

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. № 8

О присуждении **Кветкиной Александре Николаевне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «IQ-пептиды Кунитц-типа морских анемонов рода *Heteractis*» по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» принята к защите «02» апреля 2021 г., протокол № 6, 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 Кветкина Александра Николаевна, 1991 года рождения, работает младшим научным сотрудником в 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.

Научные руководители:

Кандидат химических наук, доцент Лейченко Елена Владимировна, заведующая лабораторией молекулярной фармакологии и биомедицины ТИБОХ ДВО РАН.

Кандидат медицинских наук, доцент Исаева Марина Петровна, заведующая лабораторией морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН.

Официальные оппоненты:

Уткин Юрий Николаевич, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной токсикологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) и

Шкрыль Юрий Николаевич, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий и биомедицины ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, г. Владивосток, в своем положительном заключении, подписанном Долматовым Игорем Юрьевичем, доктором биологических наук, зав. лабораторией сравнительной цитологии, указал, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием и соответствует требованиям ВАК, в том числе пунктам 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Соискатель имеет 38 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 12 работ, из них 4 опубликованы в рецензируемых научных изданиях, в которых вклад автора является определяющим. Среди них наиболее значимые работы:

1. Kvetkina A., Leychenko E., Chausova V., Zelepuga E., Chernysheva N., Guzev K., Pislyagin E., Yurchenko E., Menchinskaya E., Aminin D., Kaluzhskiy L., Ivanov A., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Isaeva M.P. A new multigene HClQ subfamily from the sea anemone *Heteractis crispa* encodes Kunitz-peptides exhibiting neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine // Scientific Reports. 2020. V. 10. P. 4205. doi: 10.1038/s41598-020-61034-x.

2. Кветкина А.Н., Лейченко Е.В., Юрченко Е.А., Пислягин Е.А., Пеньёр С., Титгат Я., Исаева М.П., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. Новый IQ-пептид Кунитц-типа актинии *Heteractis magnifica* обладает нейропротективной активностью в модели болезни Альцгеймера // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 408–416.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН (г. Москва), д.х.н. Козлов С.А. отметил, что работа

производит хорошее впечатление: автореферат написан грамотно, иллюстративный материал понятен и вполне достаточен, выводы обоснованы и отражают представленный экспериментальный материал. Замечания по работе: 7 выводов можно было бы сократить до нескольких более глобальных; для наглядности термостабильности пептидов было бы хорошо привести спектры полипептидов с близкой молекулярной массой и другим типом укладки с низкой термостабильностью; на рисунке 2 не хватает информации о总量ном количестве отсеквенированных ампликонов для каждого изученного вида; вывод о высоком потенциале IQ-пептидов в качестве противовоспалительных соединений не обоснован ввиду отсутствия прямых экспериментов на животных моделях; раздел «Заключение» очень затянутый и повторяет ранее высказанные тезисы.

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН (г. Москва), д.х.н. Кашеверов И.Е. отметил, что проведенная работа позволила пополнить библиотеку природных токсических соединений из ядовитых животных. Недостаточно информации о личном вкладе автора в проведении экспериментов и отсутствие объяснения причины выбора в качестве модели тестирования только калиевых каналов для выяснения механизма цитопротекторной активности исследуемых IQ-пептидов.

Профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии ШЕН ДВФУ, д.б.н. Санина Н.М. отметила, что в работе сделаны интересные выводы о практической значимости IQ-пептидов в качестве нейропротекторов. Замечания и вопрос по работе: слово «анемон» мужского рода, поэтому в родительном падеже множественного числа пишется как «анемонов», а не «анемон»; употребление выражения «комбинаторная библиотека» уместно для искусственно созданных наборов каких-либо соединений, а не для веществ, которые продуцируются в организме; расшифровки, пояснения к рисункам принято писать после названия рисунка, а раздел «Материалы и методы» логично было бы поместить перед разделом «Результаты и обсуждение». NGS – это группа методов секвенирования нового поколения. Какой конкретно метод использовался в работе?

Старший научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов и лаборатории молекулярной медицины Института цитологии РАН (г. Санкт-

Петербург), к.б.н. Шувалов О.Ю. считает, что по научному содержанию, методологической базе, новизне, полученным результатам и выводам, а также по теоретической и практической значимости диссертационная работа соответствует квалификационным требованиям, предъявляемым к кандидатской диссертации.

Научный сотрудник лаборатории молекулярной медицины Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), к.б.н. Голотин В.А. отметил, что работа выполнена на современном уровне. Однако по его мнению, использование метода кругового дихроизма для изучения перехода термоденатурации пептидов является устаревшим методологическим подходом, химические методы в работе наименее выражены среди использованных методик; в подписях к некоторым рисункам, в частности рисунку 9, не хватает информации, каким конкретно методом было исследовано то или иное свойство или активность пептидов; при исследовании влияния пептидов на клетки следует использовать не менее трех линий клеток и не менее двух методов исследования; следует указывать номер коллекции, откуда были взяты клеточные линии.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что они являются компетентными специалистами в данной области исследований, что подтверждается их публикациями. Выбор ведущей организации основан на том, что в ней проводятся работы по комплексному изучению морских гидробионтов и продуцируемых ими биологически активных соединений с использованием как транскриптомных и протеомных подходов, так и *in vitro* и *in vivo* методов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые установлены нуклеотидные последовательности, кодирующие IQ-пептиды актиний *H. crispa* и *H. magnifica*, которые являются представителями комбинаторной библиотеки пептидов Кунитц-типа актиний. Предложен комплексный подход к идентификации транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа. Показано, что предшественники IQ-пептидов отличаются от других пептидов Кунитц-типа актиний рода *Heteractis* наличием пропептида с сайтом расщепления, характерным для токсинов ядовитого секрета этих животных. Установлена экзон-интронная структура генов IQ-пептидов, которые образуют отдельное подсемейство в составе мультигенного GS-семейства пептидов Кунитц-типа.

Разработана схема проведения экспрессии и выделения рекомбинантных аналогов IQ-пептидов *H. crispata* и *H. magnifica*. Исследовано взаимодействие IQ-пептидов с различными сериновыми протеазами. Показано, что все рекомбинантные аналоги IQ-пептидов обладают трипсинингибирующей активностью. Впервые показано, что пептиды Кунитц-типа способны снижать токсическое действие 6-гидроксидофамина и β -амилоида на клетки нейробластомы мыши.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученные результаты значительно расширяют знания о разнообразии транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа актиний рода *Heteractis*, и об эволюционных процессах, участвующих в его формировании. В рамках работы использован широкий набор подходов и методов исследования, включая физико-химические методы, методы молекулярной биологии и биотестирования. Проведена модернизация подхода к идентификации транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа. Изложены доказательства принадлежности генов IQ-пептидов к мультигенному семейству. Изучены структурно-функциональные особенности исследуемых пептидов, показано влияние замены аминокислотных остатков на проявление биологической активности.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что полученные автором данные раскрывают возможность применения IQ-пептидов в качестве ингибиторов сериновых протеаз при различных патологиях, связанных с гиперактивностью данной группы ферментов, а наличие нейропротективной активности позволяет рассматривать их в качестве потенциальных соединений для создания фармакологических препаратов. Разработаны комплексный подход для идентификации последовательностей, кодирующих пептиды Кунитц-типа, в транскриптах актиний и схема выделения рекомбинантных аналогов пептидов Кунитц-типа.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что исследования были проведены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и программ. Предложенные в работе идеи базировались на анализе литературных данных. Представленные результаты сопоставимы с данными, полученными ранее для известных соединений.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов, связанных с идентификацией нуклеотидных последовательностей, кодирующих IQ-пептиды Кунитц-типа, их количественным и качественным анализом, получением рекомбинантных аналогов IQ-пептидов, установлением пространственной структуры пептидов, их связывания с сериновыми протеазами, определением трипсинингибирующей активности. Соискатель принимала активное участие в подготовке публикаций по теме исследования.

Диссертационный совет пришел к выводу, что диссертация Кветкиной А.Н. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, результаты которой имеют важное как теоретическое, так и практическое значение в области биоорганической химии, токсикологии и фармакологии. Работа написана автором самостоятельно и содержит научные результаты, актуальные в данной области исследования. Таким образом, диссертационная работа Кветкиной Александры Николаевны 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 Кветкиной А.Н. 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.

