

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 005.005.01 НА БАЗЕ
ТИХООКЕАНСКОГО ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. Г.Б. ЕЛЯКОВА ДВО РАН ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 09 июня 2021 г. № 7

О присуждении **Калиной Римме Сергеевне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Структура и функциональная активность нейротоксинов и АРЕТх-подобных пептидов актинии *Heteractis crispa*» по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» принята к защите «2» апреля 2021 г., протокол №5 диссертационным советом Д 005.005.01 на базе Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (далее ТИБОХ ДВО РАН; 690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159; приказ № 105/нк от 12.04.2012 г.).

Соискатель Калина Римма Сергеевна, 1992 года рождения, работает младшим научным сотрудником лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины ТИБОХ ДВО РАН.

В 2014 году соискатель окончила Дальневосточный федеральный университет.

В 2018 году соискатель окончила аспирантуру при ТИБОХ ДВО РАН. Диссертация выполнена в лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН.

Научный руководитель – доктор химических наук Монастырская Маргарита Михайловна, ведущий научный сотрудник лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН.

Официальные оппоненты:

Магарламов Тимур Юсифович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН и

Кашеверов Игорь Евгеньевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией лиганд-рецепторных взаимодействий Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, в своем положительном заключении, подписанном Булгаковым Виктором Павловичем, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН, зав. отделом биотехнологии, указал, что диссертационная работа Калиной Р.С. является заметным вкладом в проблемы биоорганической химии, молекулярной биологии и биотехнологии нейротоксинов и свидетельствует о высоком уровне автора, как специалиста в заявляемой области. По содержанию работа соответствует специальности «биоорганическая химия», отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, а ее автор, Калина Римма Сергеевна, достойна присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, все по теме диссертации, из них 6 опубликованы в рецензируемых научных изданиях, в которых вклад автора является определяющим, среди них наиболее значимые работы:

1. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshelev S., Kvetkina A., Kozlov S., Kozlovskaya E., Monastyrnaya M. New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels // Peptides. 2018. V. 104. P. 41–49.

2. Kalina R.S., Peigneur S., Zelepuga E.A., Dmitrenok P.S., Kvetkina A.N., Kim N.Y., Leychenko E.V., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Gladkikh I.N. New insights into the type II toxins from the sea anemone *Heteractis crispa* // Toxins. 2020. V. 12, P. 44.

3. Kalina R.S., Koshelev S.G., Zelepuga E.A., Kim N.Y., Kozlov S.A., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Gladkikh I.N. APETx-Like peptides from the sea anemone *Heteractis crispa*, diverse in their effect on ASIC1a and ASIC3 ion channels // Toxins. 2020. V. 12. P. 266.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Заведующая кафедрой биофизики Сибирского федерального университета, профессор, д.б.н. Кратасюк В.А., и доцент кафедры биофизики Сибирского, федерального университета, к.б.н. Сарангова А.Б., отметили, что научные

результаты работы обоснованы и убедительны, а также отличаются новизной и имеют практическое значение в медицине и фармакологии. К содержанию работы имеется незначительное критическое замечание, которое касается возможности развития иммунной реакции на исследуемые пептиды.

2. Научный сотрудник лаборатории межмолекулярных взаимодействий, к.б.н. Калужский Л.А. отметил, что в работе был успешно решен ряд методически сложных и важных задач, а полученные результаты могут быть использованы в фундаментальных и прикладных областях биомедицины.

3. Старший научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, к.х.н. Осмаков Д.И. высказал несколько критических замечаний. В разделе «Актуальность темы исследования» автор пишет, что токсины пептидной природы могут проникать через клеточную мембрану, что выглядит весьма сомнительно и, как минимум, требует ссылок, подтверждающих данное свойство. Автор называет водно-этанольную фракцию, полученную в результате гидрофобной хроматографии пептидных компонентов, "нейротоксической", но не приводит свидетельств ее нейротоксичности, или уточнений, что за нейротоксический эффект и как он был продемонстрирован? Токсины и пептиды Кунитц-типа указываются как «гидрофобные молекулы», хотя они скорее обладают амфифильными свойствами. По мнению Осмакова, недостаточно относить пептиды к классу APETx-подобных на основании только анализа масс и биологической активности. Автор не уточняет, какому организму принадлежали каналы ASIC3, на которых производилось тестирование биологической активности пептидов. В автореферате указано, что полипептидные цепи в молекуле RTX-VI образуют между собой дисульфидные связи C3-C43 и C5-C33, однако не уточняется, каким образом был установлен именно такой порядок замыкания. Также не указывается видовая принадлежность ASIC1a канала, с которым производился докинг. Обычно более употребим термин «дефензин», а не «диффензин», как написано в тексте. Коэффициент Хилла позволяет оценить кооперативность лиганд-рецепторного взаимодействия, но непосредственно говорить о количестве сайтов связывания некорректно. Тем не менее, Осмаков Д.И. считает, что все научные положения, выносимые на защиту

адекватны, обоснованы и достоверны. Полученные результаты расширяют набор лигандов фармакологически важных натриевых каналов и вносят немаловажный вклад в области веномики и токсинологии.

4. Научный сотрудник лаборатории молекулярной медицины Института цитологии РАН, к.б.н. Голотин В.А. отмечает высокий методологический и экспериментальный уровень работы и полученные значимые и интересные данные. Однако сообщает, что не был указан конечный выход исследуемых пептидов. Предполагается, что он был достаточно невелик, и было бы целесообразно получить рекомбинантные аналоги для полномасштабных биоиспытаний пептидов как потенциальных анальгетических средств.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что они являются компетентными специалистами в данной области исследований, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих российских и международных журналах, посвященных изучению лиганд-рецепторных взаимодействий и морских гидробионтов, продуцирующих тетродотоксин. Выбор ведущей организации основан на том, что в ней проводятся работы по изучению природных биологически активных белков и пептидов, а также белок-белковых взаимодействий.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований из актинии *H. crispa* выделено три новых APETx-подобных пептида и три нейротоксина структурного типа 2. Установлены аминокислотные последовательности выделенных APETx-подобных пептидов и нейротоксинов. Впервые обнаружен нейротоксин актинии RTX-VI состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных двумя дисульфидными мостиками. Обнаружено, что нейротоксины *H. crispa* ингибируют инактивацию потенциалзависимых натриевых каналов центральной нервной системы млекопитающих, $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$, и каналов членистоногих, $BgNa_v1$ и $VdNa_v1$. Показано, что APETx-подобные пептиды Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 являются первыми пептидами, ингибирующими как ASIC1a, так и ASIC3 каналы, а пептид Hcr 1b-4 ингибирует ASIC1a и потенцирует ASIC3 каналы. Установлено, что APETx-подобные пептиды принципиально различаются распределением

молекулярного электростатического потенциала, что определяет различия их модулирующей активности.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, впервые исследован эффект трех нейротоксинов актинии структурного типа 2 на отдельные подтипы потенциалзависимых натриевых каналов млекопитающих и членистоногих. Показано, что механизм действия нейротоксинов состоит в ингибировании инактивации каналов за счет снижения их чувствительности к увеличению мембранного потенциала. Был изучен эффект трех ранее неизвестных APETx-подобных пептидов на токи протончувствительных ASIC1a и ASIC3 каналов, показано, что модулирующие свойства пептидов существенно отличаются от свойств известных токсинов актиний.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что было установлено, что три нейротоксина актинии *H. crispa* существенно увеличивают активность потенциалзависимых натриевых каналов членистоногих, оказывая значительно менее выраженный эффект на токи каналов млекопитающих. Таким образом, был подтвержден потенциал нейротоксинов актиний в качестве новых природных инсектицидов. Были получены первые пептиды; Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3, ингибирующие одновременно два фармакологически значимых подтипа протончувствительных ионных каналов ASIC1a и ASIC3, что делает их перспективными обезболивающими соединениями. Был показан мощный эффект антигипералгезии пептида Hcr 1b-2 *in vivo* в модели кислотоиндуцированной мышечной боли.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа была выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии, электрофизиологии и биохимии, определение активности исследуемых пептидов проводилось в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Методы полностью соответствуют поставленным задачам. Результаты были получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и статистически обработаны. Все это обеспечило высокую степень надежности и достоверности полученных результатов. Выдвигаемые на защиту положения обоснованы и соответствуют сформулированным целям и задачам.

Личный вклад соискателя состоит в проведении анализа компонентов водно-этанольной фракции актинии *H. crista*, разделении и очистке исследуемых пептидов, дериватизации пептидов для определения их аминокислотных последовательностей, интерпретации тандемных масс-спектров, получении и анализе гомологичных моделей 3D-структур пептидов. Соискатель активно участвовала в анализе данных КД спектроскопии и электрофизиологических экспериментов, а также в подготовке и написании научных публикаций.

Диссертационный совет пришел к выводу, что диссертационная работа Калиной Р.С. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, результаты которой имеют теоретическую и практическую значимость для таких областей исследования как токсикология, веномика и биоорганическая химия. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Калиной Риммы Сергеевны соответствует всем требованиям (в т.ч. п. 9-14), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842.

На заседании 9 июня 2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Калиной Р.С. ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 докторов наук, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 18, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель диссертационного совета
Стоник Валентин Аронович

Ученый секретарь диссертационного совета
Чингизова Екатерина Александровна

9 июня 2021 г.

