О Т З Ы В

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

Яды паукообразных представляют собой сложные многокомпонентные смеси, включающие пептиды, белки, ферменты, низкомолекулярные соединения и другие биологически активные вещества. Состав ядов формировался в процессе длительной эволюции и обеспечивает высокую эффективность воздействия на нервную, мышечную, иммунную и другие физиологические системы жертвы. Именно сочетание структурного разнообразия, выраженной биологической активности и высокой молекулярной селективности делает яды паукообразных важным объектом фундаментальных и прикладных исследований. Многие компоненты ядов избирательно взаимодействуют с ионными каналами, рецепторами и/или ферментами, что позволяет использовать их как молекулярные инструменты для изучения механизмов клеточной сигнализации и функционирования нервной системы.

Современная токсинология рассматривает яд не только как фактор поражения организма, но и как природную библиотеку молекул с потенциально ценными фармакологическими свойствами. Это междисциплинарное направление объединяет биохимию, молекулярную биологию, биоорганическую химию, физиологию, фармакологию, структурную биологию, геномику, протеомику и биоинформатику. Применение методов транскриптомики, масс-спектрометрии, рекомбинантной экспрессии, структурных методов анализа и молекулярного моделирования позволяет выявлять новые токсины, определять их пространственную структуру и устанавливать молекулярные мишени. Особое значение приобретает комплексный анализ генов и пептидных компонентов яда, который существенно ускоряет поиск перспективных молекул и способствует переходу от описания токсичности к рациональному конструированию лекарственных препаратов.

Практическая значимость токсинов паукообразных связана прежде всего с разработкой лекарственных средств и биотехнологических продуктов. Пептиды, воздействующие на потенциалзависимые натриевые, калиевые и кальциевые каналы, рассматриваются как основы новых анальгетиков, противоэпилептических и нейропротекторных препаратов. Некоторые соединения рассматриваются в качестве кандидатов для лечения хронической боли и воспалительных заболеваний. Другим перспективным направлением является поиск противоопухолевых, противомикробных и противопаразитарных молекул. Кроме того, благодаря способности некоторых токсинов селективно распознавать клеточные рецепторы или мембранные компоненты они могут применяться для направленной доставки лекарственных веществ, визуализации

опухолевых клеток и создания диагностических тест-систем. Кроме того, токсичные пептиды паукообразных изучаются как природные биоинсектициды, способные избирательно поражать насекомых-вредителей и потенциально снижать нагрузку на окружающую среду по сравнению с традиционными химическими инсектицидами.

Таким образом, токсины паукообразных следует рассматривать как сложный биологический объект: с одной стороны, при попадании в организм яд паукообразных может представлять серьезную угрозу, что требует понимания механизмов действия компонентов яда и разработки соответствующих антидотов, а с другой стороны, при изолированном и контролируемом воздействии отдельные токсины могут стать ценными инструментами для медицины и сельского хозяйства.

В связи с этим, объемная работа А.А. Василевского, посвященная исследованию молекулярного состава яда ряда паукообразных и молекулярных механизмов действия токсинов, входящих в эти яды, а также поиску и характеристике компонентов яда, имеющих потенциал практического применения, является современной и актуальной. В ходе выполнения работы Александр Александрович выполнил систематическое исследование, направленное на всестороннюю характеризацию яда шести видов пауков (*Alopecosa marikovskyi, Agelena orientalis, Cheiracanthium punctorium, Heriaeus melloteei, Lachesana tarabaevi, Oxyopes takobius*) и двух видов скорпионов (*Mesobuthus eupeus, Orthochirus scrobiculosus*), включая анализ пептидного состава яда; исследование транскриптома ядовитых желез; идентификацию и выделение индивидуальных токсинов из цельных ядов; установление первичной структуры веществ, воздействующих на потенциал-чувствительные и лиганд-активируемые ионные каналы; функциональную характеристику новых веществ; изучение нуклеотидной последовательности генов и аминокислотной последовательности предшественников токсинов; разработку системы гетерологичной экспрессии генов новых пептидных токсинов и оценку прикладного потенциала новых соединений с точки зрения создания новых молекулярных инструментов и разработки лекарственных препаратов.

На пути достижения основной цели диссертации соискателем использованы современные методы биоорганической химии, биохимии и молекулярной биологии. В данной работе установлена аминокислотная последовательность нескольких сотен не изученных ранее токсинов паукообразных и осуществлена характеристика биологической активности нескольких десятков не изученных ранее токсинов. Для этого было получено несколько десятков рекомбинантных токсинов и их аналогов, охарактеризована их биологическая активность, в том числе на молекулярных мишенях. В ходе исследований диссертантом открыто семейство защитных пептидов растений α-гарпининов, проявляющих структурное сходство с токсинами скорпионов и получены селективные блокаторы всех чувствительных к токсинам изоформ K^+ каналов подсемейства Kv1. Впервые показано, что природные токсины способны ингибировать так называемые «ω-токи» в мутантных Na^+ каналах. Впервые получен лиганд потенциал-чувствительного

домена I повтора Na^+ каналов. Охарактеризована новая группа селективных модуляторов Na^+ каналов насекомых с уникальными фармакологическими свойствами, что ставит под сомнение существующую классификацию лигандов Na^+ каналов в зависимости от сайтов связывания. Показано, что токсины скорпионов способны активировать внутриклеточные сигнальные каскады нейронов, воздействуя на Na^+ каналы. Получен уникальный «мягкий» ингибитор Ca^{2+} каналов P-типа, замедляющий их активацию. Открыты пуротоксины - первые в мире природные селективные ингибиторы P2X3 рецепторов, которые показывают высокую анальгетическую активность в животных моделях. Охарактеризовано разнообразие мембрано-активных токсинов из яда пауков, значительно превосходящее известные данные. Открыты модульные (двудоменные) токсины паукообразных с различными комбинациями дисульфид-богатых и/или линейных модулей. Изучена пространственная структура девяти токсинов паукообразных, в том числе в условиях моделирования мембранного окружения, трех защитных пептидов растений и двух искусственных пептидов на их основе. Впервые изучена пространственная организация комплекса GluR с поровым блокатором - токсином паука. Впервые получены генетически кодируемые флуоресцентные лиганды потенциал-чувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов с различной селективностью и спектральными характеристиками. Впервые получены светоуправляемые поровые блокаторы GluR AMPA-типа.

В ходе работы создана база данных Kalium, которая содержит информацию обо всех известных полипептидных лигандах K^+ каналов. Селективные блокаторы различных изоформ K^+ каналов были получены путем (а) поиска и выделения из природного источника, (б) рационального изменения селективности токсинов с использованием молекулярного моделирования и сайт-направленного мутагенеза, (в) с помощью скаффолд-инженерии на основе неактивного шаблона. Показано модульное строение α-токсинов скорпионов, ингибирующих инактивацию Na^+ каналов, обнаружены особые структурные мотивы, определяющие укладку их «модуля специфичности». Предложены способы предсказания и изменения селективности α-токсинов.

Актуальность и высокая научная и практическая значимость полученных результатов подтверждается исчерпывающим списком публикаций в тематических журналах, включая такие высокорейтинговые журналы как Neuron, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Molecular Therapy и др., а также рядом патентов.

Диссертационная работа А.А. Василевского построена по традиционному принципу, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 581 странице, содержит 129 рисунков и 70 таблиц. Библиография включает 1258 литературных источников.

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы.

Обзор данных литературы исчерпывающе описывает область исследований от номенклатуры и встречаемости в природе, составе ядов, структуры действующих веществ, биосинтеза и эволюции до детального описания функциональных свойств отдельных токсинов в привязке к целевым мишеням данных соединений, а именно K^+, Na^+ и Ca^{2+} каналам, а также болевым рецепторам. В конце обзора литературы соискатель описывает известные данные о возможностях практического использования токсинов как для исследовательских целей, так и для применения в сельском хозяйстве и медицине. Следует отметить, что обзор написан хорошим литературным языком и содержит всю необходимую информацию для восприятия результатов данной диссертационной работы. Кроме того, следует отметить, что стиль изложения информации, который выбрал соискатель, легко воспринимается как с точки зрения языка, так и с точки зрения логически связанного поэтапного погружения в современный уровень понимания фундаментальных и прикладных аспектов действия токсинов и актуальных направлений развития токсинологии.

В экспериментальной части, изложенной на 58 страницах, подробно описаны многочисленные методики, использованные диссертантом в его работе. Все работы, выполненные в сотрудничестве, обозначены соответствующими упоминаниями. В целом, данный раздел свидетельствует о высокой квалификации и прекрасной методической подготовке А.А. Василевского.

Глава «Результаты и их обсуждение» представляет собой поэтапное структурированное представление итогов работы и содержит 13 блоков, посвященных как обобщенным разделам по полученным результатам в отношении молекулярного состава ядов, изучению структуры и получению рекомбинантных пептидов, так и разделы, детально описывающие результаты, сгруппированные по типу воздействия на K^+, Na^+, Ca^{2+} каналы и P2X рецепторы. Отдельно выделы разделы, описывающие результаты по получению слитных конструктов из нейротоксинов и флуоресцентных белков в качестве инструментов для селективной визуализации определенных ионных каналов; мембрано-активные цитолитические токсины, рассматриваемые в качестве потенциальных антимикробных пептидов, в том числе против внутриклеточных паразитарных бактерий родов *Mycoplasma* и *Chlamydia*; модульные/двудоменные токсины, имеющие особенное строение и ацилполиамины, как инструменты изучения глутаматных рецепторов.

Все описанные результаты являются оригинальными, ярко отражают не только новизну данной работы, но и подчеркивают колоссальный объем проделанной работы. Следует отметить, что результаты работы частично входили в материалы 8 кандидатских диссертаций, защищенных к настоящему моменту. Сформулированные А.А. Василевским выводы работы основаны на результатах многочисленных экспериментов с использованием взаимодополняющих экспериментальных и биоинформатических подходах. В целом достоверность результатов работы и обоснованность выводов не вызывают сомнения.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 80 статьях и главах книг, практическая значимость полученных результатов подтверждается 5 патентами. Результаты работы докладывались на престижных российских и международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации.

Подводя итог, необходимо отметить, что полученные в данной работе результаты, несомненно, являются значительным шагом как в изучении многообразия и структурно-функциональных связей компонентов яда паукообразных, так и имеют большое значение для практического применения изучаемых веществ.

Тем не менее, к работе есть несколько вопросов и замечаний, которые можно разделить на технические, связанные с оформлением материалов диссертации, и экспериментальные.

В целом необходимо отметить, что текст диссертации написан очень хорошим русским языком, а стиль представления информации, в некоторых случаях весьма художественный, делает чтение текса легко воспринимаемым.

- Некоторые «крылатые» выражения из текста диссертации:

«*Короче говоря*, мы имеем дело с биологическим объектом значительной сложности.»

«*Соблазнительно думать*, что ацилполиамины — наиболее изученные низкомолекулярные компоненты яда паукообразных — происходят от эндогенных полиаминов.»

«До получения хотя бы каких-то данных о биосинтезе ацилполиаминов или геноме их продуцентов *это всё лишь фантазии*.»

«С одной стороны, такое предположение кажется очевидным…. С другой стороны, *не всё так просто*.»

«Диссертант писал текст этой работы около 10 лет, *допустив непозволительную в наши дни роскошь*.»

- Анализ спектров кругового дихроизма для определения содержания элементов вторичной структуры (например, Таблицы 62, 67), включает как общепринятые элементы (α-Спираль, β-Структура, β-Изгиб), так и термин «Клубок», который, по-видимому, характеризует совокупность неструктурированных элементов. При этом сумма всех элементов вторичной структуры не всегда составляет 100%, а может варьироваться от 99% до 101%.

- В тексте диссертации приведены методы получения и описаны способы очистки рекомбинантных вариантов пептидных токсинов, в том числе содержащих множественные дисульфидные связи. Однако, способы подтверждения структур, содержащих правильно сформированные дисульфидные связи в полученных препаратах, не описаны в полной мере.

- Совокупный анализ известных токсинов, в том числе исследованных в данной работе, однозначно свидетельствует о комбинаторном типе формирования отдельных групп токсинов. Формирование таких комбинаторных библиотек в случае ацилполиаминов обеспечивается совокупностью действия участников ферментативного каскада синтеза таких соединений, что в конечном итоге может обеспечить некоторое разнообразие получаемых продуктов синтеза. В этой связи возникает вопрос есть ли среди пептидных токсинов молекулы, которые синтезируются не на рибосоме, и таким образом могут включать существенно более разнообразные остатки далеко уходя от ограничения протеиногенных аминокислот.

- Второй вопрос, связанный с этим же аспектом. В тексте диссертации описаны механизмы, приводящие к возникновению разнообразия пептидных генетически кодируемых токсинов. Однако, остается не полностью проясненным вопрос, - обнаруженное на сегодняшний день разнообразие пептидных токсинов «регулируется» лишь спонтанными эволюционными процессами формирования генов, кодирующих токсины, либо существуют примеры систем направленной перестройки данных генов (или их участков), или селективном сайт-направленном мутагенезе «вариативной» части данных генов. То есть существуют ли у паукообразных активные молекулярно-генетические пути, отвечающие за «рождение и смерть» генов новых токсинов? Ответ на этот вопрос могли бы дать данные, если такие существуют, о вариативности токсинов (или кодирующих их генов) в неродственных особях одного и того же вида, или изменениях в течение жизни одной и той же особи, а также при смене поколений. Можно предположить, что изменение состава яда, связанное с повышением эффективности его действия, как в течение жизни особи, так и при смене поколений может выступать механизмом адаптации и эволюционным градиентом развития пауков и скорпионов и поэтому эти вопросы представляют большой интерес, но не раскрыты в полной мере в тексте диссертации.

- Формулировки выводов должны отражать суть полученного результата, а не действие, выполненное для его достижения. В связи с этим ряд выводов, например 1 (проведены детальные исследования), 2 (получено несколько десятков индивидуальных токсинов), 3 (получено несколько десятков рекомбинантных токсинов), таковыми не являются, а относятся к краткому изложению результатов работы.

Необходимо отметить, что все указанные недочеты никоим образом не снижают общего высокого уровня работы, которая является высококлассным научным исследованием. Анализ диссертационной работы А.А. Василевского свидетельствует о том, что, без сомнения, результаты работы служат важнейшим шагом по изучению многообразия, фундаментальных и прикладных аспектов токсинов паукообразных.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости диссертационная работа Василевского Александра

Александровича 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 последующими изменениями Постановлений Правительства РФ, а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент

Кузнецов Никита Александрович, д.х.н., член-корр. РАН, заведующий лабораторией генетических технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

«28» 09 2026 г.

Почтовый адрес: 630090, Новосибирск, пр-кт Ак. Лаврентьева, д. 8

Телефон: 8 (383) 363-51-74

E-mail: nikita.kuznetsov@1bio.ru

Подпись Н.А. Кузнецова удостоверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н. _____ / Е.Б. Логашенко /

м.п.

28 сентября 2026 г.