

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Ворониной Яны Алексеевны**  
**на тему: «Механизмы регуляции проведения возбуждения и**  
**ритма сердца, опосредованные пуриновыми P2-рецепторами и**  
**адренорецепторами альфа-типа»**  
**по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»**

Заболевания сердечно-сосудистой системы представляют собой главную причину смертности и инвалидности населения в мире. Одними из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний являются патологии, ассоциированные с нарушениями сердечного ритма, к которым относят разнообразные виды тахикардий, экстрасистолию желудочка, пароксизмальную тахикардию, синдром слабости синусового узла и др. Все они в той или иной степени обусловлены нарушениями в функционировании и изменениями в биоэлектрической активности либо основного ритмоводителя сердца – синоатриального узла (САУ), либо ядра проводящей системы сердца – атриовентрикулярного узла (АВУ). Как САУ, так и АВУ имеют разностороннюю иннервацию как со стороны симпатической, так и со стороны парасимпатической нервной системы. Как симпатические, так и парасимпатические эффекты опосредуются активацией широкого спектра разнообразных сигнальных каскадов через ряд рецепторов, среди которых выделяют постсинаптические адренорецепторы  $\alpha 1$ -типа, а также пуриновые рецепторы P2-типа, чей «запуск» сопряжен с высвобождением пуриновых медиаторов в результате активации синаптических постганглионарных окончаний. Один из механизмов, по всей видимости, активирующийся в ответ на  $\alpha 1$ -адренергическую регуляцию физиологической активности гладкомышечных клеток, ассоциирован с усилением хлорной

трансмембранной проводимости и активацией хлорных ионных каналов и переносчиков хлора. Однако особенности хлорного трансмембранного транспорта, различия и вклада хлорной проводимости в биоэлектрическую активность САУ и АВУ практически не изучены. Таким образом, конкретные механизмы, реализующиеся через вышеупомянутые типы рецепторов и опосредующие биоэлектрическую активность САУ и АВУ, изучены не до конца, и их исследование может быть важным для разработки потенциальных терапевтических агентов, которые в будущем позволят бороться с нарушениями сердечного ритма и улучшать качество жизни пациентов с данными заболеваниями. В этой связи, можно сказать, что выбор темы исследования, проведенного в данной диссертационной работе, является чрезвычайно актуальным для современной науки и медицины.

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 265 ссылок. Работа иллюстрирована 53 рисунками и девятью таблицами.

Обзор литературы заслуживает особого внимания и отдельного рассмотрения как самостоятельная глава диссертации. Он состоит из пяти разделов. Первый раздел посвящен структурным и функциональным особенностям проводящей системы сердца у млекопитающих. В данном разделе подробно рассмотрены анатомия и функции АВУ и САУ, а также соответствующие изменения в них при различных патологических состояниях. В остальных четырех главах рассматриваются рецепторные и сигнальные системы, являющиеся фокусом исследований в данной работе. Так, во второй главе описываются особенности синаптической и адренергической регуляции работы сердца, в третьей – пуринаргическая регуляторная система, в четвертой – роль пуринов и их рецепторов в

вегетативной регуляции сердца, и наконец, в пятой главе – роль хлорных мембранных каналов и их транспортеров в обеспечении биоэлектрической активности сердца. В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, четко и логично, содержит ссылки на публикации самых последних лет, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью выполняет и свою главную функцию – он хорошо готовит читателя к последующему восприятию экспериментального материала.

В методической части подробно описаны электрофизиологические методы исследования регистрации активности АВУ и САУ. Помимо этого, здесь подробно описаны освоенные автором диссертации многочисленные методы исследования. Хочется отметить разнообразие задач: молекулярно-генетических методов (ПЦР в реальном времени, РНК-секвенирование) для оценки экспрессии генов целевых рецепторов и мишеней, иммунохимических методов (иммуногистохимия для определения тканевой локализации постсинаптических адренорецепторов  $\alpha 1$ -типа), приготовления разнообразных препаратов миокарда и различные методы регистрации их биоэлектрической активности (физиологические методы). Такое сочетание самых разных методов исследования является, безусловно, важной особенностью данной работы и производит самое благоприятное впечатление. Однако, хочется отметить, что наличие данных по экспрессии целевых белков методом Вестерн-блоттинг с использованием специфичных к ним антител значительно украсило бы данную работу. Данное замечание, отнюдь, не является критическим и носит рекомендательный характер.

Приступая к анализу раздела «Результаты и обсуждение», хочу сразу отметить четкое и логичное изложение материала диссертации. Все

эксперименты сначала подробно обосновываются, а затем полученные данные подвергаются детальному анализу. В первом разделе «Результатов» (глава 4.1) устанавливается экспрессия адренорецепторов  $\alpha 1$ -типа в САУ и АВУ. Для этого автор использует такие методы как иммуногистохимическое окрашивание, ПЦР в реальном времени и РНК-секвенирование. Несмотря на то, что полученные автором результаты довольно убедительны, здесь возникает несколько технических вопросов. Первый вопрос - с какой целью проводили анализ экспрессии адренорецепторов  $\alpha 1$ -типа не только в САУ, но и в левом предсердии (рис.10). И второй вопрос – какие контрольные эксперименты были проведены автором, чтобы убедиться в специфичности иммуногистохимического окрашивания? (рис.9). Третий вопрос также технический – перед постановкой РНК секвенирования и ПЦР в реальном времени автор оценивал целостность препарата тотальной РНК, однако обнаруживал там только 18S фракцию (табл.6). Обычно о целостности препарата тотальной РНК говорят, если в препарате есть и 28S, и 18S фракция, причем в соотношении 2 к 1. Насколько в данном случае можно судить о целостности препарата РНК?

Далее автор исследует разнообразные электрофизиологические параметры сердца в ответ на стимуляцию  $\alpha 1A$ -рецепторов фенилэфрином в САУ изолированного сердца крыс (глава 4.1) и аналогичным образом исследует эффекты активации  $\alpha 1a$ -адренорецепторов в АВУ (глава 4.2) и обнаруживает эффекты, способствующие росту ЧСС в случае активации  $\alpha 1A$ -рецепторов в САУ, и, напротив, противоположные эффекты в АВУ. Кроме этого, сопоставление полученных в данной части работы результатов с литературными данными об активации  $\beta$ -адренорецепторов при усилении синаптического тонуса, сделанное автором, позволяет предположить, что в АВУ  $\alpha 1A$ -рецепторы действуют антагонистично  $\beta$ -АР, что способствует предотвращению сокращения длительности АВЗ,

поддержанию длительности диастолы и увеличению наполнения желудочков, которое оказывается сниженным при высокой ЧСС. Автор также же делает предположение, что подобный механизм смещения клеточной сигнализации от  $\alpha$ -адренергической к  $\beta$ -адренергической, способствующий усилению аритмогенности АВУ, происходит при гипертрофических изменениях миокарда. Далее автор обнаруживает экспрессию разнообразных пуриновых P2X и P2Y-рецепторов в САУ и АВУ (глава 4.3) и исследует влияние пуриновых комедиаторов, в частности АТФ на физиологические параметры проводящей системы сердца (глава 4.4.). Результаты, полученные в данной части работы, свидетельствуют о негативном влиянии всех используемых пуриновых комедиаторов (АТФ, АДФ, УДФ, УМФ) на ЧСС, однако все они оказывают на ЧСС различное количественное влияние. Данный интересный феномен вызывает вопрос, с чем связано такое различное негативное действие различных пуриновых комедиаторов на ЧСС (рис.20 Б,В). По итогам этой части работы автор заключает, что посредником негативного хронотропного эффекта АТФ в САУ являются P2Y2-рецепторы. По совокупности обнаруженных эффектов при стимуляции  $\alpha$ 1A-рецепторов и P2-рецепторов в АВУ и САУ автор делает вывод о том, что существует ряд мишеней, активация которых в зависимости от тканевого контекста и микроокружения может приводит к разнонаправленным эффектам и одной из таких мишеней является трансмембранная хлорная проводимость. Следует отметить, что идентификация именно таких мишеней в клеточном сигналинге очень важна, так как их тонкая модуляция зачастую определяет дальнейшие клеточные и тканевые эффекты, которые могут быть в зависимости от воздействия как положительными, так и отрицательными. В этой связи разделы диссертации с 4.5 до 4.10 посвящены разностороннему исследованию именно этой мишени. В САУ и АВУ автором обнаружен

значимый уровень экспрессии генов, кодирующих широкий спектр хлорных каналов (ClC-2, ClC-3, LRRC8A, TMEM16A). Также в САУ и АВУ обнаруживается высокий уровень мРНК хлорных симпортеров KCC1 и NKCC1, причем в САУ уровень KCC выше, чем NKCC. В физиологическом контексте автором было продемонстрировано, что избирательная блокада хлорных каналов различного типа подавляет автоматию САУ и проведение возбуждения в АВ-узле. Для реализации данной задачи автор использовал блокаторы хлорных каналов NPPB и DCPIB. Здесь возникает вопрос, насколько специфичны используемые блокаторы и насколько их можно использовать для выявления вклада именно хлорной проводимости в физиологические свойства проводящей системы сердца? Далее автором было показано, что активация  $\alpha_1$ -АР способствует увеличению цитоплазматической концентрации Cl<sup>-</sup> в САУ. Блокада хлорных каналов, для которых обнаруживается наибольшее количество мРНК, приводит к частичному подавлению эффектов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ, но не в АВУ. И, наконец, активация отдельных катион-хлорных симпортеров (KCC1, NKCC1) оказывает существенное влияние на автоматию САУ, а стимуляция  $\alpha_1$ -АР модифицирует в САУ эффекты, обусловленные активацией катион-хлорных трансмембранных симпортеров. Подытоживая заключительную часть работы, можно сказать, что физиологическая роль  $\alpha_1$ -АР и P2Y-рецепторов в проводящей функции САУ и АВУ опосредуется за счет усиления хлорной проводимости и увеличения внутриклеточной концентрации ионов хлора, которое обуславливается изменением баланса активности трансмембранных транспортеров KCC и NKCC. В работе выявлен новый феномен – зависимость автоматии САУ от осмолярности внеклеточной среды. Впервые установлено влияние хлора как фактора, влияющего на проводящую систему сердца, и исследованы механизмы регуляции его уровня в кардиомиоцитах САУ и АВУ.

Подводя итоги, следует сказать, что Я.А.Воронина провела большое интересное исследование, в результате которого были прояснены механизмы регуляции функционирования проводящей системы сердца, опосредованные P2-рецепторами и адренорецепторами альфа-типа. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, с привлечением большого числа современных методов исследования. Материал диссертации изложен очень логично, четким и ясным языком. В целом, рассматриваемая диссертационная работа наглядно свидетельствует о способности Я.А.Ворониной как к кропотливому анализу литературных данных и планированию сложных экспериментов, так и к их постановке и критическому анализу собственных результатов. Полученные данные имеют большое теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в этой области; достоверность полученных результатов сомнений не вызывает. Высказанные замечания либо касаются оформления диссертации, либо носят сугубо полемический характер, несколько не снижая при этом общего прекрасного впечатления от проделанной автором работы. Выводы, сделанные в диссертации, хорошо обоснованы. Материалы диссертации достаточно полно отражены в 4 публикациях; основные результаты опубликованы в российских и международных рецензируемых журналах, а также доложены на российских и международных конференциях. Важно при этом отметить, что в трех из четырех публикаций Я.А.Воронина является первым автором. Представленный автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации.

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 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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Воронина Яна Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 «Физиология человека и животных».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

доцент кафедры биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,

Серебряная Дарья Владимировна

\_\_\_\_\_ декабря 2024 г.

Контактные данные:

тел.: , e-mail: Специальность, по которой \_\_\_\_\_

официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.04 Биохимия

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии