующей схеме: скрининг биологических образцов на наличие активных компонентов, выделение и структурная характеристика активных компонентов, получение рекомбинантных аналогов для полипептидных компонентов, полноценная характеристика полученных соединений на соответствующих каналах *in vitro* и анализ биологической активности на животных. В результате в разной степени были охарактеризованы 16 новых лигандов для каналов TRPV1, TRPA1 и ASIC3.

В разделах «Заключение» и «Выводы» отражены ключевые моменты проведенного исследования.

Практическая значимость

Результаты работы имеют высокую практическую ценность:

– Пептид АРНСЗ и севанол, обнаруженные в ходе этого исследования, прошли доклинические испытания, что создает предпосылки для их дальнейшего продвижения в клиническую практику;

– Полученные модуляторы TRPA1 открывают новый фармакологический подход – использование положительных модуляторов для достижения анальгетического эффекта;

– Новые природные лиганды пополняют арсенал инструментов для изучения структуры и функции TRPV1, ASIC3 и TRPA1 каналов.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Приведенные ниже комментарии не носят принципиального характера и не влияют на высокую оценку проделанной работы. Тем не менее, по ее сути и оформлению хотелось бы высказать ряд вопросов и замечаний.

Обзор литературы.

1. В Обзоре литературы, на мой взгляд, недостаточно аргументирован выбор именно этих рецепторов. Этому посвящен лишь один абзац во Введении. Автору следовало расширить Обзор литературы, чтобы дать читателю информацию о современных представлениях в общем о механизмах ноцицепции с логическим выводом о ключевой роли исследуемых в работе трех рецепторов.

2. По составу экстрактов из животных и растений, их применению в медицине и имеющихся методах терапии боли в рамках рассматриваемой проблематики информации мало, в основном в конце литературного обзора, и в отношении рецептора ASIC.

3. В обзоре рецептора TRPV1 разделы, описывающие агонисты и антагонисты, почему-то включены в раздел Функции, а для двух других описываемых в главе рецепторов имеют собственные ссылки в оглавлении. Это сделано намеренно или является ошибочным присвоением уровня заголовка?

Результаты.

4. Стр. 94. «В результате было проанализировано 10 ядов паукообразных и 6 ядов или экстрактов морских беспозвоночных». До этого про исследования ядов в данной работе не говорилось и в Материалах и методах про это тоже нет информации. О чем идет речь?

6. В некоторых случаях не указано, какие пептиды, нативные или рекомбинантные были использованы в эксперименте. Например, в случае данных, представленных на рис. 22 это понятно лишь из самого рисунка, а в случае данных на рис. 23 приходится обращаться к тексту публикации (ссылка [417]).

7. Вывод на стр. 101 сформулирован неудачно. «Таким образом, влияние АРНС3 на реакцию, активируемую комбинациями различных стимулов, не аддитивно». Данные об участии исследуемого пептида при сочетании разных способов активации TRPV1-канала можно было представить в виде таблицы для наглядности. Однако необходимость к проведению этой серии экспериментов не очевидна.

8. Данные, представленные на рис. 26. Написано: «Чтобы выявить вероятность независимого взаимодействия пептидов АРНС1–3с различными сайтами на канале». А результаты представлены только для АРНС3. Имеется в виду наличие нескольких сайтов связывания для любого из трех пептидов? В этом случае можно было провести эксперименты по определению зависимости доза-эффект и по коэффициенту Хилла определить наличие кооперативности. В общем, сформулировано неудачно.

9. П. 4.1.9., эксперименты на животных. Нет пояснения по способу выбора концентраций пептидов.

Например: рис. 32, сравнение с действием AMG9810 оказывает гипертермический эффект при дозе 30 мг/кг, AMG9810 весит 337 а.е.м. IC50 для разных вариантов рецептора от 24 до примерно 300 нМ, APHC1 весит ок. 6200. По экспериментам на клетках насыщение ответа при 500 нМ (рис. 22). Разница в концентрациях порядка 2000 раз, а константа у пептида больше в 2-20 раз, чем у AMG9810. Почему были выбраны такие дозы пептида?

10. В п. 4.1.2 автор указывает «...получение достаточного количества природных пептидов для их полноценного изучения затруднено, был разработан метод получения рекомбинантных вариантов APHC1–3». Однако нет оценок, сколько пептида получено из имевшихся образцов, сколько необходимо, чтобы провести эксперименты на клетках, животных и т.д. Есть лишь сведения о том, сколько выходит пептида из 1 литра культуры *E. coli*. Какое кол-во имеется и какое «достаточное»? Насколько это вообще затратно? То же для п. 4.2.2.

11. Таблица 1. Сложно понять, где собственные данные, а где литературные.

12. Рис. 22. Для полноты картины было бы нелишним представить данные о двух последовательных добавках капсаицина без пептида, чтобы исключить возможную десенситизацию ответов на капсаицин. Хотя эксперимент с предварительной добавкой APHC1 перед капсаицином частично снимает этот вопрос. Также эта проблема учтена автором в электрофизиологических экспериментах на клетках СНО и в работе с другими рецепторами. В имеющейся формулировке не понятно, был ли добавлен пептид перед самой первой добавкой капсаицина.

13. Раздел 4.1.12. не содержит ссылок на собственные публикации или данные литературы. Совершенно не ясно, каким методом, на каких объектах и кем получены данные. Из каких соображений было выдвинуто

предположение, что соединения, полученные из губки, должны быть активны в отношении TRPV1?

14. Эксперименты, результаты которых представлены на рис. 49, выполнены на культивируемых нейронах ганглиев задних корешков спинного мозга крысы. Однако методика подготовки образцов не описана ни в разделе Материалы и методы, ни в соответствующем разделе результатов. Чтобы узнать подробности методики культивирования приходится обращаться к статье по ссылке 458 (статья автора в JBC) и далее по ссылке 58 в публикации.

15. В работе представлены результаты гистологического анализа. Однако подробно методика приготовления образцов не описана, изображения гистологических препаратов в рукописи не представлены.

16. В рамках логики данной работы было бы уместно обсуждения к конкретной главе представлять под собственным заголовком. В разделе Результаты и обсуждение, собственно обсуждения не очень удачно отделены от результатов. Автор не использует «мы показали», «в наших экспериментах». Когда описание результатов перетекает в обсуждения часто не понятно, какие данные получены в рамках данного диссертационного исследования, а какие – литературные.

17. Автором получен колоссальный объём экспериментальных данных. Выдвинуты и проверены интересные гипотезы, сделаны глубокие выводы. Все эти результаты в целом укладываются в общую концепцию. Однако в диссертации отсутствует обобщающая схема, приставляющая действие открытых лигандов на нейрональные каналы, связанные с ноцицепцией, и показывающая мишени природных модуляторов активности каналов и их влияние на внутриклеточные сигнальные каскады. Такая схема могла бы в целом сделать результаты работы более наглядными.

Общие замечания по оформлению.

18. Очень много опечаток, орфографических и пунктуационных ошибок. Это в целом затрудняет восприятие текста. Некоторые разделы главы Материалы и методы приходилось перечитывать, стараясь не акцентировать внимание на опечатках. В автореферате проблема выражена в меньшей степени.

19. Присутствуют неудачные фразы, затрудняющие понимание текста, например:

- «В экспериментах с патч-клампом» на стр. 99;
- в том же предложении «gun-dawn» вместо «rundown»;
- стр. 149 первый абзац «...действиве ... может быть основано на при активации TRPA1»;
- стр. 208: «...проявляет значительную противовоспалительную и анальгетическую активность, которая сопровождается небольшим снижением температуры тела» – фраза допускает двоякое толкование: является ли снижение температуры нежелательным эффектом или частью механизма?

20. На некоторых рисунках не переведены на русский единицы измерения. Например, на рис. 22, перевод на русский выполнен частично, в легенде сокращения не отражены.

Несколько рисунков не самого лучшего качества. Например, Рисунки 28, 44, 51, 52. Можно рекомендовать автору в будущем использовать векторную графику или использовать более высокое разрешение растровых изображений.

21. На протяжении всего текста присутствует небрежность оформления. Например:

- в списке сокращений аббревиатура DkTx – яд паука, который встречается лишь дважды в обзоре и там же и указано, что это токсин этого паука. То есть не было необходимости выносить это в список сокращений. С

другой стороны, монойодацетат – MIA – многократно употребляемая в рукописи аббревиатура, которая не вынесена в список сокращений;

– раздел 4.1.11.1, стр. 118 и рис. 34. Не указана единица измерения дозировок, хотя из дальнейшего описания понятно, что это мг/кг;

– п. 4.1.9.5. Модель висцеральной боли. Описание подхода отсутствует в разделе методов, но достаточно подробно методика описана в указанном разделе результатов

– стр. 117, рис. 33 с описанием протокола эксперимента и подобные ему из других глав более уместно поместить в раздел Материалы и методы.

– имеются ненужные повторы. Так особенности повреждений, вызываемых в модели с введением монойодацетата описаны на стр. 120 и другими словами – на стр. 163-164.

Следует еще раз подчеркнуть, что высказанные выше замечания не снижают несомненных достоинств работы, представленной к защите.

Заключение

Диссертационная работа Андреева Ярослава Алексеевича является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития биоорганической химии – поиск и характеристика новых природных модуляторов ионных каналов сенсорных нейронов с анальгетической и противовоспалительной активностью. Представленный автореферат отражает основное содержание диссертации.

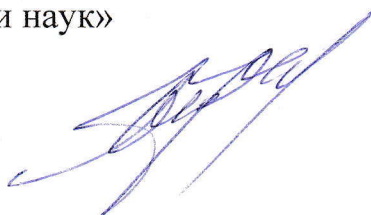
По своей актуальности, научной новизне, объему экспериментального материала, достоверности выводов и практической значимости диссертация Андреева Ярослава Алексеевича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук, согласно пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с актуальными

изменениями и дополнениями), а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
клеточных механизмов нейропатологий Института
биофизики клетки Российской академии наук –
обособленного подразделения Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»

Бережнов Алексей Валерьевич



08.06.2026

Контактные данные:

тел.: +7(496)7739125, e-mail: g_56@rambler.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.2. – биофизика, 1.5.22. – клеточная биология

Адрес места работы:

142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3,

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»



Подпись *Бережнова А В*
Удостоверяю *вед спец по*
кадрам Малыхова С С