

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Биличенко Андрея Сергеевича

на тему: «Влияние активации двух различных центров связывания растворимой гуанилатциклазы, реализующих NO-зависимый и NO-независимый механизмы, на регуляцию активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс»

по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

Общая характеристика работы

Диссертация А.С.Биличенко представляет собой экспериментальное физиологическое исследование, проведенное в основном методами клеточной электрофизиологии с использованием также молекулярно-биологических методов. Работа выполнена на кафедре физиологии медико-биологического факультета РНИМУ им Н. И. Пирогова. Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста, состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы (283 источника). Результаты диссертационного исследования опубликованы в 4 статьях в журналах, индексируемых Web of Science и/или Scopus (Impact Factor 0.737-2.52). Материалы работы апробированы на научных конференциях разного уровня, в том числе на крупном национальном научном форуме – XXIV съезде Российского физиологического общества им. И.П. Павлова.

Актуальность избранной темы

Работа А.С.Биличенко посвящена сложнейшей проблеме – раскрытию механизмов функционирования механоуправляемых ионных каналов. Прежде всего, усилия автора были направлены на изучение ионных токов через механоуправляемые каналы при воздействии на них факторов, так или иначе связанных с оксидом азота (NO). Трудность решения этих проблем обусловлена несколькими причинами.

Во-первых, объект изучения (ионные токи через механоуправляемые каналы) очень сложен для исследования: величина токов мала, ионные каналы неселективные, поэтому многие общепринятые электрофизиологические подходы для данной работы использовать невозможно или затруднительно.

Во-вторых, требуется очень высокая точность манипуляций. Вообще, техника patch-clamp сложна именно в части мануальных процедур: изоляция клеток, подведение пипетки, получение гигаомного контакта, разрыв мембраны – все эти операции требуют практических навыков, которые приобретаются путем упорных тренировок. В данной же работе, помимо вышеперечисленных общих процедур применялось также дозированное растяжение кардиомиоцитов, что создает еще большие сложности для проведения исследования.

В-третьих, сложность изучаемой системы внутриклеточной сигнализации, связанной с оксидом азота. Эта система включает в себя, по крайней мере, два пути: прямого S-нитрозилирования молекулярных мишеней и активации растворимой гуанилатциклазы, которая запускает каскад последующих регуляторных реакций. Для точной характеристики эти пути нужно разделять, что требует дополнительных усложнений эксперимента.

Наконец, в-четвертых, дизайн исследования оказывается чрезвычайно сложным, «многослойным»: требуется выполнить контрольную запись тока, вызвать механическое растяжение, подействовать одним или несколькими агентами последовательно или параллельно, наконец проанализировать все данные в совокупности.

Вместе с тем, проблема механоэлектрической обратной связи в сердце вызывает растущий интерес, обусловленный прежде всего возможностью возникновения механоиндуцированных аритмий как при остром так и при хроническом растяжении миокарда. Ведется поиск средств для профилактики или купирования таких нарушений ритма, для чего необходимо знание механизмов, управляющих механоуправляемыми и механомодулируемыми

ионными каналами. В связи с этим, актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Автором обоснованы и сформулированы цель и задачи работы, сделан информативный обзор литературы. В сочетании с этим глубокое обсуждение полученного материала показывает очень хорошее знание автором научной литературы. Описание методов дает полное представление о выполненных экспериментах. Для работы использованы современные методы. Электрофизиологические и молекулярно-биологические подходы подкрепляют друг друга. Выводы корректные, полностью основаны на полученных результатах и соответствуют поставленным цели и задачам.

Достоверность

Диссертационное исследование А.С.Биличенко хорошо спланировано, в нем используются современные, соответствующие цели и задачам работы методы физиологического эксперимента. Результаты проанализированы с использованием адекватных статистических методов с помощью современного программного обеспечения.

Новизна полученных результатов

В работе продемонстрировано, что донор NO вызывает ионный ток с характеристиками тока через каналы, активируемые растяжением (I_{SAC}). Установлены молекулярные продукты-кандидаты на роль каналов, переносящих данный ток в сердце крысы. Это, в основном, TRP-каналы и канал Piezo1. В то же время из числа кандидатов исключен TRPC6, экспрессия которого в сердце крысы не обнаружена.

Особенно важным и изящным достижением А.С.Биличенко является, на мой взгляд, демонстрация и объяснение двухфазного эффекта оксида азота, который включает в себя раннюю активацию и позднее ингибирование механосенситивного тока. Путем приложения набора веществ – модификаторов различных элементов сигнальных путей было показано, что ранняя активирующая фаза была связана с процессом S-нитрозилирования, а

поздняя ингибирующая – с сигнальным путем через растворимую гуанилатциклазу, цГМФ, протеинкиназу G.

По диссертации возникло несколько дискуссионных вопросов

1. Очень важным, на мой взгляд, является рассуждение автора о том, насколько наблюдаемые в эксперименте эффекты оксида азота имеют отношение к событиям в естественных условиях в клетке. Несколько раз на протяжении работы автор замечает, что точно определить содержание NO в клетке не представляется возможным. Вместе с тем, в выводе 6 говорится: «Определенный внутриклеточный уровень NO необходим для работы SAC, но увеличение его концентрации приводит к ингибированию их работы». Не является ли это натяжкой? Откуда известно, что концентрация NO в клетке соответствует уровню, который в эксперименте определен как необходимый? Можно ли уверенно отрицать, что он не достигает «ингибирующего» уровня? Можно ли утверждать, что «ингибирующий» уровень достижим в естественных условиях?
2. Хотелось бы получить больше аргументов в пользу того, что измеряемые токи не являются утечкой, артефактом регистрации и т. п. Важно еще раз отметить, что изучаемые ионные токи малы, поэтому такая проверка необходима. Например, на мой взгляд, утечку нельзя исключить на рисунке 5А: токи в одной и той же клетке до и после импульса должны быть одинаковы, а они различаются, и величина этих различий сравнима с эффектом растяжения (разница между кривыми). Мне кажется, что аргументации помогли бы записи с разной степенью растяжения, чтобы показать «дозозависимость» эффекта, однако в работе эти записи не приводятся.
3. Немного смущает фраза на странице 52: «отбирали клетки одинаковой геометрии; в среднем эти клетки имели емкость мембраны 150 ± 16 пФ». Однако, если ± 16 – это ошибка средней (как следует из раздела 2.9), а

всего клеток 188, то разброс по емкости выходит гигантский. Нет ли здесь ошибки?

Замечания по работе

Принципиальных недостатков в работе нет. Имеются замечания, касающиеся, в основном, стиля изложения. К их числу можно отнести следующее:

1. Задачи исследования в диссертации сформулированы, скорее, как методические этапы работы, а выводы – скорее, как резюме полученных результатов. Безусловно, такой подход имеет право на существование, но требует от читателя дополнительной интеллектуальной работы типа: на какой научный вопрос ответят эксперименты, указанные в задаче 1, о чем может свидетельствовать набор наблюдений, приведенный в выводе 2, и т. п.
2. Разделы «Научная новизна» и «Теоретическая и практическая значимость работы», по сути, не сообщают информации, а являются своеобразным анонсом последующего текста.
3. Имеются грамматические погрешности, затрудняющие понимание текста.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных» по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Биличенко Андрей Сергеевич вполне заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных».

Официальный оппонент:

Азаров Ян Эрнестович

Доктор биологических наук, доцент

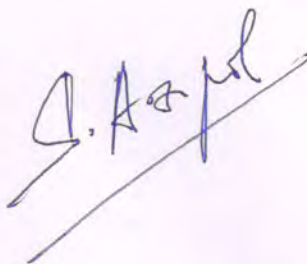
Главный научный сотрудник лаборатории физиологии сердца
Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный
центр Уральского отделения Российской академии наук»
Специальность, по которой защищена диссертация оппонентом: 03.00.13 –
Физиология

Адрес: 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул.Первомайская, д. 50

Тел.: (8212)240085

e-mail: office@physiol.komisc.ru

«16» октября 2023 года



Я.Э.Азаров

Подпись Азарова Я.Э. заверяю.

*Заместитель директора
по научной работе
ИИФ Коми научного центра УрО РАН*

16.10.2023



С.Н. Харин