

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
(ФАНО России)**

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биофизики клетки
Российской академии наук
(ИБК РАН)**

142290, г. Пущино
Московской обл., ул. Институтская, 3
Для телеграмм: Пущино, Биофизика
Телефон: (495) 925-59-84
Факс: (4967) 33-05-09
E-mail: admin@icb.psn.ru
<http://www.icb.psn.ru>
ОКПО 02699694, ОГРН 1025007773581
ИНН/КПП 5039002150/503901001

07.04.16 № 12306 /01-1-2171.

На № _____ от _____

Утверждаю

Директор Учреждения академии наук
Института биофизики клетки РАН
Чл-корр. РАН, проф. Е.Е.Фесенко

«7» апреля 2016 г.

**Отзыв ведущей организации о диссертационной работе Яны Владиславовны
Макаровой на тему: «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов:
анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных
клеток PC12», представленной на соискание ученой степени кандидата химических
наук по специальности 03.01.04 Биохимия**

Некоторые виды животных (членистоногих, пресмыкающихся, моллюсков) в целях жизнеобеспечения и защиты вырабатывают широкий спектр соединений, которые синтезируются в ядовитых железах. Эти соединения, главным образом белковой природы, способны влиять на многие ключевые процессы в организме (передачу сигнала через взаимодействие с мембранными рецепторами и ионными каналами, пролиферацию клеток, их выживаемость, адгезию и дифференцировку, систему внутриклеточных посредников, структуру цитоскелета и пр.) и поэтому представляют большой интерес для изучения структуры и механизмов функционирования мишеней. С другой стороны, при изучении действия на одну мишень необходимо учитывать возможное влияние на другие. Использование токсинов из ядов змей и пауков сыграло решающую роль в исследовании экспрессии, структуры и принципов работы никотиновых холинорецепторов, других Gys-петельных рецепторов, потенциал-активируемых калиевых и натриевых каналов, Ca²⁺-активируемых калиевых каналов и др. В некоторых случаях обнаружение и установление

специфичности действия компонентов ядов привело к созданию на их основе лекарственных препаратов.

Благодаря совершенствованию методов выделения и очистки к широкому спектру токсических соединений удалось добавить минорные компоненты ядов с уникальными свойствами. Кроме того, некоторые уже известные компоненты (как, например, изучавшиеся в настоящей работе фосфолипазы А2) обладают множественным действием. Активность ранее известных и вновь полученных веществ на клеточном уровне изучена недостаточно. Новые сведения важны как в плане фундаментальных знаний, так и для создания противораковых средств, а в перспективе также лекарств для лечения нейродегенеративных заболеваний. Все это делает работу Яны Владиславовны Макаровой, посвященную выяснению влияния соединений трех структурных семейств из ядов змей на поведение пролиферирующих клеток РС12, в высшей степени актуальной.

Диссертационная работа содержит подробный обзор литературы по распространению и свойствам разнообразных белковых компонентов ядов змей, биологической активности, структуре и механизмам токсического действия трехпетельных токсинов (α -нейротоксинов, цитотоксинов и минорных димерных токсинов), металлопротеиназ и фосфолипаз А2. Большой интерес представляют сведения о существенном изменении специфичности альфа-нейротоксинов при образовании димеров. Кроме того, описано действие ряда нейритогенных и антипролиферативных соединений из ядов змей. Обзор большой по охвату литературы, как классической, так и современной, и читается с большим интересом.

Выбор объекта можно считать очень удачным: клетки линии РС12 активно пролиферируют и в этом плане сходны с опухолевыми, но не потеряли способности образовывать отростки и контакты между ними с прекращением пролиферации и т.о. приобретать свойства настоящих нейронов. Тщательно выбраны методы исследования выживаемости клеток и нейритогенеза.

Автор подробно изучила действие металлопротеиназы оксиагина, мономерных, гомодимерного и гетеродимерных трехпетельных токсинов и 7 фосфолипаз А2 на выживаемость и рост отростков у клеток линии РС12. Ею получены новые данные, а именно:

1. Оксиагин вызывает открепление клеток от субстрата с дальнейшей кластеризацией, что приводит к прекращению пролиферации.
2. α -Нейротоксины, известные высоким сродством к никотиновым холинорецепторам мышечного и α -7 нейронного типов, а также гомодимер альфа-кобратоксина не влияют на выживаемость клеток, что

подтверждает их специфичность в отношении никотиновых холинорецепторов. Цитотоксины, наоборот, приводят к массивной гибели клеток РС12. Крайне интересно, что образование гетеродимеров α -кобратоксина и одного из цитотоксинов влечет за собой полную потерю цитотоксичности. При этом сродство гетеродимеров кобратоксина и цитотоксинов к мышечным, α 7 и α -3 β 2 никотиновым рецепторам сохраняется.

3. Большинство исследованных фосфолипаз, принадлежащих к группам IIa и IA, цитотоксичны и вызывают рост отростков. Высказано предположение, что эти эффекты связаны с фосфолипазной активностью и накоплением лизофосфатидилхолинов. Действительно, для двух фосфолипаз, ФГД1 и ФГД2, показана корреляция между гидролизом фосфатидилхолинов мембраны клеток с накоплением лизо-форм и нейритогенной активностью. Однако ряды по фосфолиполитической активности и способности вызывать рост отростков (как и цитотоксического эффекта) не совпадают. Более того, обнаружена очень высокая способность битанарина – необычной фосфолипазы из яда африканской шумящей гадюки - вызывать нейритогенез при полном отсутствии цитотоксического эффекта. Аналогично этому, фосфолипаза TiNh группы IB из яда кобры, характеризующаяся низкой ферментативной активностью, проявляет высокую способность вызывать рост отростков, но полностью лишена цитотоксического эффекта. Все это указывает на существование второго механизма нейритогенного действия. Такой второй путь, по-видимому, опосредованный тирозинкиназными рецепторами и запуском цепи внутриклеточных реакций, подтверждается данными Я.В.Макаровой по устранению нейритогенного эффекта битанарина в присутствии ингибитора тирозинкиназ и различных протеинкиназ K-252a. Напротив, литературные данные по аддитивности действия фосфолипаз и фактора роста нервов подтверждают отличный от рецепторного механизм действия таких фосфолипаз, как ФГД1, ФГД-2, CM2.

Некоторые замечания и вопросы:

1. На стр. 89 и рис 20 приводятся данные по колоколообразной концентрационной зависимости действия ФГД1 на рост отростков. Предположительное объяснение: более сильное цитотоксическое действие в отношении

дифференцированных клеток. Эта гипотеза интересна и заслуживает экспериментальной проверки.

2. Непонятно, почему битанарин, обладая высокой фосфолиполитической активностью (значительно выше, чем ФГД1 и ФГД-2), не цитотоксичен вообще, а фосфолипазы из яда *Vipera ursinii renardi*, еще более активные ферменты, проявляют цитотоксический эффект только в концентрации 10 мкМ. Что мешает этим белкам гидролизовать фосфатидилхолин или почему в этих условиях нарушение структуры мембраны не приводит к гибели клеток? Крайне желательно продолжение работы в этом направлении.
3. В таблице 8 на стр. 107 нейритогенез под действием разных фосфолипаз представлен для слишком широкого диапазона концентраций – больше трех порядков. Это не слишком удачно, т.к. скрадывает большую разницу в дифференцирующей активности ФЛА2.
4. Есть некоторое количественное расхождение фосфолипазной активности ($VurPL2, CM2 > ФГД1Ф > ФГД2Ф > ФГД1 > ФГД2$) и цитотоксичности ($ФГД2Ф \geq ФГД1Ф > ФГД2 > ФГД1 > CM2 \gg VurPL2$). Как это можно было бы объяснить?
5. Выяснение причины отсутствия цитотоксичности у гетеродимеров α -кобратоксина и цитотоксинов тоже представляется достойной задачей последующих исследований.

Все замечания носят характер пожеланий продолжения работы и ни в малой степени не влияют на высокую оценку диссертационной работы. Диссертация Макаровой вносит существенный научный вклад в сведения о механизмах токсического действия природных соединений, что крайне важно для дальнейшего развития исследований в области биохимии и биологии клетки и может быть использовано при создании лекарственных средств избирательного действия. Как было указано выше, выбранная тема и ее разработка весьма актуальны. Исследование проведено на высоком уровне с использованием современных методов протеомики и клеточной биологии, включает также данные по масс-спектрометрическому анализу фосфолипидов мембраны клеток и конкуренции за связывание меченого α -бунгаротоксина с несколькими мишенями. Вынесенные для обсуждения положения обоснованы. Каждый этап работы выполнен тщательно с достаточным числом повторностей, достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Выводы обоснованы, вполне соответствуют проведенной работе. Диссертация содержит новые важные сведения и в целом представляет завершённое исследование, написана хорошим языком, четко, хорошо оформлена рисунками и

таблицами. Материалы опубликованы в журнале Биохимия, включенном в список ВАК, и в виде трех статей в международных журналах с высоким импакт-фактом, многократно докладывались на международных и отечественных конференциях. По результатам исследования фосфолипазы $TiNh$ из яды кобры получен патент Российской Федерации. Материалы, собранные в обзоре полезно использовать в лекциях студентам и аспирантам. Автореферат соответствует полному тексту диссертации. Упомянутые выше результаты работы могут быть использованы для дальнейших исследований механизмов функционирования клеточных структур, являющихся мишенями токсических соединений, в Институте биоорганической химии им. акад М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Институте биофизики клетки РАН, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институте цитологии РАН, Институте эволюционной физиологии и биохимии РАН, Институте фармакологии им. Закусова РАМН.

Диссертационная работа Макаровой Яны Владиславовны «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток PC12», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённом Постановлением Правительством Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842, и профилю диссертационного совета Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия. Автор заслуживает присвоения ей искомой степени.

Отзыв был заслушан и утвержден на семинаре лаборатории клеточной нейробиологии Института биофизики клетки РАН 25 марта 2016 г. протокол №1)

ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биофизики клетки Российской академии наук (ФГБУ ИБК РАН)
кандидат биологических наук



Е.А. Вульфийус

Е.А.Вульфийус

7 апреля 2016 г.

Е.А. Вульфийус
Удостоверяю *зав. катедры*

Е.А. Вульфийус