

Заключение диссертационного совета Д 001.022.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 03 марта 2020 г. № 122

О присуждении Алешиной Галине Матвеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Антимикробные катионные пептиды и белки врожденного иммунитета как эффекторные и регуляторные молекулы защитных функций организма» по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия принята к защите 26 ноября 2019 г., протокол № 117 диссертационным советом Д 001.022.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 (утвержден приказом Минобрнауки Российской Федерации №105/нк от 11.04.2012).

Соискатель Алешина Галина Матвеевна, 1957 года рождения. В 1980 году соискатель закончила физико-механический факультет Ленинградского политехнического института им. М.И. Калинина. В 1986 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Физико-химические и антимикробные свойства лактоферринов нейтрофильных гранулоцитов и молока» и ей была присуждена ученая степень кандидата биологических наук (решение диссертационного совета НИИ экспериментальной медицины АМН СССР от 26 мая 1986 г. № 7).

В настоящее время работает в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в

должности ведущего научного сотрудника отдела общей патологии и патологической физиологии.

Диссертация выполнена в отделе общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Научные консультанты:

1. Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

2. Кокряков Владимир Николаевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией общей патологии отдела общей патологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Официальные оппоненты:

1. Шпаков Александр Олегович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук;

2. Линькова Наталья Сергеевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения Автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии»;

3. Колобов Александр Александрович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией химии пептидов Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем положительном отзыве, подписанном Грызуновым Владимиром Викторовичем, доктором медицинских наук, профессором кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, и Васиной Любовью Васильевной, доктором медицинских наук, заведующей кафедрой биологической химии, и утвержденном проректором ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, академиком РАН, доктором медицинских наук, профессором Полушиным Юрием Сергеевичем указала, что диссертация является фундаментальным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которого можно классифицировать как научное достижение, имеющее существенное значение для современной патофизиологии, биохимии и иммунологии, содержащее новое решение важной научной проблемы, а именно, настоящая работа важна как для понимания функционирования нейроэндокринной и иммунной систем, так и для теоретического обоснования разработки инновационных противовоспалительных лекарственных средств, и препаратов, направленных на коррекцию нарушений нейроиммунного взаимодействия.

Соискатель имеет 47 опубликованных работ по теме диссертации, из них 25 статей в журналах рекомендованных ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований, 14 из которых в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, общим объемом 32 условного печатного листа, авторский вклад составил 70%. Получено 2 патента на изобретение.

Диссертация не содержит некорректных заимствований.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Алешина, Г.М. Лактоферрин – эндогенный регулятор защитных функций организма / Г.М. Алешина // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 35-44.
2. Алешина, Г.М. Иммуномодулирующее действие дефенсина RatNP-1 – антибиотического пептида из нейтрофилов крысы, в условиях экспериментального стресса / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, В.Н. Кокряков // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11(20), № 4. – С. 673-675.
3. Алешина, Г.М. Стресс-протективное действие лактоферрина человека / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, Е.Т. Захарова, В.Н. Кокряков // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 7. – С. 846-851.
4. Цветкова, Е.В. Антимикробные свойства α -дефенсинов из лейкоцитов крови павиана гамадрила *Papio hamadryas* / Е.В. Цветкова, Л.Е. Леонова, Г.М. Алешина, [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2016. – Т. 52, № 2. – С. 118-125.
5. Янкелевич, И.А. Особенности развития стресс-реакции у крыс при стрессирующем воздействии и введении антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 / И.А. Янкелевич, Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков // Медицинский академический журнал. – 2014. – Т. 14, № 4. – С. 63-67.
6. Алешина, Г.М. Эндотоксин-нейтрализующее действие антимикробных пептидов / Г.М. Алешина, О.В. Шамова, С.В. Перекрест [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2013. – Т. 12, № 1-2. – С. 72-77.
7. Алешина, Г.М. Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения дефенсинов из нейтрофильных гранулоцитов крыс / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, В.Н. Кокряков // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (часть 7). – С. 1347-1351
8. Stegemann, C. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / C. Stegemann, E.V. Tsvetkova, G.M.

- Aleshina [et al] // *Rapid Commun Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24, No. 5. – P. 599-604.
9. Tsvetkova, E.V. α -Defensins from blood leukocytes of the monkey *Papio hamadryas* / E.V. Tsvetkova, G.M. Aleshina, O.V. Shamova, [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 2006. – Vol. 71, No 8. – P. 879-883.
 10. Кокряков, В.Н. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность / В.Н. Кокряков, Л.В. Ковальчук, Г.М. Алешина, О.В. Шамова // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2006. – № 2. – С. 98-105.
 11. Сахарова, И.Я. Показатели иммунитета и биологические свойства микобактерий при инфильтративном туберкулезе легких / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Л.А. Скворцова, Б.Е. Кноринг, Б.И. Вишневский, Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков // *Проблемы туберкулеза и болезней легких.* – 2005. – № 11. – С. 14-18.
 12. Ovchinnikova, T.V. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* / T.V. Ovchinnikova, G.M. Aleshina, S.V. Balandin [et al] // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 577. – P. 209-214.
 13. Сахарова, И.Я. Показатели приобретенного иммунитета и катионные белки нейтрофильных гранулоцитов при туберкулезе легких / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Л.А. Скворцова, Б.Е. Кноринг, Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков // *Проблемы туберкулеза и болезней легких.* – 2003. – № 10. – С.50-53.
 14. Кокряков В.Н. Достижения и проблемы в изучении антибиотических пептидов животного происхождения / В.Н. Кокряков, Г.М. Алешина, О.В. Шамова [и др.] // *Вестник РАМН.* – 2002. – № 12. – С. 15-20.
 15. Leonova L.E. Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity / L.E. Leonova, V.N. Kokryakov, G.M. Aleshina [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2001. – Vol. 70. – P. 461-464.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

1. Черешнева Валерия Александровича, академика РАН, доктора медицинских наук, научного руководителя Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН.
2. Мирошникова Анатолия Ивановича, академика РАН, доктора химических наук, заведующего отделом биотехнологии ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;
3. Дубины Михаила Владимировича, академика РАН, доктора медицинских наук, и.о. директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
4. Литвиновой Ларисы Сергеевны, доктора медицинских наук, директора Центра иммунологии и клеточных технологий, профессора кафедры фундаментальной медицины медицинского института Балтийского федерального университета им. И.Канта
5. Сазоновой Елены Николаевны, доктора медицинских наук, заведующей кафедрой нормальной и патологической физиологии, проректора по научной работе ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России
6. Харченко Евгения Петровича, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Все отзывы положительные, критических замечаний и вопросов не содержат. Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывался высоким уровнем их профессиональной компетентности, профессиональной деятельности, наличием публикаций в соответствующей сфере исследования и широкой известностью своими достижениями в данной области науки.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная идея, что молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета, мобилизующиеся в первые минуты и часы воздействия на организм неблагоприятных факторов, вовлечены не только в противоинфекционную защиту, но и в более широкий круг защитно-приспособительных реакций, а антимикробные пептиды и белки (АМПБ) – ключевые молекулярные факторы врожденного иммунитета, – могут выполнять функцию эндогенных иммуномодуляторов и адаптогенов;

открыты и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные катионные пептиды из лейкоцитов крови и костного мозга макак-резуса *Macaca mulatta*, относящиеся к θ -дефенсинам – RTD-2 и RTD-3; **установлено**, что циклические θ -дефенсины из лейкоцитов макак-резуса *Macaca mulatta* (RTD-2, RTD-3, RTD-1) представляют собой продукты посттрансляционной системы формирования разнообразия первичных структур антимикробных белково-пептидных соединений, основанной на сочетании процессинга и пептидной рекомбинации, за образование трех изоформ θ -дефенсинов ответственны только два гена; **открыты** и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные пептиды из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*, относящиеся к семейству дефенсинов – α -дефенсины PHD1, PHD2, PHD3 и θ -дефенсины PhTD-1 и PhTD-3 и новые катионные антимикробные пептиды из целомоцитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*), относящиеся к новой структурной группе антимикробных пептидов; **установлено**, что свойство α -дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов снижать при превентивном введении стресс-индуцированный уровень кортикостерона у экспериментальных животных не зависит от их способности связываться с рецепторами АКТГ на культуре клеток надпочечников; **показано**, что эндогенные дефенсины крысы участвуют в регуляции уровня кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции; **выявлено** свойство α -дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов нормализовать стресс-индуцированные изменения количества нейтрофилов в крови и экспрессии

генов цитокинов и рецептора TLR4 в клетках селезенки экспериментальных животных; **установлено**, что лактоферрин человека – важный молекулярный фактор врожденного иммунитета, – проявляет стресс-протективное действие, предварительное введение этого белка снижает стресс-стимулированное повышение уровня кортикостерона в крови крыс и уровня экспрессии генов ИЛ-4 и TLR4 в селезенке, кортикостатическое действие лактоферрина человека зависит от аминокислотной последовательности в N-концевой области молекулы; **предложена научная гипотеза** о реализации регуляторных функций антимикробных катионных пептидов и белков через их действие на систему меланокортиновых рецепторов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

открытие новых антибиотических пептидов (в том числе новых структурных групп пептидов) животных, принадлежащих к различным таксономическим группам, определение их первичных аминокислотных последовательностей и структуры генов, изучение особенностей антибиотического действия расширяют представления о становлении механизмов врожденного иммунитета в ходе эволюции; **изложены** идеи, что нейтрофилы высших позвоночных являются не только фагоцитарными клетками, но и участвуют в формировании механизмов поддержания гомеостаза благодаря секреции АМПБ, проявляющих свойства иммуномодуляторов и адаптогенов; **заложены научные основы** для дальнейшего изучения клеток-мишеней эндогенных антимикробных пептидов и белков и путей их сигнальной трансдукции, что позволит вывести решение проблемы коррекции различных патофизиологических процессов и создания новых лекарственных препаратов на основе эндогенных АМПБ на качественно новый уровень; **применительно к проблематике диссертации результативно** использован комплекс современных патофизиологических, биохимических, молекулярно-биологических и иммунологических методов. Значение полученных соискателем результатов исследования для **практики** подтверждается тем, что:

Исследуемые антимикробные пептиды и белки являются перспективными объектами для применения в медицине и ветеринарии в качестве антибиотиков, противовоспалительных препаратов и иммуномодуляторов нового поколения, в частности, **установлено**, что антимикробный полипептид профенин-1 обладает оптимальным набором свойств для создания эндотоксин-нейтрализующего препарата – связывает ЛПС с высокой аффинностью, нормализует ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов клетками иммунной системы и эндотелия, не усиливая перекисное окисление липидов; выявление изменений в показателях врожденного иммунитета (внутри- и внеклеточного содержания АМПБ), характерных для конкретных видов патологии, могут быть использованы для дифференциальной диагностики, прогноза течения заболевания и оценки адекватности проводимого лечения, раскрытия звеньев патогенеза заболеваний, в частности, по результатам исследования получен патент РФ RU 2308723 «Способ определения активности туберкулезного спондилита».

Оценка достоверности результатов выявила:

для экспериментальных работ использовались общепризнанные стандартные экспериментальные модели, результаты получены на сертифицированном оборудовании; достоверность результатов обеспечена разнообразием применяемых методов, адекватным поставленным задачам, корректной обработкой данных методами статистического анализа; **теории и идеи**, изложенные в работе, основаны на анализе экспериментальных данных, полученных автором, и их сравнении с результатами отечественных и мировых исследований, и анализе существующих представлений и гипотез по рассматриваемым вопросам;

Личный вклад соискателя состоит в выработке концепции, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их теоретическом обобщении, подготовке публикаций и апробации результатов на российских и международных конференциях. Статьи написаны или самим автором, или при активном его участии. Имена соавторов указаны в

соответствующих публикациях. Данные, составляющие основное содержание работы и касающиеся получения новых пептидов, разработки иммуноферментных тест-систем, анализа содержания АМПБ в биологических жидкостях, исследования экспрессии генов, получены автором лично.

На заседании 03 марта 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Алешиной Г.М. ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 32 человек, из них 16 докторов наук по специальности 14.03.03. – патологическая физиология, 5 докторов наук по специальности 03.01.04 – биохимия, из 33 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 5 человек, проголосовали:

За – 31, против – нет, недействительных бюллетеней – 1

Председатель диссертационного совета

Чл.-корр. РАН, д.б.н.



Шамова О.В.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д.м.н.

Киселева Е.П.

03 марта 2020 г.